



Physiologische Charakterisierung zweier intrazellulärer Molybdätransporter in Arabidopsis

**Vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation**

D386

**vorgelegt von
Andreas Gasber
Kaiserslautern, im Juni 2010**

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.08.2010

**Berichterstatter:
Herr Professor Dr. H. Ekkehard Neuhaus
Herr Professor Dr. Matthias Hahn**

meinen Eltern

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Molybdän als Kofaktor	2
1.2 Molybdoenzyme.....	4
1.3 Molybdätransport	6
1.4 Themen dieser Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Chemikalien und Enzyme	10
2.2 Pflanzen.....	10
2.2.1 Anzucht auf Erde.....	11
2.2.2 Anzucht in steriler Flüssigkultur	11
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	12
2.3.1 Verwendete Vektoren und Konstrukte	12
2.3.2 Verwendete Oligonukleotide.....	13
2.3.3 Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.4 DNA- Manipulation mittels Restriktion	15
2.3.5 DNA-Gelelektrophorese	15
2.3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	16
2.3.7 Amplifikation von DNA mittels PCR	16
2.3.8 RNA-Gelelektrophorese	17
2.3.9 RNA-Transfer auf Membran mittels „Northern Blotting“	18
2.3.10 Synthese radioaktiver Sonden.....	19
2.3.11 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	20
2.4 Transformation von Pflanzenmaterial.....	21
2.4.1 Transformation von <i>Allium cepa</i> -Epidermiszellen mittels Partikelkanone.....	21
2.4.2 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten.....	21
2.4.3 GFP-Konstrukte	23
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.5.1 Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität.....	24
2.5.2 Bestimmung der Aktivität der Xanthindehydrogenase und der Aldehydoxidase	25
2.5.3 Bestimmung der Aktivität der Sulfitoxidase.....	26
2.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford	26

2.5.5	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	27
2.5.6	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen zur Isolierung von Membranen	27
2.5.7	Solubilisierung und Reinigung von Membranproteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	28
2.5.8	SDS-PAGE	30
2.5.9	Western-Blot und Immunfärbung.....	32
2.6	Ionenchromatographische und spektroskopische Analysen.....	34
2.6.1	Anionen-Messung mittels Ionenchromatographie.....	34
2.6.2	Molybdat-Messungen.....	35
2.6.3	HPLC-Nachweis von Intermediaten der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese	35
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von MOT1 und MOT2.....	38
3.1.1	Fluoreszenzanalysen der GFP-Fusionsproteine von MOT1 und MOT2.....	38
3.1.2	Untersuchung der Zielsteuerung von MOT2 zum Tonoplasten.....	41
3.1.3	Heterologe Expression von MOT1 und MOT2 zur Herstellung von Antikörpern	42
3.2	Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien mit Insertionen im <i>MOT1</i> -, <i>MOT2</i> - oder beiden Genen	46
3.2.1	Auswirkung molybdatfreier Anzucht auf das Wachstum der KO-Linien <i>mot1</i> , <i>mot2</i> und <i>mot1,2</i>	46
3.3	Molybdatgehalte in Wt- und KO-Pflanzen	48
3.3.1	Molybdatgehalte in verschiedenen Geweben	48
3.3.2	Molybdatgehalte in Vakuolen	50
3.3.3	Identifikation der T-DNA-Insertion im ORF des <i>MOT2</i> -Gens als Ursache für den Phänotypen der KO-Linie <i>mot2</i>	51
3.4	Auswirkungen des veränderten Molybdatmetabolismus der KO-Linien auf molybdataabhängige Enzyme	53
3.4.1	Nitratreduktase.....	53
3.4.2	Aktivitäten der weiteren Moco-abhängigen Enzyme	57
3.4.3	Moco-Gehalte der KO-Linien.....	58
3.5	Expressionsprofile der Gene von MOT1 und MOT2.....	60
3.5.1	Expression der Gene <i>MOT1</i> und <i>MOT2</i> während des Wachstums unter verschiedenen Molybdatkonzentrationen	60
3.5.2	Expression der Gene <i>MOT1</i> und <i>MOT2</i> unter Seneszenz.....	61
4.	Diskussion.....	62
4.1	MOT1 bewirkt als Transportprotein im Endoplasmatischen Retikulum die Beladung der Vakuole mit Molybdat.....	63

4.2	MOT2 ist essentiell für den Export von Molybdat aus der Vakuole, speziell während der Seneszenz.....	68
4.3	Ein hypothetisches Modell für intrazellulären Molybdattransport	72
4.4	Der Molybdatgehalt der Vakuole könnte Einfluss auf die cytosolische Konzentration des Molybdän-Kofaktors haben.....	73
4.5	Die Lokalisierung von MOT2 im Tonoplasten hängt von einem N-terminalen Dileucin ab.....	75
4.6	Ausblick	77
5.	Zusammenfassung.....	79
6.	Literatur	80
7.	Anhang.....	89
7.1	Aminosäurealignment der Sequenzen von MOT1 und MOT2	89
7.2	Symbole für Aminosäuren.....	90
7.3	Abkürzungen.....	90

1. Einleitung

Molybdän (Mo) stellt ein Übergangsmetall der fünften Periode dar und wird im Periodensystem der Elemente mit der Ordnungszahl 42 der sogenannten Chromgruppe zugeordnet. Es kommt in der Erde hauptsächlich als Molybdänit (MoS_2), einem metallisch glänzenden Mineral, vor und findet industrielle Anwendung in Metalllegierungen, als Katalysator oder als Schmiermittel (Lepora, 2007).

Chemisch tritt Molybdän in den Oxidationsstufen II bis VI auf, wobei VI die dominante Stufe in der Stoffwechselphysiologie sowie der agronomisch relevanten Lithosphäre darstellt. Als Molybdat (MoO_4^{2-}) ist die Bioverfügbarkeit des Anions unter anderem stark abhängig vom pH-Wert und vom Wassergehalt des Bodens (Kaiser *et al.*, 2005). So treten Molybdatdefizienzen neben geringen Molybdatgehalten besonders in sauren Böden auf, da die Verfügbarkeit des Anions mit dem pH-Wert des Bodens steigt (Reddy *et al.*, 1997). Diese Defizienzen können von wirtschaftlicher Bedeutung sein, da sich durch reduzierte Aktivitäten der molybdataabhängigen Enzyme die Biomasseproduktion von agronomisch bedeutenden Kulturen verringert.

Diese molybdataabhängigen Enzyme (Molybdoenzyme) katalysieren Schlüsselreaktionen der globalen Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismen in fast allen biologischen Organismen (Mendel und Bittner, 2006). Dazu zählen Bakterien, Algen, Pilze, Tiere und Pflanzen, wobei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eine prominente Ausnahme darstellt. In letzterem Organismus konnten bislang weder Molybdoenzyme noch Molybdattransporter identifiziert werden (Zhang und Gladyshev, 2008). Dies bedingt die eher ungewöhnliche Situation, dass der eukaryotische Molybdänstoffwechsel am besten an Tieren und Pflanzen untersucht ist.

Mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase verleiht Molybdän als Komplex mit einem Pterin-basierten Kofaktor Enzymen katalytische Aktivität. In einigen Archaea kann Wolfram statt Molybdän das Redoxzentrum des Kofaktors bilden (Bever *et al.*, 2009).

In Pflanzen sind vier Enzyme bekannt, deren Aktivität von Molybdän als katalytischem Metall im aktiven Zentrum abhängt. Dabei spielt die Nitratreduktase als Schlüsselenzym der Stickstofffixierung die wichtigste Rolle, ein Molybdänmangel kann in diesem Zusammenhang zu Ertragseinbußen führen (Mendel, 1997). Obwohl Molybdänmangel in der Ernährungsphysiologie des Menschen aufgrund des

geringen Tagesbedarfs von 50-100 µg selten auftritt, sind genetisch bedingte Moco-Defizienzen letal. Diese führen zu einem Verlust der Sulfioxidase-Aktivität, letzteres Molybdoenzym ist essentiell für die Sulfid-Detoxifizierung. Die Akkumulation von Sulfid resultiert in neuronalen Schäden, zu deren Symptomen eine verlangsamte Entwicklung des Gehirns sowie mentale Retardierung zählen (Mendel und Bittner, 2006).

1.1 Molybdän als Kofaktor

Molybdän ist in der Lage, zwischen den Oxidationsstufen IV, V und VI zu wechseln und somit in Redoxreaktionen den Transfer von zwei Elektronen zu katalysieren. Dazu steht es den Redoxenzymen in Form von Kofaktoren zur Verfügung, wobei man zwei Arten von Molybdän-Kofaktoren unterscheidet. Den Eisen-Molybdän Kofaktor (FeMo-co) und den Pterin-basierten Molybdän Kofaktor (Moco) (Schwarz *et al.*, 2009).

Der Eisen-Molybdän Kofaktor (FeMo-co) findet sich ausschließlich in der bakteriellen Nitrogenase, welche die Reduktion von elementarem Stickstoff (N_2) zu Ammonium (NH_4^+) katalysiert (Burgess und Lowe, 1996). Der Kofaktor besteht aus 7 Eisen-, 9 Schwefel- und einem Molybdän-Atom. Hinzu kommt Homocitrat und entweder ein weiteres Kohlenstoff-, Sauerstoff- oder Stickstoffatom. Zur Gewährleistung der Nitrogenase-Aktivität finden sich zwei Kofaktormoleküle kovalent über $Cys_{\alpha 275}$ und $His_{\alpha 442}$ an die beiden α -Untereinheiten der Nitrogenase gebunden (Einsle *et al.*, 2002).

Der Molybdän Kofaktor (Moco) unterscheidet sich strukturell sehr vom Eisen-Molybdän Kofaktor und ist in Abb. 1.1 dargestellt. Charakteristisch für die Struktur des Moco ist ein Metall-bindendes Pterin (MPT). Dieses wird ausgehend von Guanosin-Triphosphat (GTP) über zyklisches Pyranopterin-Monophosphat (cPMP) synthetisiert. Es gibt Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisierung der cPMP-Synthese und der sich anschließende Export ins Cytosol könnte durch den ABC-Transporter Atm3 katalysiert werden (Schwarz *et al.*, 2009). Das MPT ist durch eine Kupfer-koordinierende Dithiolgruppe charakterisiert, welche über eine MPT-AMP Zwischenstufe ein Molybdät-Ion koordiniert und somit den Moco bildet (Schwarz *et al.*, 2009). In Eukaryoten unterscheidet man zwei Moco-Typen (Abb. 1.1): In Enzymen der Sulfioxidase-Familie trägt das Molybdät Cystein als Ligand, in

Enzymen der Xanthinoxidase-Familie einen Sulfidoliganden (Mendel, 2007). Weiter können zwei Pterinreste über ein Molybdänatom koordiniert werden, diese tragen dann jeweils ein Guanosin-Monophosphat. Dieser sogenannte Mo-bis-MPT Guanosin-Dinukleotid-Kofaktor (Mo-bis-MGD) kommt nur in Molybdoenzymen der Dimethylsulfoxid-Reduktase- (DMSOR)-Familie in Prokaryoten vor (Muora *et al.*, 2004).

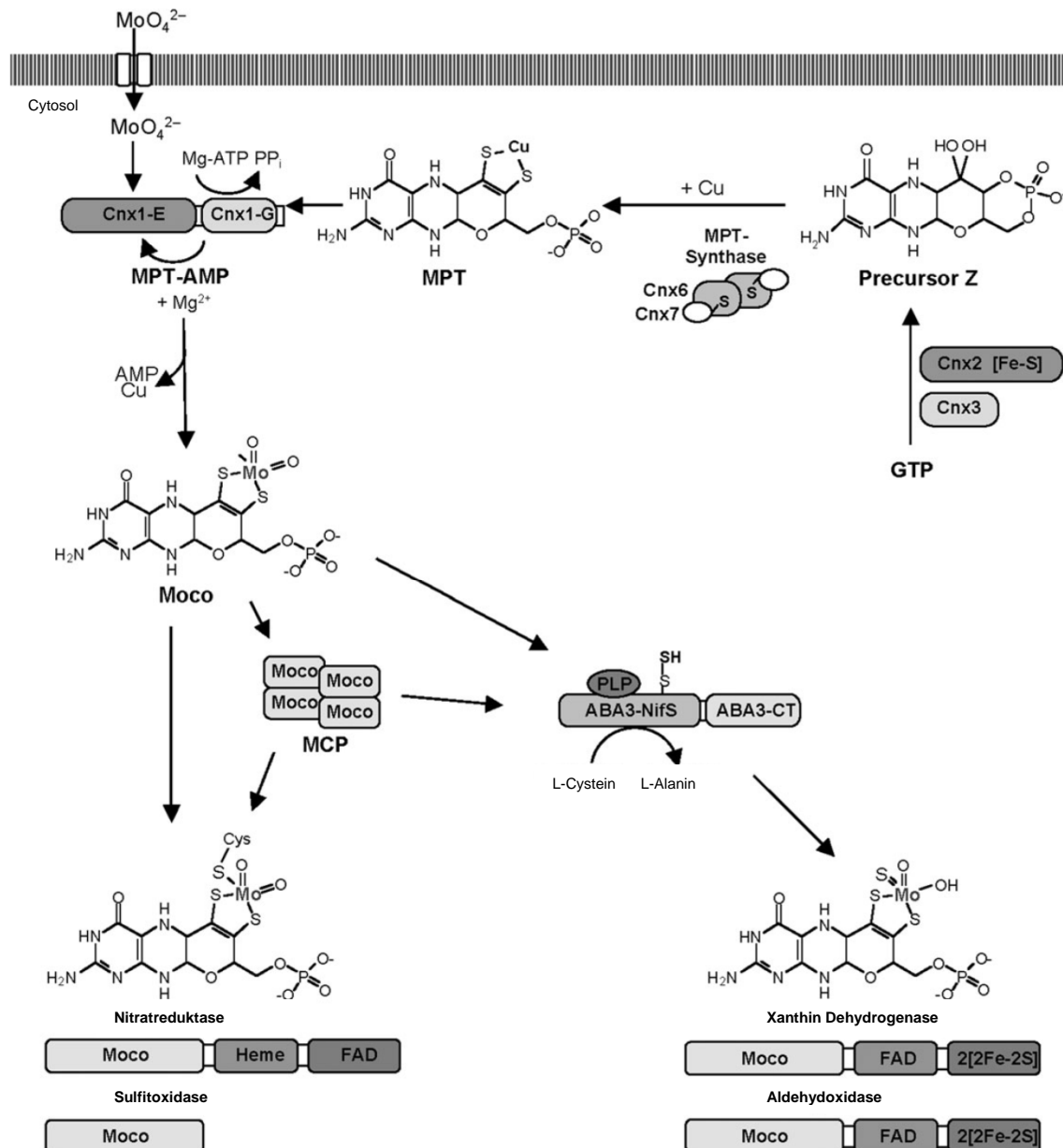


Abb. 1.1: Struktur und Biosynthese des Molybdän-Kofaktors (Moco) in Pflanzen

Die cytosolisch lokalisierte Biosynthese ausgehend von GTP und den darin involvierten Enzymen ist schematisch dargestellt. Auch die strukturellen Unterschiede zwischen dem Moco der Sulfioxidase- (links) und der Xanthin Dehydrogenase-Familie (rechts) sind abgebildet. Die Bezeichnung der in der Biosynthese involvierten Enzyme leitet sich von „cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase“ (Cnx) ab. MPT: Metall-bindendes Pterin; MCP: postuliertes „moco carrier protein“. Nach Mendel, 2007.

Freies Moco ist extrem sensibel gegenüber Oxidationen, daher wird seine Existenz abseits von Proteinen ausgeschlossen (Schwarz *et al.*, 2009). In Bakterien und der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* sind Proteine bekannt, die Moco binden und als Chaperone wirken könnten (Pau und Lawson, 2002; Ataya *et al.*, 2003). Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde kürzlich eine Gruppe von neun Moco-Bindeproteinen (MoBP, auch „Moco Carrier Protein“, MCP) beschrieben, welche im Cytosol lokalisiert sind. Interaktionsstudien lassen den Schluss zu, dass diese Bindeproteine an der zellulären Verteilung von Moco beteiligt sind (Kruse *et al.*, 2010).

1.2 Molybdoenzyme

Es sind über 50 Molybdoenzyme bekannt, also Enzyme deren katalytische Aktivität auf einer Molybdän-abhängigen Redoxreaktion basiert. Mit Ausnahme der oben erwähnten Nitrogenase wird Molybdän in Form eines Pterin-basierten Kofaktors (Moco) für die Aktivität dieser Enzyme benötigt (Mendel, 2007).

Die eukaryotischen Molybdoenzyme lassen sich abhängig vom Liganden ihres Moco in zwei Familien einteilen, die Sulfitoxidase- und die Xanthinoxidase-Familie. Zur ersteren wird das wegen seiner Bedeutung für den globalen Stickstoffkreislauf wohl wichtigste Molybdoenzym Nitratreduktase (NR) gezählt. Es katalysiert die NAD(P)H-abhängige Reduktion von Nitrat zu Nitrit in Pflanzen, Algen und Pilzen und stellt somit neben der Nitrogenase den zweiten großen Eintrittspunkt für Stickstoff in die Biosphäre dar (Campbell, 1999). Die pflanzliche NR besteht als cytosolisch lokalisiertes Homodimer aus drei Domänen: einer N-terminalen Moco-, einer Häm- und einer C-terminalen FAD-Domäne. Letztere oxidiert NADH, überträgt Elektronen über das Häm des Cytochrom *b* Typs auf das Molybdän des Moco, welches letztendlich Nitrat reduziert (Schwarz *et al.*, 2009). Die Regulation der NR ist sehr komplex, so wirken Triosephosphate oder Calciumkonzentration posttranslational regulierend. Der hohe Turnover des Enzyms ermöglicht außerdem die transkriptionelle Regulation durch Glukose, Licht, Nitrat, sowie durch Ammonium und verschiedene Aminosäuren (Campbell, 1999). Der Moco ist über ein Cystein kovalent an die NR gebunden, diese Form der Moco-Bindung weist auch die Sulfitoxidase (SO) auf. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat und ist somit ein Schutzmechanismus vor dem toxischen Sulfit. In Vertebraten ist die SO im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und eine Fehlfunktion führt zu

neuronaalem Tod (Schwarz *et al.*, 2009). Als Sulfitdehydrogenase in Bakterien reduziert das Enzym Sulfat zu Sulfit und ermöglicht so chemolithotrophes Wachstum (Aguay-Zinsou *et al.*, 2003). Die pflanzliche SO ist neben der Sulfit-Detoxifizierung möglicherweise auch an der Schwefelassimilation beteiligt (Hänsch *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den bakteriellen und vertebraten Homologen besitzt die pflanzliche SO keine Häm-Domäne und stellt somit das einzige derzeit bekannte Molybdoenzym ohne weitere Redox-aktive Zentren neben dem Molybdän dar. Neuere Untersuchungen der pflanzlichen SO weisen auf molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor vom Molybdän hin, statt auf Häm, wie bei den SOs anderer Organismen. Dies könnte auf eine Rolle der SO bei der Regulation der peroxisomalen Katalase hindeuten (Byrne *et al.*, 2009).

Zu den Enzymen der Xanthinoxidase-Familie werden die Xanthindehydrogenase (XDH) und die Aldehydoxidase (AO) gezählt, diese bilden in Eukaryoten Homodimere mit je drei Bindedomänen für Eisen-Schwefel Cluster, FAD und Moco. Zur katalytischen Aktivität der Enzyme dieser Familie wird der Moco über eine Moco-Sulphurase (ABA3 in Pflanzen und HMCS in Menschen) um einen zusätzlichen Sulphido-Liganden erweitert (Schwarz *et al.*, 2009). Sowohl XDH als auch AO oxidieren NADH unter Bildung von Superoxid. Dies spricht für eine Rolle der Enzyme unter Stressbedingungen, wie neuste Untersuchungen an der pflanzlichen AtXDH1 zeigen (Zarepour *et al.*, 2010).

Die Hauptfunktion der Xanthindehydrogenase (XDH) stellt allerdings die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure im Purin-Katabolismus in Tieren und Pflanzen dar (Mendel und Bittner, 2006). Auch in Bakterien katalysiert die XDH diese Reaktion im Purin-Abbau und weist sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zur bovinen XDH auf, ist allerdings aus je zwei α - und β -Untereinheiten aufgebaut (Dietzel *et al.*, 2009).

Als Produkt einer Genduplikation der XDH entstand die ebenfalls zur Xanthinoxidase-Familie gezählte Aldehydoxidase (AO). Die Funktion des cytoplasmatisch lokalisierten Enzyms in Tieren ist noch ungeklärt, es wird mit der Detoxifizierung von Acetaldehyd in der Leber in Verbindung gebracht (Shaw und Jayatilleke, 1990). Die pflanzliche AO ist hingegen sehr gut charakterisiert, deren vier Genprodukte AAO1-4 Hetero- und Homodimere formen, was zu einer diversen Substratspezifität von AO-Isoenzymen führt. Mit der Oxidation von Abscisin-Aldehyd zu Abscinsäure katalysiert es den letzten Schritt der ABA-Synthese. Auch die Auxine Indol-3-Acetat

und 1-Naphtyl Acetat können Produkte von AO-Isoenzyme sein, was der pflanzlichen AO eine essentielle Rolle im Hormonhaushalt einräumt (Mendel und Bittner, 2006).

1.3 Molybdattransport

Zur Gewährleistung der Aktivität von Molybdoenzymen in der Zelle muss ein Mechanismus etabliert sein, der die Aufnahme des Spurenelements in die Zelle ermöglicht. In Prokaryoten ist der entsprechende anhand des Modellorganismus *Escherichia coli* gut untersucht und wird durch einen ABC-Transporter („ATP Binding Cassette“) katalysiert (Self *et al.*, 2001). Der heteromere Proteinkomplex besteht aus dem periplasmatischen molybdatbindenden Protein ModA, dem integralen Kanal ModB und dem ATP hydrolysierenden Protein ModC. Die Gene für diese Proteine sind in einem Operon organisiert, dessen Transkription durch das molybdatbindende Protein ModE reguliert wird. ModABC stellt ein hochaffines Transportsystem mit einem apparenten K_m -Wert für Molybdat von 25-50 nM dar (Imperial *et al.*, 1998). Aufgrund von Genomsequenzen sind *Mod*-Gene in über 20 weiteren Bakterien- und Archaeaarten identifiziert worden (Self *et al.*, 2001), wie beispielsweise dem knöllchenbildenden *Bradyrhizobium japonicum* (Delgado *et al.*, 2006). Bei der Symbiose dieser Bakterien mit Leguminosen ist der hochaffine Transport von Molybdat für die Aktivität des Molybdoenzyms Nitrogenase von besonderer Bedeutung.

Neben dem Mod-Transportsystem wird Molybdat in Prokaryoten auch über einen Sulfat-Transporter vom ABC-Typ aufgenommen, dieser Komplex wird durch das *cysPTWA*-Operon codiert (Kertesc, 2001). Außerdem gibt es Hinweise auf einen unspezifischen Anionentransporter, dessen Substratspektrum neben Molybdat noch Selenat und Selenit umfasst (Lee *et al.*, 1990). Desweiteren wurde im Archaeabakterium *Pyrococcus furiosus* kürzlich ein Wolframtransporter identifiziert, der sich mit einem apparenten K_m -Wert von 11 nM auch für Molybdat hochaffin zeigt (Bever *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu Prokaryoten ist der Molybdattransport in eukaryotischen Zellen weniger gut charakterisiert. Ähnlichkeiten zwischen eukaryotischen ABC-Transportern und dem Mod-Transporter sind sehr gering. So sind ABC-Transporter in Eukaryoten meist Exportproteine (Igarashi *et al.*, 2004). Diese katalysieren unter anderem, wie im Fall von *Botrytis cinerea*, den Efflux von Xenobiotika und tragen so

zur Fungizidresistenz des Pilzes bei (Kretschmer *et al.*, 2009). Außerdem ist der Anionentransport über Membranen von Pflanzenzellen meist protonengekoppelt, wie im Fall von Sulfat, Phosphat und Nitrat (Buchner *et al.*, 2004; Poirier und Bucher, 2002; Forde, 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass auch der Molybdattransport in Eukaryoten unspezifisch über Phosphat- oder Sulfat-Aufnahmesysteme vermittelt wird (Heuwinkel *et al.*, 1992, Marschner, 1995). Besonders für Sulfattransporter, deren Substrat SO_4^{2-} hohe Ähnlichkeiten zu MoO_4^{2-} hinsichtlich der Bindungslängen, der Ladung, der Wasserstoffbrückenbildung sowie der Molekülgeometrie aufweist, liegt diese Vermutung nahe (Dudev und Lim, 2004). So reduziert die Applikation von Sulfat den Molybdatgehalt im Xylem von Tomaten, was den Schluss zulässt, dass beide Substrate um einen Transporter konkurrieren (Alhendawi *et al.*, 2005). Der Transport von Molybdat konnte auch für den Sulfattransporter SHST1 aus der Fabaceae *Stylosanthes hamata* am heterologen Hefesystem nachgewiesen werden (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Durch die Analyse von Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* konnten erstmals Hinweise auf zwei reine Molybdattransporter gefunden werden. So wurde neben einem durch Wolframat inhibierbaren, niedrig affinen Molybdattransporter noch ein Transporter mit hoher Affinität für Molybdat, der allerdings nicht sensitiv für Wolframat ist, identifiziert (Llamas *et al.*, 2000). Der direkte Nachweis der Transportaktivität blieb allerdings aus. Dieser erfolgte erst einige Jahre später an einem weiteren Transporter aus *C. reinhardtii*, nämlich MoT1 („Molybdate Transporter“). Dieser ist mit einem K_m -Wert von 7 nM hoch affin für Molybdat und seine Aktivität wird durch Wolframat inhibiert, nicht aber durch Sulfat (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007).

In Arabidopsis finden sich zwei Orthologe zum Molybdattransporter aus *C. reinhardtii*, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen lange zur Familie der Sulfattransporter gezählt und daher mit Sultr5,1 und Sultr5,2 bezeichnet wurden (Hawkesford, 2003). Zwar weisen sie einige Homologien zu dieser Familie auf, heben sich in der Sequenzanalyse allerdings als fünfte Untergruppe deutlich von den ersten vier Gruppen der Sulfattransporter-Familie ab. Untereinander ist die Homologie beider Aminosäuresequenzen mit 72% jedoch sehr hoch, die Funktion der Transporter Sultr5,1 und Sultr5,2 blieb allerdings lange ungeklärt.

Kurz nacheinander wurden nun zwei Studien über Sultr5,2 veröffentlicht, die das Protein als Molybdattransporter identifizieren und als MOT1 bezeichnen (Tomatsu *et*

al., 2007; Baxter *et al.*, 2008). Transportaktivität für Molybdat konnte in beiden Studien an Hefezellen nachgewiesen werden, wobei ein K_m -Wert von 21 nM ermittelt wurde und die Molybdataufnahme durch Sulfat nicht beeinträchtigt war (Tomatsu *et al.*, 2007). Analysen an einer KO-Linie mit T-DNA-Insertion im *MOT1*-Gen (SALK_118311), im Folgenden als „mot1“ bezeichnet, zeigten reduzierte Molybdatgehalte im Vergleich zum Wildtyp in Wurzel und Spross (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Außerdem zeigt die KO-Linie mot1 unter Anzucht ohne Molybdat ein retardiertes Wachstum, was in Anwesenheit von Molybdat nicht zu beobachten ist (Tomatsu *et al.*, 2007).

Promotor-GUS-Analysen wiesen auf hohe Aktivität des *MOT1*-Promotors in der Wurzelspitze hin, insbesondere im Bereich der Streckungszone (Baxter *et al.*, 2008). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Tomatsu *et al.*, welche eine gleichmäßige Aktivität des *MOT1*-Promotors in verschiedenen Geweben der Pflanze nachweisen.

Bezüglich der subzellulären Lokalisierung von MOT1 ist die Diskrepanz zwischen beiden Studien jedoch gravierend. So interpretieren Tomatsu *et al.* die Analysen an Tabakzellen mittels N-terminalem GFP-Fusionskonstrukt als Lokalisierung in der Plasmamembran und dem Endomembransystem, wohingegen Baxter *et al.* aufgrund von Analysen eines C-terminalen GFP-Fusionskonstrukts in Arabidopsis eine mitochondriale Lokalisierung vorschlagen.

In beiden Studien blieb das Homolog von MOT1 (ehemals Sultr5,2) weitestgehend unbeachtet. Es wurde nur beobachtet, dass Sultr5,1 im heterologen Hefesystem keine Molybdataufnahme-Aktivität zeigt (Baxter *et al.*, 2008). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu MOT1, wird das Protein Sultr5,1 in dieser Dissertation als MOT2 bezeichnet.

Über den Transport von Molybdat in weiteren Eukaryoten, insbesondere dem Menschen, ist noch nichts bekannt (Schwarz *et al.*, 2009).

1.4 Themen dieser Arbeit

Pflanzen und insbesondere die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* stellen die eukaryotischen Organismen dar, an welchen der Molybdatmetabolismus bislang am ausführlichsten untersucht wurde. Dies ist tatsächlich ungewöhnlich, da Stoffwechselwege meist aus praktischen Gründen, besonders hinsichtlich der Labortauglichkeit, an Hefen und aufgrund der pharmakologischen Relevanz an Tieren besser charakterisiert sind als an Pflanzen. Das liegt darin begründet, dass die Modellhefe *Saccharomyces cerevisiae* keine Molybdoenzyme enthält und den menschlichen Molybdoenzymen nur geringe physiologische Relevanz zukommt. Obwohl die Physiologie von Molybdän in der Pflanze gut untersucht ist, wurde der Transport dessen physiologischer bedeutsamer Form Molybdat bisher kaum untersucht. Erst neuste Untersuchungen schlagen das Transportprotein MOT1 als Molybdattransporter vor, der entweder in der Plasmamembran oder mitochondrial lokalisiert ist. Weder das Homolog MOT2 wurde bislang untersucht, noch die Implikationen beider Proteine auf den Stoffwechsel in *A. thaliana* anhand von „Knock-out“-Pflanzenlinien.

In der hier vorliegenden Dissertation sollte zunächst die subzelluläre Lokalisierung beider Proteine anhand von GFP-Fusionsproteinen untersucht werden, was entscheidend hinsichtlich der Einordnung eines Transporters in den zellulären Stoffwechsel ist. Während die Lokalisierung von MOT2 bislang unbekannt ist, wird die des MOT1 kontrovers diskutiert. Dabei sollte auch die Zielsteuerung von Proteinen innerhalb des sekretorischen Wegs analysiert werden.

Neben der Lokalisierung bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, die Aufgaben beider Transporter im pflanzlichen Stoffwechsel zu untersuchen. Über Molybdatgehalte verschiedener Gewebe und die Aktivitäten molybdataabhängiger Enzyme in verschiedenen KO-Linien sollte der Einfluss der beiden Membranproteine MOT1 und MOT2 herausgearbeitet werden. Dabei lag großes Interesse auf der subzellulären Verteilung von Molybdat, sowie der Rolle der Vakuole als Mineralspeicher. Auch sollten sowohl entwicklungspezifische Molybdattranslokationen innerhalb der ganzen Pflanze, als auch die Moco-Gehalte der T-DNA-Insertionslinien von MOT1 und MOT2 analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text vermerkt, von der Firmen AppliChem (Darmstadt), Bayer (Leverkusen), Biorad (München), Duchefa (Harlem, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MPB Biochemicals (Eschwege), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën (Seelze), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) oder Stratagene (Heidelberg) in höchstem Reinheitsgrad erworben. Soweit nicht anders angegeben wurde stets deionisiertes Milli-Q Wasser verwendet.

2.2 Pflanzen

Die Untersuchungen an Pflanzen in der vorliegenden Dissertation wurden an *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. der Varietät Columbia durchgeführt. Die T-DNA Insertionsmutanten aus dem SALK-Projekt (The Salk Institute, La Jolla, CA, Alonso *et al.*, 2003) wurden vom NASC (Nottingham, England) bezogen. Es wurden Mutanten verwendet, bei denen die T-DNA-Insertionen in den ORF-Bereichen der Gene *At2g25680* (Accession: 2050261) und *At1g80310* (Accession: 2034245) lagen. Bei der Doppelmutane handelt es sich um eine Kreuzung beider Insertionsmutanten, mit der Folge einer homozygoten Deletion beider Gene (Feifer, 2008). Zur Komplementation von *mot2* mit dem nativen *MOT2*-Gen wurde das Gen mit Promotor (1032 bp vor Start-ATG) und Terminator (395 bp nach Stop-Codon) in den Vektor pGreen kloniert. Dieses Konstrukt wurde dann mit dem Plasmid pSOUP (BASTA®-Resistenz) in *mot2*-KO-Pflanzen kotransformiert (Feifer, 2008).

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Pflanzen

Pflanze	Resistenz	Beschreibung
Columbia	-	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp

mot1	Kan ^r	MoT1-„knock out“-Linie, Salk_069683
mot2	Kan ^r	MOT2-“knock out“-Linie, Salk_015044
mot1,2	Kan ^r	MOT1-„knock out“-Linie, Salk_069683/ MOT2-“knock out“-Linie, Salk_015044, “Doppelmutante”
kompmot2	Kan ^r , BASTA®	Komplementation von mot2 mit dem nativen <i>MOT2</i> -Gen

2.2.1 Anzucht auf Erde

Zur Anzucht auf Erde wurde ED-73 Einheitserde verwendet. Um eine gleichmäßige Keimung zu erreichen, wurden die Samen für 2 Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen in Klimakammern bei einer Temperatur von 21°C und einer Tageslänge von 10 Stunden bei einer Lichtintensität von 110 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert.

2.2.2 Anzucht in steriler Flüssigkultur

Die Anzucht in steriler Flüssigkultur erfolgte nach Scheible *et al.* (2004) in 30 ml Vollmedium. Die Sterilisation der Samen erfolgte mittels 15% (v/v) Natriumhypochlorid und zur Stratifizierung wurden die Samen vor der Aussaat für 2 Tage bei 4°C inkubiert. Die Kolben wurden auf einem Schüttler bei 80 rpm, einer Temperatur von 21°C und einer Tagesdauer von 10 Stunden bei einer Lichtintensität von 110 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Nach 10 Tagen wurden die Pflanzen aus den Kolben entnommen, gründlich mit Wasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff gemörsert und die Proben bei -70°C gelagert.

Vollmedium	
3 mM	KNO ₃
1 mM	Gln
3 mM	KH ₂ PO ₄
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgSO ₄
2 mM	K ₂ SO ₄
0,5% (w/v)	Saccharose
50 µM	KCl
50 µM	H ₃ BO ₃
10 µM	MnSO ₄
2 µM	ZnSO ₄
1,5 µM	CuSO ₄
0,075 µM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
72 µM	Fe-EDTA
3 mM	MES
	pH 5,8 mit KOH

Zur molybdatfreien Anzucht wurde Medium ohne (NH₄)₆Mo₇O₂₄ verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Vektoren und Konstrukte

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Dissertation verwendeten Vektoren und Konstrukte aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren und Konstrukte

Vektor/Konstrukt	Merkmal	Referenz
pBSK	Amp ^R , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pET16b	Amp ^R , Expressionsvektor, Histidin-Tag	Novagen, Heidelberg

pGFP2	Amp ^R , Pflanzentransformationsvektor, Ca35S-Promotor	Wendt <i>et al.</i> (2000)
MOT1-pGFP2	<i>MOT1</i> -Gen in pGFP2	Feifer, 2008
MOT1-pBSK	<i>MOT1</i> -Gen in pBSK	Feifer, 2008
MOT1-pET16b	<i>MOT1</i> -Gen in pET16b zur Expression in <i>E.coli</i>	diese Arbeit
MOT2-pGFP2	<i>MOT2</i> -Gen in pGFP2	Feifer, 2008
MOT2-pBSK	<i>MOT2</i> -Gen in pBSK	Feifer, 2008
MOT2-pET16b	<i>MOT2</i> -Gen in pET16b zur Expression in <i>E.coli</i>	diese Arbeit
MOT2_L-A- pGFP2	<i>MOT2</i> -Gen in pGFP2; Dileucin durch Mutagenese in Alanine ausgetauscht	diese Arbeit

2.3.2 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide, auch „Primer“ genannt, sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
M1Expr_fwd	CCACAAAACAGAACATATGGAGTCTC
M1Expr_rev	CAAAGAGGATCCTCAAGCATGTTC
M2Expr_fwd	GACTTTAGATCCACATATGGAGAC
M2Expr_rev	GTCATTTTGGCGGATCCATCTTAG
M2_L-A_fwd	GACA ACTACA ACTCCTGCGGCCCGGTGATCGCAG
M2_L-A_rev	CTGCGATCACCGGGGGCCGCAGGAGTTGTAGTTGTC

2.3.3 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Im Zuge der Plasmidisolierung für Restriktionsanalysen oder anderer molekularbiologischer Arbeiten wurden entsprechend der Expressionsrate für high-copy Plasmide (z.B. pBSK) 1,5 – 3 ml Übernachtskultur und für low-copy Plasmide (z.B. pET16b) 2 – 4 ml Übernachtskultur verwendet. Durch Zentrifugieren für 2 min bei 7000g, RT wurden die Bakterien sedimentiert und das Sediment mit 200 µl P1-Puffer mit 1 mg/ml DNase freier RNase (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Im Anschluss erfolgt die alkalische Lyse durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (Qiagen, Hilden), welcher Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Hierbei freigesetzte Proteine sowie chromosomale DNA werden durch NaOH denaturiert. Diese Reaktion wurde nach spätestens 5 Minuten durch Hinzufügen von 200 µl P3-Puffer (Qiagen, Hilden) zur Neutralisierung gestoppt. Proteine und chromosomale DNA fallen nach mehrmaligem Invertieren und 10 Minuten Inkubation auf Eis durch das enthaltene Kaliumacetat als Salz-Detergens-Komplexe aus und lassen sich durch Zentrifugieren sedimentieren (12000g, 20 min, 4°C). Die im Überstand verbleibende Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumen 100%igem Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Der nach anschließender Zentrifugation (12000g, 15 min, 4°C) entstandene Plasmid-DNA-Niederschlag wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter der Sterilbank getrocknet und in 30-50 µl H₂O resuspendiert.

Puffer P1

25 mM	Tris-HCl
10 mM	EDTA
1 mg/ml	RNase (DNase-frei)
	pH 8,0

Puffer P2

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

Puffer P3

3 M	Kaliumacetat
	pH 5,5

2.3.4 DNA- Manipulation mittels Restriktion

Die DNA-Restriktion wurde sowohl zur Erzeugung der zur Klonierung verwendeten Fragmente als auch zur Verifizierung der Klonierungsprodukte eingesetzt. Aufgrund der Lage der Erkennungssequenzen auf der DNA weisen die bei der Restriktion erhaltenen Fragmente eine spezifische Länge auf und können durch gelelektrophoretische Auftrennung identifiziert werden.

Bei den durchgeführten Restriktionen wurden Enzyme und Puffermedien der Firma MBI Fermentas (St. Leon Roth) nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in horizontalen Gelkammern durchgeführt (Sambrook *et al.*, 2001). Der Nachweis der verschiedenen DNA-Banden erfolgte durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht ($\lambda = 260 \text{ nm}$) orange-rot fluoresziert. Für die Herstellung von Agarose-Gelen wurden entsprechende Mengen an Agarose (Invitrogen, Eggenheim) eingewogen und mit entsprechendem Volumen TAE-Puffermedium aufgeköcht. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 1%ige bis 2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: $0,5 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Zu trennende DNA-Proben wurden zuvor mit zehnfach-TAE-Ladepuffermedium versetzt, auf das Gel aufgetragen und in einer mit einfach-TAE-Laufpuffermedium gefüllten Gelkammer bei 120 mV aufgetrennt. Die jeweiligen Fragmentgrößen wurden mittels *Pst*I-verdauter λ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) identifiziert.

TAE-Laufpuffer (50-fach)

242 g	Tris-HCl
57,1 ml	Eisessig
500 mM	EDTA
ad 1 l H ₂ O	pH 5,8

TAE-Ladepuffer (10-fach)

30 % (v/v)	Glycerin
0,24 % (v/v)	Bromphenolblau
in 10-fach TAE-Puffer ansetzen	

DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverdau oder PCR entstanden sind, können je nach Bedarf nach elektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dazu wurde das Nucleo-Spin-Extract II-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Adsorption von DNA an eine Silika-Membran unter hohen Salzkonzentrationen. Salze, Proteine und Agaroserückstände, welche nachfolgende Reaktionen (Restriktion, Ligation) stören könnten, wurden durch Waschen der Membran entfernt. Durch einen leicht alkalischen Puffer wurde die DNA anschließend von der Silika-Membran eluiert.

2.3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in DNA- bzw. RNA-haltigen Lösungen erfolgte mittels speziellen UV-Plastikküvetten (Eppendorf, Hamburg) in einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) oder durch Einsatz eines „Nanodrop“-Gerätes (Seqlab, Erlangen). Das Prinzip der Messung beruht auf der Absorption der RNA und DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorptionseinheit entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml bei einzelsträngiger RNA (Sambrook *et al.*, 2001). Mögliche Verunreinigungen mit Proteinen verursachen Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 230 nm (Absorptionen von Peptidbindungen) und 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäuren). Durch das Verhältnis der einzelnen Extinktionswerte lässt sich die Reinheit der Probe bestimmen.

2.3.7 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die PCR-Reaktionen dieser Arbeit wurden in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) vollzogen. In dieser Arbeit wurden für die Durchführung der PCR zum einen die *Taq*-Polymerase und zum anderen die *Pfu*-Polymerase nach Empfehlung des Herstellers verwendet. Erstere stammt aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* und besitzt ihr Aktivitätsmaximum bei 74°C. Sie verliert ihre Aktivität auch nicht bei einer Temperatur von 94°C, die zur Denaturierung der Doppelstränge nötig ist (Saiki *et al.*, 1988). Die Polymerase erzeugt DNA-Fragmente mit einem überhängenden Adenosinnukleotid.

Die letztere Polymerase stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*. Vorteil dieser Polymerase ist eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrektur der Synthese („proofreading“) erlaubt (Mülhardt, 2003). Die PCR-Produkte besitzen deswegen auch keinen Basenüberhang, sondern glatte Enden.

Ein Standard-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl) setzte sich aus 10-100 ng DNA-Template bzw. ganzen Zellen (Kolonie-PCR), 200 µM dNTPs, jeweils 100 pmol Oligonukleotid-Primer (sense und antisense), zehnfach-PCR-Puffermedium und 2 Units DNA-Polymerase zusammen.

Standard-PCR-Protokoll

Schritt	Dauer	Temperatur
Primäre Denaturierung	2-5 min	95°C
Denaturierung	0,5-1 min	95°C
Annealing	0,5 min	40-65°C
Extension	2-5 min	72°C
Finale Extension	5 min	72°C
Ende	∞	4°C

2.3.8 RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA-Molekülen durch Elektrophorese wurde mittels Formaldehyd-Gelen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 2001).

Zum Gießen der Gele wurden 0,825 g Agarose in 62 ml DEPC-H₂O und 7,5 ml 10-fach MEN-Puffermedium aufgekocht, nach kurzer Abkühlung erfolgte die Zugabe von 5,5 ml 37% Formaldehyd. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegeben und nach dem Erstarren des Gels die Proben aufgetragen.

Es wurden pro RNA-Probe 8 - 10 µg RNA auf 20 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt, anschließend wurden 15 µl RNA-Ladepuffermedium dazu gegeben. Daraufhin erfolgte die Denaturierung der RNA, indem die Proben 5 min bei 65°C inkubiert wurden. Die Elektrophorese wurde 1 - 1,5 h bei 70 V durchgeführt, wobei als Laufpuffermedium 1x MEN-Puffermedium diente.

MEN-Puffer (10-fach)

200 mM	MOPS
50 mM	Natriumacetat

10 mM	EDTA pH 6,8
RNA-Ladepuffer	
15% (v/v)	MEN (10-fach)
25% (v/v)	Formaldehyd (37%)
50% (v/v)	Formamid
10% (v/v)	Farbpuffer
10 µg/ml	Ethidiumbromid
Farbpuffer	
50% (v/v)	Glycerin
0,25% (v/v)	Bromphenolblau
1 mM	EDTA pH 8,0

2.3.9 RNA-Transfer auf Membran mittels „Northern Blotting“

Für den Nachweis einer bestimmten mRNA mittels Hybridisierung mit einer [³²P]-markierten DNA-Sonde wurde die isolierte Gesamt-RNA, die nach Auftrennung in einem Formaldehydgel im denaturierten Zustand vorlag, auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nylon+ 60207, Pall GmbH, Dreieich) transferiert (Sambrook *et al.*, 2001). Dazu wurde das Gel zunächst zweimal 10 min mit DEPC-H₂O gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen und 10 min in 10x SSC-Puffermedium äquilibriert. Der Aufbau für die RNA-Übertragung wurde nach Sambrook *et al.*, durchgeführt. Das „Blotting“ wurde über Nacht mit 10-fachem SSC-Puffermedium ausgeführt. Nach dem Transfer konnte die RNA bei UV-Licht der Wellenlänge 260 nm nachgewiesen werden. Die Fixierung der transferierten RNA auf der Nylonmembran wurde mit Hilfe eines UV-Ofens (Amersham Biosciences, Freiburg) über einen Energiebereich von 0 bis 1200 mJ · cm⁻² durchgeführt.

SSC-Puffer (10-fach)	
1,5 M	NaCl
150 mM	Natriumzitat pH 7,0

2.3.10 Synthese radioaktiver Sonden

Um RNA-Moleküle auf einem „Northern-Blot“ auf der Nylonmembran spezifisch nachzuweisen, kamen radioaktiv markierte DNA-Sonden zum Einsatz. Das Prinzip dieser Methode ist die *in vitro*-Hybridisierung und Detektion. Die Markierung erfolgt während der *in vitro*-Synthese des komplementären Stranges durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide (Feinberg, Vogelstein, 1983).

Zunächst werden 100 ng „Template“-DNA, die nach einer Elektrophorese aus dem Gel extrahiert wurden (s. Abschnitt 2.4.9), mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 bis 8 min in kochendem Wasser denaturiert. Der Ansatz wurde sofort auf Eis abgeschreckt und nach Zugabe von 3 µl Markierungsmix (5-fach) und 50 µCi radioaktiv markierten α-[³²P]-dCTPs (Amersham Biosciences, Freiburg) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 35 µl TEN-Puffermedium abgestoppt und nicht in den komplementären DNA-Strang eingebaute radioaktive Nukleotide gelchromatographisch mit ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare, München) abgetrennt. Dazu wurde die Sephadex-Säule mit dem Ansatz beladen und 2 min bei 735g zentrifugiert.

Markierungsmix (5-fach)

250 mM	Hepes	
50 mM	MgCl ₂	aus Stammlösung (4-fach):
0,5 mM	DTE	1 M Hepes, 200 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE, 40 mM Spermidin, 2%
10 mM	Spermidin	(v/v) Triton 100-X; pH 7,0
0,5% (v/v)	Triton 100-X	
125 µM	dATP	
125 µM	dGTP	aus Stammlösung: jedes Nukleotid 10 mM
125 µM	dTTP	
1 mg/ml	BSA	aus Stammlösung 20 mg/ml in 50% Glycerin
31 OD ₂₆₀ /ml	Randomprimer (dN9)	aus Stammlösung 10 mg/ml = 360 OD ₂₆₀ /ml
1 U/µl	Klenow-Polymerase	
0,0025 U/µl	anorganische Pyrophosphatase	
45%	Glycerin	

TEN-Puffer

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
100 mM	NaCl
	pH 8,0

2.3.11 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Vor der Behandlung mit der Sonde wurde die Nylonmembran zur Besetzung freier Bindungsstellen 1 h bei 65°C mit Hybridisierungspuffermedium (Church, Gilbert, 1984) in einem Hybridisierungs-ofen (Biometra GmbH, Göttingen) prähybridisiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und kurz auf Eiswasser abgekühlt. Anschließend wurde die nun einzelsträngige Sonde zu frischem Hybridisierungspuffermedium und dieser zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C.

Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch Behandlung der Membran mit auf 65°C vorgewärmtem Waschpuffer 1 (zweimal 30 min) sowie Waschpuffer 2 (Raumtemperatur, 10 min) entfernt.

Die Membran wurde in Kunststoffolie eingeschlagen und auf einem Phosphorscreen (PerkinElmer Life Sciences, Zaventem, Belgien) in einer lichtundurchlässigen Expositionskassette (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Je nach Strahlungsintensität erfolgte die Entwicklung des Phosphorscreens nach 24 h bis 72 h mit einem Cyclone Phosphoimager (Packard, Darmstadt).

Hybridisierungspuffer

0,25 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	EDTA
1% (w/v)	BSA
7% (w/v)	SDS
	pH 7,2

Waschpuffer I

40 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	EDTA
0,5% (w/v)	BSA
5% (w/v)	SDS
	pH 7,2

Waschpuffer II

40 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	EDTA
1% (w/v)	SDS
	pH 7,2

2.4 Transformation von Pflanzenmaterial

2.4.1 Transformation von *Allium cepa*-Epidermiszellen mittels Partikelkanone

Vor der Transformation der Epidermiszellen wurden die Wolframpartikel (Biorad, München) präpariert. Dazu wurden 60 mg der Wolframpartikel in 1 ml 75% Ethanol aufgenommen, 5 min gevortext und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 20.000g für 5 s um die Partikel zu pelletieren. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 20.000g für 5 s. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt und anschließend die Partikel in 1 ml 50% Glycerin aufgenommen.

Danach erfolgte die Beladung der Wolframpartikel. Hierzu wurden 50 µl der präparierten Partikel mit 5 µg Plasmid-DNA, 47,5 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin versetzt, für 3 min gevortext und für 1 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Partikel bei 20.000g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet jeweils einmal mit 140 µl 70% Ethanol und 140 µl 100% Ethanol gewaschen. Die Partikel wurden dann in 50 µl 100% Ethanol aufgenommen und direkt zur Transformation der Epidermiszellen verwendet.

Für die Transformation wurden frische Zwiebelschalen verwendet. Der Abstand zwischen der Epidermisschicht und dem Probenhalter betrug 6 cm. 6 µl der mit der DNA beladenen Partikel wurden, nach gründlicher Durchmischung, in den Probenhalter pipettiert. Die Partikel wurden anschließend mit einem Druck von 10 bar Helium und einem Unterdruck von -800 mbar auf die Epidermis geschossen. Nach ca. 24-48 h erfolgte die Auswertung der transformierten Epidermiszellen mit Hilfe des Binokulars MZ 10 F (Leica, Solms) und des Lichtmikroskops Axiovert 200M (Zeiss, Jena) unter UV-Licht.

2.4.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten

Zur Isolierung intakter Protoplasten aus *N. tabacum* wurden Blätter von 3-4 Wochen alten Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden mit einem Skalpell in sehr feine Streifen geschnitten und in eine Petrischale mit 10 ml Enzymlösung im Dunkeln über Nacht bei 25°C inkubiert. Hierbei wurden die Zellwände abgebaut und intakte Protoplasten freigesetzt. Die Protoplastenlösung wurde auf Falconröhrchen verteilt, mit 2 ml Percoll-Lösung überschichtet und bei 70g für 8 min bei RT zentrifugiert. Der

Überstand wurde bis ca. 0,5 cm über der Protoplastenphase abgesaugt. Nach Abnahme der Protoplasten wurden diese mit Percoll-Lösung auf ca. 35-40% Percoll eingestellt. Dann wurde ein Gradient aus den Protoplasten, 7,5 ml Percoll (25% w/v) und 5 ml Sorbitol (400 mM) aufgebaut und bei 70g für 8 min bei RT zentrifugiert. Die Protoplasten wurden anschließend zwischen der Percoll- und der Sorbitol-Phase abgenommen und kurz bei 30°C inkubiert und mit einem Volumen Mannit/Magnesium-Lösung gemischt.

Enzymlösung

0,5 M	Sorbit
1 mM	CaCl ₂
0,75%	Cellulase Onozuka R-10 (Serva)
0,03%	Pectolyase Y23 (Serva)
pH 5,7	Lösung sterilfiltrieren

Percoll-Lösung

0,5 M	Saccharose
0,1%	MES
1 mM	CaCl ₂
auf Volumen	Percoll

W5-Medium

145 mM	NaCl
125 mM	CaCl ₂
5 mM	KCl
5 mM	Glukose
pH 5,6	Lösung autoklavieren

Mannit/Magnesium-Lösung

0,4 M	Mannit
15 mM	MgCl ₂
0,1%	MES
pH 5,6	Lösung sterilfiltrieren

Zur Protoplastentransformation wurden 15 µg DNA in die Mitte einer kleinen Petrischale (5 cm) gegeben. Dann wurden 300 µl Protoplasten (in Mannit/Magnesium-Lösung) und 500 µl 40% PEG-Lösung aufgetropft. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT. Anschließend wurden nacheinander 0,6 ml, 1 ml, 2 ml und 4 ml W5-Medium aufgetropft und jeweils für 5 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 60g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml W5-Medium resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde dann für ca. 24-48 h im Dunkeln und bei 25°C in einer kleinen Petrischale inkubiert. Die Auswertung der transformierten Protoplasten erfolgte mit dem Leica TCS SP11 Mikroskop und der Leica Confocal Software 2.5. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen >510 nm detektiert.

PEG-Lösung	
0,4 M	Mannit
0,1 M	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O
0,1%	MES
pH 8,0	
40%	PEG 6000, sterilfiltrieren

2.4.3 GFP-Konstrukte

Die für die Transformation der Tabakprotoplasten und Zwiebelepidermiszellen verwendeten GFP-Konstrukte wurden von Ingmar Feifer (Feifer 2008) hergestellt. Das C-terminale Ende der *MOT1*- und *MOT2*-kodierenden Sequenzen wurde *in frame* an die GFP-Sequenzen kloniert. Die jeweiligen Stop-Kodons der MOT-Sequenzen wurden entfernt, um einen Abbruch der Translation zu verhindern. Das Stop-Codon wurde erst am C-terminalen Ende der GFP-Sequenz eingefügt. Die Kontrolle der fusionierten Gene erfolgte durch den konstitutiven, gewebeunabhängigen und stark exprimierenden Cauliflower-Mosaikvirus (CaMV)-35S-Promotor und einem Nopalinsynthase (NOS)-Terminator.

Zum Austausch der Leucinreste an den Positionen 8 und 9 in der Aminosäurekette von *MOT2* wurde das Plasmid *MOT2*-pGFP2 einer ortsgerichteten Mutagenese unterzogen. Dazu wurden die Primer *M2_L-A_fwd* und *M2_L-A_rev* verwendet. Diese bewirkten einen Austausch der Sequenz 5'-CTG CTC-3' durch 5'-GCG GCT-3' im *MOT2*-ORF. Daraus resultiert ein Aminosäureaustausch von LL zu AA an den Positionen 8 und 9 der Aminosäurekette von *MOT2*.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität

Um die Aktivität der Nitratreduktase zu bestimmen wurde eine Enzym-Aktivitätsbestimmung nach Smarelli und Campbell (1983) durchgeführt. Diese Aktivitätsbestimmung beruht darauf, dass NO_3^- durch die Nitratreduktase zu NO_2^- reduziert wird. Die Reduktionskraft für diese Reaktion erhält die Nitratreduktase aus der Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ . NO_2^- bildet dann zusammen mit Sulfanilamid und N-(1-Naphtyl)ethyldiamin Dihydrochlorid einen NO_2^- Farbkomplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 540 nm im Photometer gemessen. Hierbei handelt es sich um eine Endpunktbestimmung des entstandenen NO_2^- .

Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert, zu je 100 mg in Reaktionsgefäße abgewogen und in 400 μl Puffer A aufgenommen. Anschließend wurde bei 20.000g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. 120 μl des Überstandes wurden zur Bestimmung der Hintergrundabsorbtion verwendet. Hierzu wurden die Proben 3-5 min im Wasserbad aufgeköcht.

Die Durchführung des Assays verlief nach folgendem Schema:

Ansatz		Referenz	
425 μl	Puffer B	475 μl	vorgewärmt, 30°C
25 μl	NADH/ H^+	25 μl	
50 μl	Probe	-	Inkubationszeit: 5 min
250 μl	Puffer C	250 μl	Stop, vortexen
250 μl	Puffer D	250 μl	Färben, Inkubationszeit: 10 min

Anschließend wurden die Proben bei 540 nm im Photometer (SUV 2120, Scinco) gemessen. Bei der Auswertung wurde die Nitratreduktase-Aktivität auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

Puffer A

25 mM	KH_2PO_4
0,05 mM	EDTA
	pH 7,3

Puffer B

25 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	KNO ₃
0,05 mM	EDTA
	pH 7,3

NADH/H⁺

2 mM	β-NADH
	frisch herstellen

Puffer C

3 M	HCl
58 mM	Sulfanilamid

Puffer D

0,77 mM	N-(1-Naphtyl)ethylendiamin Dihydrochlorid
---------	----------------------------------------------

2.5.2 Bestimmung der Aktivität der Xanthindehydrogenase und der Aldehydoxidase

Zur Bestimmung der Xanthindehydrogenase (XDH)- sowie der Aldehydoxidase (AO)-Aktivität wurden sechs Wochen alte Rosettenblätter in 2 Vol Extraktionspuffer (100 mM KH₂PO₄, 2,5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,5) gemörsert, sonifiziert und anschließend zentrifugiert. 100 µg Gesamtprotein des resultierenden Überstandes wurden zur Aktivitätsbestimmung der XDH und AO in einem nativen 7,5% Acrylamidgel getrennt.

Die Aktivität der AO wurde durch Inkubieren des Gels in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5), 0,1 mM Phenazin-Methosulfat, 0,4 mM MTT und dem Substrat Benzaldehyd (1 mM) bestimmt.

Die Aktivität der XDH wurde durch Inkubieren des Gels in 1 mM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid; 0,1 mM Phenazin Methosulfat, 250 mM Tris/HCl (pH 8,5) und dem Substrat Hypoxanthin (1 mM) bestimmt.

2.5.3 Bestimmung der Aktivität der Sulfitoxidase

Zur Bestimmung der Sulfitoxidase (SO)-Aktivität wurden sechs Wochen alte Rosettenblätter gemörsert und in 400 µl 0,1 M Trisacetat (pH 7,25) pro 100 µg Pflanzenmaterial aufgenommen, sonifiziert und anschließend zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Proteine durch schrittweise Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung präzipitiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl 0,1 M Trisacetat (pH 7,25) resuspendiert und über Sephadex G-50 Säulen entsalzt. Die Bestimmung der SO-Aktivität erfolgte durch Bestimmung des Sulfitumsatzes mittels OH⁻-vermittelter Fuchsin-Entfärbung nach Pachmayr, 1960.

2.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Unter Verwendung von Coomassie-Brillant-Blue G-250 wird nach Zugabe der zu bestimmenden Proteinlösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm die Absorption in einem Eppendorf Bio-Photometer (Hamburg) gemessen. Zuvor wurde ein Aliquot der Proteinlösung auf 500 µl H₂O aufgefüllt und mit 500 µl Bradford-Farbreagenz versetzt. Gemessen wurde in 1 ml Küvetten der Firma Sarstedt (Nümbrecht).

Als Abgleich diente eine Probe bestehend aus 500 µl H₂O und 500 µl Bradford-Farbreagenz. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden definierte Mengen von Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

Bradford-Farbreagenz

50 mg	Coomassie-Brillant-Blue G250, gelöst in
10 ml	Ethanol (p.a.)
175 ml	<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85%)
ad 825 ml	H ₂ O

2.5.5 Heterologe Expression in *E. coli*

Zur Erzeugung eines polyklonalen Antikörperserums gegen den MOT1 bzw. MOT2 muss das Protein zunächst rekombinant erzeugt und gereinigt werden. Dazu wurde das Gen über NdeI und BamHI, unter Verwendung der Primer M1Expr_fwd und M1Expr_rev (MOT1) sowie M2Expr_fwd M2Expr_rev (MOT2), in den Expressionsvektor pET16b (beide Novagen Heidelberg) kloniert und in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Merck, Darmstadt) transformiert. Der verwendete Stamm wird im Folgenden als Rosetta bezeichnet. Der Vorteil ist, dass ein Plasmid-kodiertes Gen kontrolliert exprimiert werden kann. Der Stamm beinhaltet dazu im Genom ein T7-Polymerase-Gen des Bakteriophagen DE3, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Allerdings wird die Transkription der T7-Polymerase verhindert, da ein konstitutiv exprimierter lac-Repressor an den Promotorbereich des lacUV5-Promotors bindet. Erst nach Zugabe von IPTG kann die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert werden, da dieses das Binden des lac-Repressors an den Promotorbereich von lacUV5 verhindert, so dass die *E. coli* eigene RNA-Polymerase die Transkription der T7-RNA-Polymerase beginnen kann. Die nun exprimierte T7-RNA-Polymerase bindet wiederum an einen T7-Promotor, welcher der MCS („multiple cloning site“) des Expressionsvektors pET16b vorgeschaltet ist. Hierdurch erfolgt nun die Transkription der in diesem Klonierungsbereich eingebrachten Zielsequenz. Nun kann die Translation an den *E. coli* eigenen Ribosomen erfolgen. Es wurde eine Vornachtkultur bei 37°C in YT-Medium unter Selektionsbedingungen für 10 bis 12 Stunde angezogen und im Anschluss zum Beimpfen von sterilem TB-Medium in Kulturkolben mit Schikanen (zur besseren aeroben Anzucht) im Verhältnis 1:100 genutzt. Die Induktion der heterologen Expression erfolgte während der linearen Wachstumsphase der Bakterien bei einer OD600 = 0,5 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach der durch Testexpressionen ermittelten idealen Inkubationsdauer bei 37°C und 180 rpm auf einem Schüttler wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 5000g und 4°C geerntet.

2.5.6 Aufschluss von *E. coli*-Zellen zur Isolierung von Membranen

Zur Reinigung von integrierten, rekombinanten Membranproteinen wurden zunächst wie im obigen Abschnitt beschrieben, Zellen in TB-Vollmedium 1:100 aus einer YT-Vorkultur angeimpft und kultiviert. Die sedimentierten Zellen wurden direkt im

Anschluss in einer ausreichenden Menge Aufschlusspuffermedium gründlich resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Die gefrorenen Zellen wurden zur weiteren Verarbeitung zunächst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend nach Zugabe von PMSF (Endkonzentration 1 mM), 1 µg/ml DNase sowie 1 µg/ml RNase unter permanenter Kühlung im Eiswasserbad sonifiziert. Die Sonifikation erfolgte mittels eines Ultraschallstabs (Bioblock Scientific, Danbury, USA) bei höchster Stufe und 50% Pulsdauer. In einem folgendem Zentrifugationsschritt (20000g, 10 min, 4°C) wurden grobe Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert. Diese wurden erneut resuspendiert und nochmals sonifiziert. Im Überstand verbliebene Membranen konnten in einem sich anschließenden Ultrazentrifugationsschritt (100000g, 30 min, 4°C) sedimentiert werden. Diese Membranen wurden bis zur Solubilisierung der Proteine bei -20°C gelagert.

Aufschlusspuffer

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
15% (v/v)	Glycerin
	pH 7,5

2.5.7 Solubilisierung und Reinigung von Membranproteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Wie oben beschrieben wurden rekombinante *E. coli*-Zellen zur heterologen Synthese von Membranproteinen angezogen und nach der Ernte aufgeschlossen, um daraus Membranen zu isolieren.

Die Reinigung integrierter Membranproteine mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ist aufgrund der Tatsache möglich, dass die rekombinanten Proteine eine N-terminale oder C-terminale Sequenzerweiterung in Form eines Histidin-Tags besitzen.

Für die Reinigung der in dieser Arbeit synthetisierten Proteine wurde „Ni Sepharose 6 Fast Flow“ (GE Healthcare, München) verwendet. Das Prinzip dieser Reinigungsmethode beruht darauf, dass die immobilisierten Nickel-Ionen an die Imidazolgruppen des Histidin-Tags binden können. Da Imidazol selbst wiederum stark an Nickelionen bindet, ist es zum einen möglich, durch aufsteigende Imidazol-Konzentrationen schwach gebundene Proteine von der Matrix zu waschen, während

stärkere Bindungen zum His-Tag des zu reinigenden Proteins erhalten bleiben. Ausreichend hohe Konzentration an Imidazol verdrängen auch die starken Bindungen von poly-Histidin-Motiven an die Nickelionen.

Die bei -20°C gelagerten Membranen wurden zur Reinigung zunächst auf Eis aufgetaut, danach mit LS-Bindepuffer versetzt und per Ultraschall (Bioblock Scientific, Danbury, USA) bei höchster Stufe und 50% Pulsdauer resuspendiert. Zu dieser Membranemulsion wurde anschließend ein Detergens gegeben und unter Rühren, je nach Menge der eingesetzten Membranen, für 30 bis 60 Minuten bei 4°C inkubiert (Probe R1). Anschließend folgte ein Ultrazentrifugationsschritt (100000g, 30 min 4°C) bei dem nicht solubilisierte Proteine und Lipide sedimentiert wurden. Die gelösten Proteine und Lipide verblieben im Überstand (R2). Diesem Überstand wurde dann, je nach Expressionslevel des zu reinigenden Proteins, „Ni Sepharose 6 Fast Flow“ (optimale Bindekapazität: 5-10 mg Protein/ ml Ni-Sepharose) zugegeben und für mindestens 1 h unter Rühren bei 4°C inkubiert. Die Trennung der an die Ni-Sepharose gebundenen Proteine von den im Überstand verbliebenen Proteinen (D) erfolgte über eine Säule mit Fritte („Econo-Pac-Chromatography-Column“) der Firma Bio-Rad (München). Schwach gebundene Proteine wurden mit 10 Volumen (Volumen Ni-Sepharose) LS-Bindepuffer (W1) und 6 Volumen LS-Waschpuffer (W2) entfernt. Die Elution erfolgte mit dem zweifachen Volumen LS-Elutionspuffer (E). Alle Puffermedien der Reinigung enthielten entsprechende Detergenskonzentrationen. Von allen Fraktionen der Reinigung (R1, R2 D, W1, W2 und E) wurden Proben genommen und deren Proteine durch SDS-Gelelektrophorese getrennt.

LS-Bindepuffer

10 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
50 mM	Phosphat-Puffer pH 7,9

LS-Waschpuffer

10 mM	NaCl
60 mM	Imidazol
50 mM	Phosphat-Puffer pH 7,9

LS-Elutionspuffer

10 mM	NaCl
500 mM	Imidazol
50 mM	Phosphat-Puffer pH 7,9

Im Anschluss an die Reinigung konnte das Eluat aus der Affinitätschromatographie mit einer „Amicon Ultra“ Filter-Einheit (Millipore, Schwalbach) konzentriert werden. Dabei handelt es sich um Zellulose-Filter mit einer Porengröße von 100 kDa, durch die der Puffer der Elution durch Zentrifugation für 20 min bei 4000g und 4°C hindurchtrat, während das gereinigte Protein zurückgehalten wurde.

2.5.8 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteingemischen wurde unter denaturierenden Bedingungen durch Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in den vertikalen „Mini-Protean 3“ Elektrophorese-Systemen (Bio-Rad, München) wobei die Gel-Größe 8 cm x 8 cm x 0,75 mm betrug und die Laufkammer mit einfach konzentriertem Laufpuffermedium gefüllt war. Es wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 3% im Sammelgel und 12% im Trenngel verwendet.

Die Gele liefen im Sammelgel zunächst bei 100 V konstanter Spannung, nach dem Einlaufen in das Trenngel wurde die anliegende Spannung auf bis zu 200 V erhöht. Zur Vorbereitung der verschiedenen Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese mit sechsfach konzentriertem SDS-Gelladepuffermedium versetzt.

Zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse der aufgetrennten Proteine wurde als Referenz ein „Prestained Protein Marker Broad Range (6 -175 kDa)“ der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) aufgetragen.

Sammelgel

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

Trenngel

12% (w/v)	Acrylamid
0,44% (w/v)	Bisacrylamid
300 mM	Tris-HCl
0,08% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	TEMED
0,05% (w/v)	APS
	pH 8,8

SDS-Laufpuffer

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

SDS-Ladepuffer (6-fach)

0,375 M	Tris-HCl
60% (v/v)	Glycerin
0,3% (w/v)	SDS
1,5% (w/v)	Bromphenolblau
	pH 6,8

Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einer Färbelösung basierend auf dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue R-250 eine Stunde lang angefärbt. Dann wurde das Gel so lange in Entfärbelösung inkubiert, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren.

Färbelösung

0,4% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blue R-250
9% (v/v)	Essigsäure
45% (v/v)	Ethanol

Entfärbelösung

9% (v/v)	Essigsäure
45% (v/v)	Ethanol

2.5.9 Western-Blot und Immunfärbung

Nach Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE, wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran (BioTrace NT; Darmstadt) mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Dies geschah im „Wet-Blotting“-Verfahren in einem Mini-Tank Elektrobloetter Modell VEP der Firma Peqlab (Erlangen). Die Proteine wurden bei 400 mA eine Stunde in Transferpuffermedium auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden durch Inkubation des Blots in TBS-Puffermedium mit 3% BSA (w/v) nicht mit Protein benetzte Bereiche der Membran abgesättigt. Dies erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Nachweis des durch heterologe Expression gebildeten Proteins erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen anti-poly-Histidin-Antikörpers (Firma Sigma Aldrich, Deisenhofen). Dieser IgG-Antikörper ist gegen Epitope mit mehr als fünf Histidinen gerichtet und wurde 1:10000 in TBS-Puffermedium mit 3% BSA (w/v) eingesetzt. Alternativ kam das Präimmenserum bzw. das Serum der finalen Blutung jeweils 1/100 in TBS/BSA zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte bei RT für mindestens 2 Stunden.

Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3 Waschschrte (10 min in TBS-, 10 min in TBST-, und 10 min TBS-Puffermedium) entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper (Konzentration 1:10000 in TBS mit 3% (w/v) BSA), bei dem es sich um einen Anti-Maus-IgG handelte (Sigma Aldrich, Deisenhofen). Zum Test der Antikörperseren kam ein entsprechendes Anti-Kaninchen IgG (Sigma Aldrich, Deisenhofen) zum Einsatz. Zusätzlich ist dieser Antikörper mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert (Blake *et al.*, 1984). Dieser Antikörper erkennt den primären Antikörper und ermöglicht dadurch den Nachweis des rekombinanten Proteins. Nach mindestens einstündiger Inkubation wurde überschüssiger Antikörper wie oben beschrieben von der Membran gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Inkubation in AP-

Puffermedium, dem NBT und BCIP zugesetzt wurden, welche ein Substrat für die Alkalische Phosphatase darstellen. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag, gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettcs Präzipitat. Die zunächst nur schwach gelbe Entwicklerlösung führt überall dort, wo die Alkalische Phosphatase an die Proteine gebunden ist, zu einer blauviolettcs Färbung. Die Reaktion wurde sofort nach dem Erscheinen von Banden durch Zugabe von Wasser abgestoppt.

Transfer-Puffer

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

TBS-Puffer

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
	pH 7,5

TBST-Puffer

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

AP-Puffer

100 mM	Tris-HCl
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
	pH 9,5

2.6 Ionenchromatographische und spektroskopische Analysen

2.6.1 Anionen-Messung mittels Ionenchromatographie

Die Probenaufbereitung zur Anionen-Messung erfolgte nach Buchner *et al.* (2004). Hierzu wurden die zu messenden Proben in flüssigem Stickstoff gemörsert, zu je 100 mg in Reaktionsgefäßen abgewogen und anschließend wieder in flüssigem Stickstoff weggefroren. Danach wurde das Homogenisat in 1 ml deionisiertem Wasser aufgenommen, kurz gevortext und für 10 min in kochendes Wasser gegeben um alle enzymatischen Vorgänge zu stoppen. Es folgte eine Sedimentation der übrigen Zelltrümmer (20.000g, 20 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Probe in einer 1:10 Verdünnung für die ionenchromatographischen Messungen eingesetzt.

Bei der Ionenchromatographie macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass Metabolite an polare feste Adsorbentien je nach Art und Größe verschieden stark binden können. Die Adsorbentien, die dabei die stationäre Phase darstellen, kommen entweder als Anion- oder Kationenaustauscher, meist auf der Basis eines Polymermaterials, vor. Die jeweilige Ladung der Adsorbentien wird durch Gegenionen ausgeglichen. Bei der Durchführung wird die Probe mit hohem Druck (hier: 5-6 MPa) über die Chromatographiesäule gepumpt. Zur Elution der Metabolite werden verschiedene Elektrolyte (mobile Phase) verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität der Metabolite zur Säule, liegen dabei unterschiedliche Retentionszeiten vor. Durch diese unterschiedlichen Retentionszeiten werden die Metabolite getrennt und deren Leitfähigkeit nacheinander detektiert.

Gerät/Parameter	Spezifizierung
Anlage	761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz)
Säule	Metrosep A Supp1-250 (Methrom, Schweiz)
Flussrate	1 ml/min
Laufmittel	4 mM NaHCO ₃ + 1 mM Na ₂ CO ₃
Gegenionen	50 mM H ₂ SO ₄
Druck	5 MPa
Temperatur	32°C

2.6.2 Molybdat-Messungen

Das für die Messungen verwendete Pflanzenmaterial wurde vor der Aufbereitung lyophilisiert. Die Proben wurden mit HNO_3 (65%, v/v) im Mikrowellenofen extrahiert. Hierzu wurde ein Temperaturgradient verwendet mit einer Maximaltemperatur von 210°C. Dieser Verdau wurde, wenn nötig, mit Millipore- H_2O verdünnt, filtriert und mittels ICP-OES (= Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) analysiert. Diese Methode macht sich die Eigenschaft der Elemente zu nutze, dass Atome aus einem induktiv gekoppelten Plasma (im speziellen Argon) Energie aufnehmen können, dabei angeregt werden und unter Abgabe einer charakteristischen Strahlung wieder in ihren Grundzustand zurückfallen. Die Identifizierung dieser Strahlung ermöglicht die qualitative Analyse einer Probe. Die quantitative Bestimmung erfolgt auf der Grundlage der Proportionalität von Strahlungsintensität und Elementkonzentration in Eich- und Analyseproben. Das verwendete Gerät war ein ICP-OES Spectrometer aus der iCAP 6000 Series (Thermo, Dreieich). Molybdat wurde bei 202,030 nm und bei 204,598 nm nachgewiesen. Zur Quantifizierung wurde das Signal bei 202,030 nm verwendet, wobei die Nachweisgrenze für Molybdat ungefähr bei 0,1 $\mu\text{g/l}$ lag.

2.6.3 HPLC-Nachweis von Intermediaten der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese

Die Intermediate, die mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden sollen, sind Molybdopterin (MPT) und der Moco.

Da sowohl MPT als auch der Moco selbst durch ihr Pteringerüst und die Dithiolengruppe oxidationssensitiv sind, können sie nur durch ihr stabiles Derivat, FormA, detektiert werden. FormA kann aus Moco oder aus seiner direkten Vorstufe MPT durch saure Oxidation generiert werden. Eine Unterscheidung beider Substanzen mittels FormA-Analyse ist daher nicht möglich. Da Fluoreszenzmessungen extrem sensitiv sind und mit ihnen auch geringe Mengen (pmol-Bereich) bestimmter Substanzen detektiert werden können, eignet sich diese Methode gut zur Detektion der stark fluoreszierenden Oxidationsprodukte.

Durch die saure Oxidation mit I_2/KI überführt man Moco bzw. MPT in das stabile Produkt FormA.

300 mg gemörseretes Pflanzenmaterial wurden mit 500 µl 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,2 homogenisiert und mit 5 Stößen sonifiziert (80% Intervall, Intensitätsstufe 2,5). Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 15000 rpm, 4°C) und der Überstand als Rohextrakt abgenommen. Je 400 µl Proteinlösung wurden mit 50 µl frischer Oxidationslösung versetzt. Die Oxidation erfolgte über Nacht bei RT und zusätzlich noch für 30 min bei 95°C. Anschließend wurden ausgefallene Proteine und andere Niederschläge durch 5-minütige Zentrifugation bei 15000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 56 µl einer frisch angesetzten 1%igen Ascorbinsäurelösung (w/v) versetzt, wodurch überschüssiges Jod reduziert wurde. Durch Zugabe von 200 µl 1M Tris (ungepuffert) wurde der pH-Wert auf etwa 8,3 angehoben, so dass die nachfolgende Alkalische Phosphatase (AP)-Reaktion ablaufen kann. Zusätzlich wurden dem Ansatz 13 µl 1M MgCl₂ zugegeben. Zu jedem Ansatz wurden 0,5 µl AP gegeben. Die nachfolgende Dephosphorylierung sollte mindestens 45 min im Dunkeln bei RT ablaufen. Die AP-behandelte Probe wurde 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird abgenommen.

Um die gewonnenen Oxidationsprodukte von MPT bzw. Moco weiter zu reinigen und voneinander zu trennen, wird eine isokratische Anionenaustauscherchromatografie vorgenommen. Das verwendete Matrixmaterial ist eine QAE-Sephadex A 25 Matrix (Sigma), die als starker Anionenaustauscher fungiert. Damit die Matrix nicht beschädigt oder die Säule verstopft wird, werden alle Lösungen zuvor filtriert. Die Matrix wird in 1M NaCl gequollen und in 1M NH₄Ac umgepuffert, um sie in ihre Acetat-Form zu bringen. Dann werden je 0,5 ml Matrixmaterial in geleerte Nick-Säulen gefüllt und mit einer oberen Fritte in gewässertem Zustand abgeschlossen.

Die Aufreinigung fand wie folgt statt: Die Matrix wurde 2x mit NH₄Ac gewaschen, um eventuelle Rückstände zu entfernen und sie vollständig in ihre Acetatform zu überführen. Die Säule wurde 2x mit filtriertem Aqua bidest. gespült. Anschließend erfolgt der Auftrag der Probe, die vollständig einsinken soll. Die Säule wurde erneut 1x mit filtriertem Aqua bidest. gespült. Die Elution von FormA wurde isokratisch mittels 10 mM filtrierter Essigsäure durchgeführt. Zunächst wurde ein Totvolumen von 300 µl auf die Säule gegeben. Nach Einsinken wurde gebundenes FormA mit 800 µl 10 mM Essigsäure eluiert. Die Probe ist nun bereit für die HPLC-Analyse und kann in Autosamplerflaschen überführt oder bei -70°C gelagert werden.

Die erhaltenen QAE-Eluate werden durch HPLC-Chromatografie an einer C18 Reverse Phase Säule an einer HPLC-Anlage des "Typs HP-Series 1100-HPLC" von

Agilent über ihre Fluoreszenz analysiert. Die genutzte HPLC-Pumpe ist mit einem Injektionsventil und einem Autosampler (beide mit einer 250 µl Probenschleife) ausgestattet. Der Fluoreszenz-Detektor wird mit höchster Empfindlichkeit betrieben und die Fluoreszenz vorhandener FormA-Bestandteile nach 370 nm Excitation bei 450 nm Emission gemessen. Die Flussrate beträgt 1 ml/min. Als Laufpuffer für die FormA-Analyse dient ein zuvor filtriertes Gemisch aus 5 mM NH₄Ac und 15% Methanol. Der Anteil von Methanol im isokratischen Fluss bestimmt die Retentionszeit von FormA, die bei etwa 6 min liegt. Durch diese Angaben erfolgt die qualitative Analyse der Probe. Die detektierte Fluoreszenz wird mit der Software "ChemStation for LC 3D" von Agilent aufgezeichnet. Die Fläche des Peaks bei 6 min bzw. 3-4 min kann durch Integration errechnet werden und dient ab einer Größe von 300 Flächeneinheiten (FE) zur quantitativen Analyse der Probe.

Von allen Proben der Rosettenblätter wurden jeweils 400 µl des oxidierten Extraktes auf die Säule gespritzt. Auf diese Weise konnte eine Berechnung der Flächeneinheiten auf die Proteinmenge vorgenommen werden. Die Proteinkonzentration wurde zuvor nach der Methode von Bradford bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von MOT1 und MOT2

Die Einordnung der physiologischen Funktion von Proteinen in den zellulären Kontext erfordert die Bestimmung ihrer jeweiligen subzellulären Lokalisierung. Man bedient sich hierbei der Methode der Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem ORF des „green fluorescent protein“ (GFP) aus *Aequorea victoria*. Dazu wird das Gen des zu untersuchenden Proteins ohne natives Stop-Codon mit Hilfe des Vektors „pGFP2“ vor das 5'-Ende des *GFP*-Gens kloniert. Als Resultat kann ein Fusionsprotein exprimiert werden, welches das GFP am C-Terminus des zu untersuchenden Proteins trägt (s. Abschnitt 2.4.3). Dies stellt eine gut etablierte Methode zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung dar (Emmerlich *et al.*, 2003; Wormit *et al.*, 2006).

In der wissenschaftlichen Diskussion wird die Glaubwürdigkeit der Resultate von GFP-basierten Lokalisierungsstudien allerdings mittlerweile öfter angezweifelt. So wurden in Abhängigkeit von der Position des GFP vor oder hinter dem zu untersuchenden Protein unterschiedliche Ergebnisse erzielt (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Hinsichtlich einer Publikation wird dementsprechend immer öfter eine alternative Methode zur Analyse der subzellulären Lokalisierung verlangt. Eine weitere Analyse der Lokalisierung *in situ* ist mittels „immunogold-labelling“ möglich. Hierzu werden Goldpartikel mit Antikörpern des zu untersuchenden Proteins konjugiert und im Gewebeschnitt mittels Rasterelektronen-Mikroskopie detektiert. Dies erfordert allerdings die Verfügbarkeit eines Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein.

3.1.1 Fluoreszenzanalysen der GFP-Fusionsproteine von MOT1 und MOT2

Zur Analyse wurden sowohl Zwiebelepidermiszellen (*Allium cepa*) als auch Arabidopsis-Protoplasten transformiert. Die Epidermen wurden mit Wolframpartikeln, an welche die DNA gebunden war, beschossen und das Fluoreszenzmuster der transienten Expression der Fusionsproteine lichtmikroskopisch unter Fluoreszenzlicht untersucht (s. Abschnitt 2.4.1).

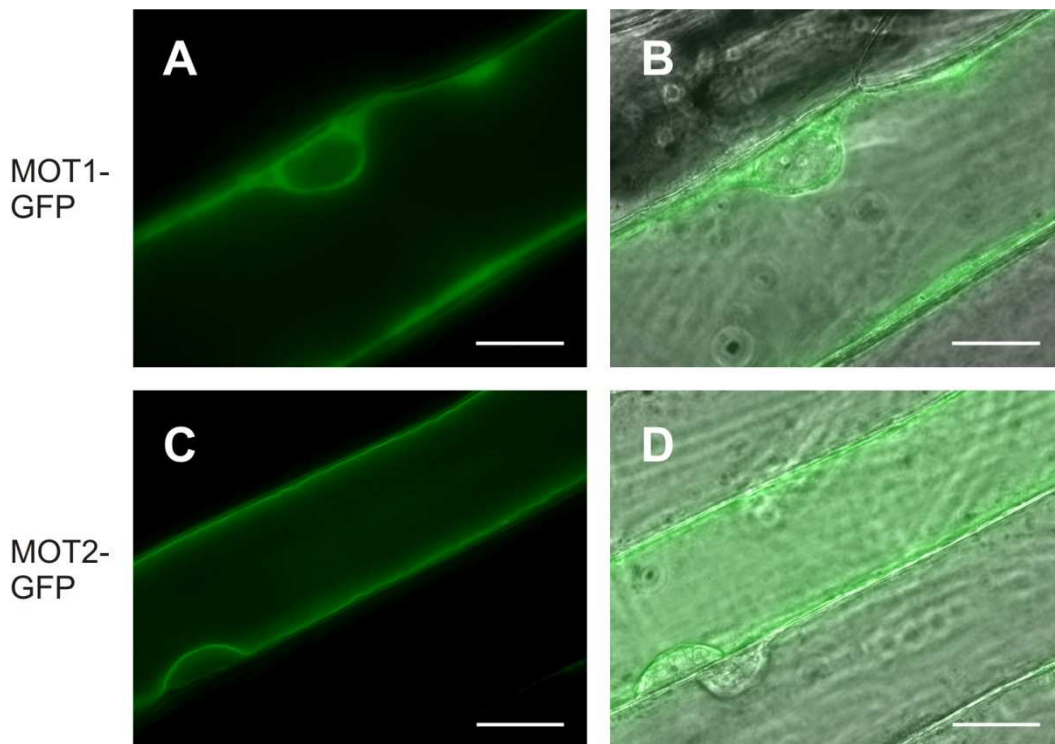


Abb. 3.1: Transiente Expression der GFP-Fusionsproteine MOT1-GFP und MOT2-GFP in Epidermiszellen von *A. cepa*

Die Zwiebelepidermiszellen wurden 40 Stunden nach der Transformation mit einem Lichtmikroskop unter Fluoreszenzlicht untersucht. Die GFP-Fluoreszenz von MOT1-GFP (A, B) und MOT2-GFP (C, D) ist sowohl allein (A, C), als auch als Überlagerung mit der jeweiligen Durchlichtaufnahme (B, D) dargestellt. Die Balken als Maßstab entsprechen 40 μm .

In Abb. 3.1 erkennt man, dass das Fluoreszenzmuster von MOT1-GFP diffus, aber gleichmäßig um den Zellkern der Epidermiszelle verteilt ist, wohingegen sich die Fluoreszenz des MOT2-GFP als diskrete Linie darstellt, welche den Zellkern von innen her umschließt.

Zur tieferen Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von MOT1 und MOT2 wurden zusätzlich Arabidopsis Protoplasten mit der DNA der Fusionsproteine chemisch transformiert. Die transiente Expression wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht und dokumentiert (s. Abschnitt 2.4.2).

In Abb 3.2 A erkennt man, dass das Fusionsprotein MOT1-GFP ein netzwerkartiges Fluoreszenzmuster im gesamten Protoplasten bildet, welches im Bereich um die Chloroplasten (Abb. 3.2 B) am dichtesten ist. Dieses Netzwerk deutet sehr auf eine Lokalisierung des MOT1 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) hin. Das Fusionsprotein MOT2-GFP zeigt ein anderes Muster auf. Hier verläuft die Fluoreszenz kreisförmig im Protoplasten (Abb. 3.2 D-F). Dieses Fluoreszenzmuster ist typisch für eine tonoplastidäre Lokalisierung besonders unter Berücksichtigung

der Chloroplasten, welche sich im cytosolischen Bereich zwischen Vakuole und Plasmamembran befinden. Man erkennt deutlich, dass die Fluoreszenz am inneren Rand der Chloroplasten verläuft (Abb. 3.2 E, Pfeil).

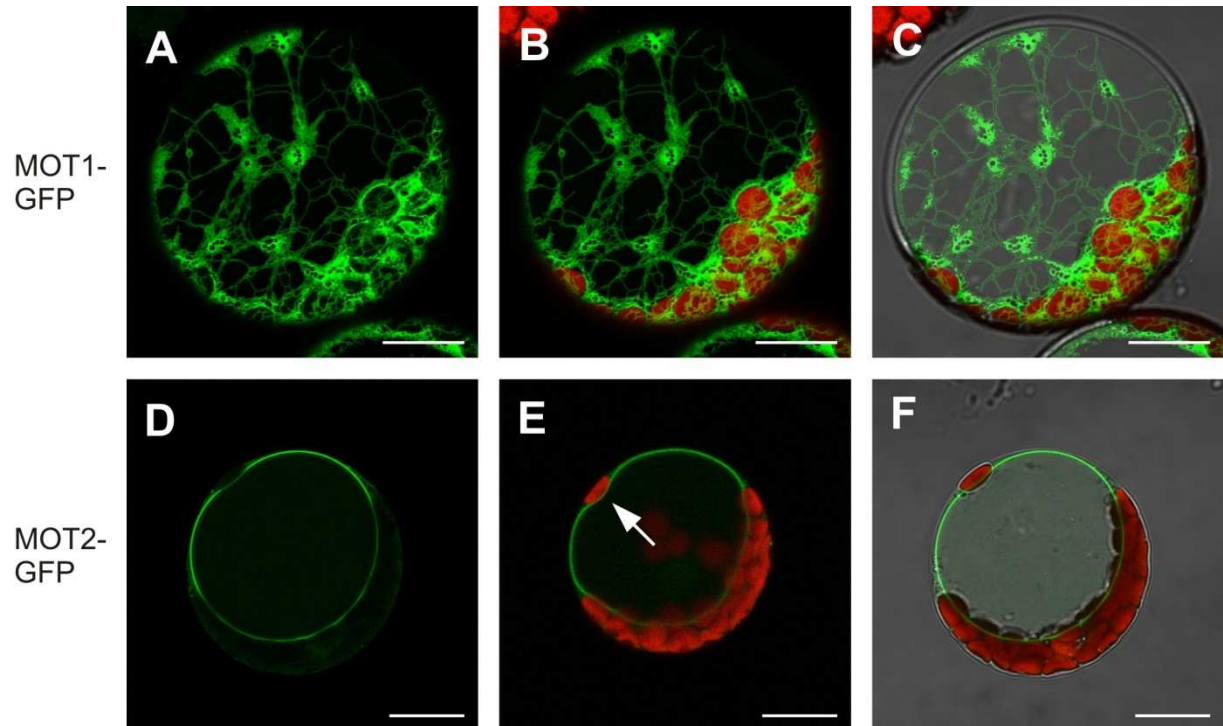


Abb. 3.2: Transiente Expression der GFP-Fusionsproteine MOT1-GFP und MOT2-GFP in Protoplasten von *A. thaliana*

Die Protoplasten wurden 48 Stunden nach der Transformation mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die GFP-Fluoreszenz von MOT1-GFP (A, B, C) und MOT2-GFP (D, E, F) ist sowohl allein (A, D), als auch als Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) (B, E), sowie der jeweiligen Durchlichtaufnahme (C, F) dargestellt. Die Balken als Maßstab entsprechen 15 μm .

Um die Vermutung der Lokalisierung des MOT1 im ER zu untermauern, wurde in Arabidopsis Protoplasten neben dem Fusionsprotein MOT1-GFP zusätzlich das mit mCherry fusionierte ER-ständige Protein CD3-959 koexprimiert. Bei letzterem handelt es sich um eine Kombination des Signalpeptids aus AtWAK2 und einem ER Retentionssignal am C-Terminus (Nelson *et al.*, 2007).

Man erkennt in Abb 3.3, dass die Fluoreszenzmuster von MOT1-GFP und CD3-959 (grün bzw. rot dargestellt) identisch sind. Das geht aus der Überlagerung der Fluoreszenzmuster beider Fusionsproteine (Abb. 3.3 C) deutlich hervor. Daher ist für MOT1 mit großer Wahrscheinlichkeit eine Lokalisierung in der Membran des endoplasmatischen Retikulums anzunehmen.

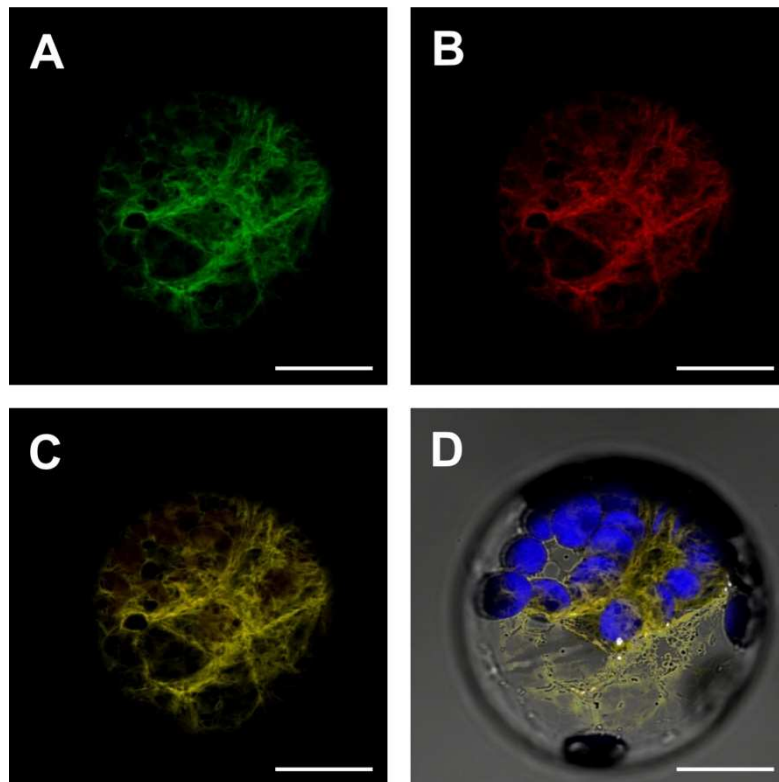


Abb. 3.3: Transiente Expression der Fusionsproteine MOT1-GFP und CD3-959-mCherry in Protoplasten von *A. thaliana*

Die Protoplasten wurden 48 Stunden nach der Transformation mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die Fluoreszenzmuster von MOT1-GFP (A) und CD3-959-mCherry (B) sind grün bzw. rot dargestellt, ihre Überlagerung gelb (C). Letztere ist außerdem als Überlagerung mit der Durchlichtaufnahme (D) dargestellt. Die Balken als Maßstab entsprechen 15 μm .

3.1.2 Untersuchung der Zielsteuerung von MOT2 zum Tonoplasten

Kürzlich wurde das N-terminale Aminosäuremotiv LxxxLL als Signal für die tonoplastidäre Lokalisierung von Membranproteinen entdeckt (Yamada *et al.*, 2010). Auch am N-terminalen Ende von MOT2 befinden sich zwei Leucinreste. Um die Bedeutung dieser Leucinreste für die subzelluläre Zielsteuerung von MOT2 zu untersuchen, wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese die Leucinreste gegen Alaninreste ausgetauscht (s. Abschnitt 2.4.3 und Abb. 3.4 A) und dieses Konstrukt (MOT2-MUT-GFP) in Arabidopsis Protoplasten transient exprimiert.

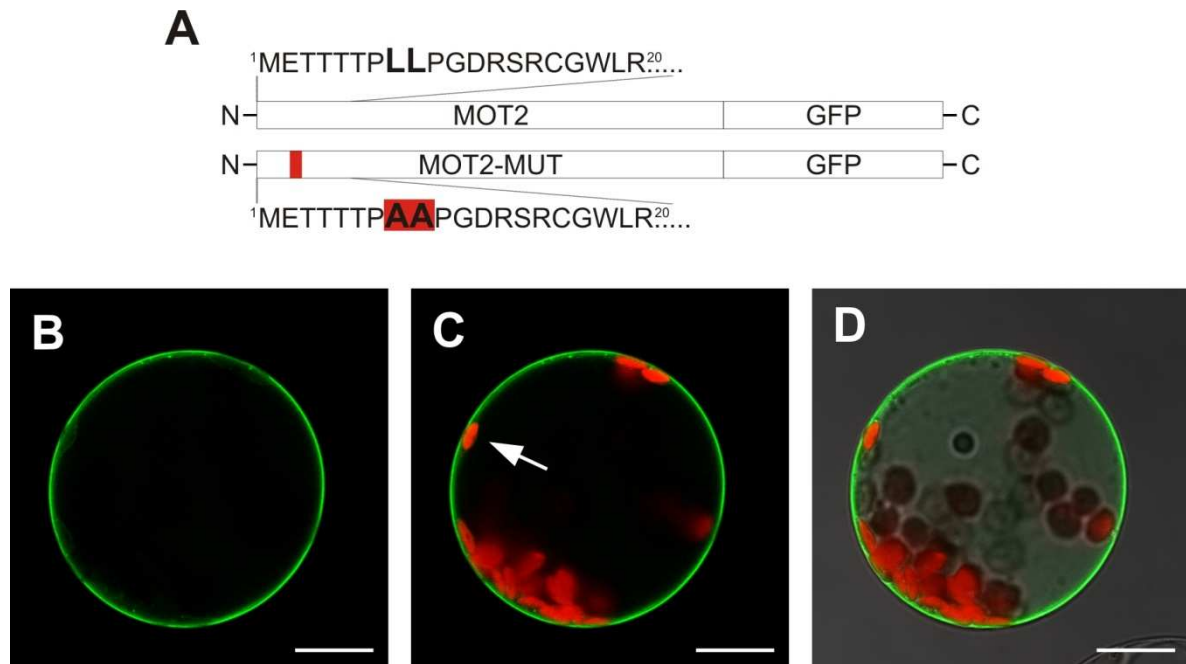


Abb. 3.4: Schema der ortsgerichteten Mutagenese, sowie transiente Expression des Fusionsproteins MOT2-MUT-GFP in Protoplasten von *A. thaliana*

In (A) ist der Austausch der beiden Leucinreste an den Positionen 8 und 9 der Aminosäuresequenz von MOT2 durch zwei Alaninreste schematisch dargestellt. Die Protoplasten in (B, C, D) wurden 48 Stunden nach der Transformation mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die GFP-Fluoreszenz von MOT2-MUT-GFP ist sowohl allein (B), als auch als Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) (C), sowie der Durchlichtaufnahme (D) dargestellt. Die Balken als Maßstab entsprechen 15 μm .

In Abb. 3.4 B-D sind die Aufnahmen eines MOT2-MUT-GFP exprimierenden Protoplasten dargestellt. Man erkennt ein kreisförmiges Fluoreszenzmuster, welches sich allerdings deutlich außerhalb der Chloroplasten bewegt (Abb. 3.4, Pfeil). Dieses Muster weist eindeutig auf eine Lokalisierung des mutagenisierten Fusionsproteins MOT2-MUT-GFP in der Plasmamembran, und nicht in der vakuolären Membran, hin.

3.1.3 Heterologe Expression von MOT1 und MOT2 zur Herstellung von Antikörpern

Die GFP-Analysen der entsprechenden Fusionsproteine ergaben eindeutige Ergebnisse bezüglich der subzellulären Lokalisierung von MOT1 und MOT2. Als unabhängiger Nachweis dieser Lokalisierungen bietet sich die Methode des „immunogold-labelling“ an. Hierzu ist es erforderlich, einen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein zu synthetisieren, um diesen später mit Goldpartikeln zu konjugieren.

Zunächst wurden die Proteine MOT1 und MOT2 heterolog in *E. coli* exprimiert. Diese Methode erlaubt es große Mengen eines Proteins in hoher Reinheit zu gewinnen

(Trentmann *et al.*, 2007). Hierzu werden am 5'-Ende des „open reading Frame“ (ORF) des Gens 10 Basentriplets, welche für die Aminosäure Histidin codieren, angefügt. Als Resultat dessen verfügt das Protein dann über einen sogenannten „His-Tag“, welcher die immunologische Identifikation, sowie die Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC), ermöglicht (s. Abschnitte 2.5.5 - 2.5.7).

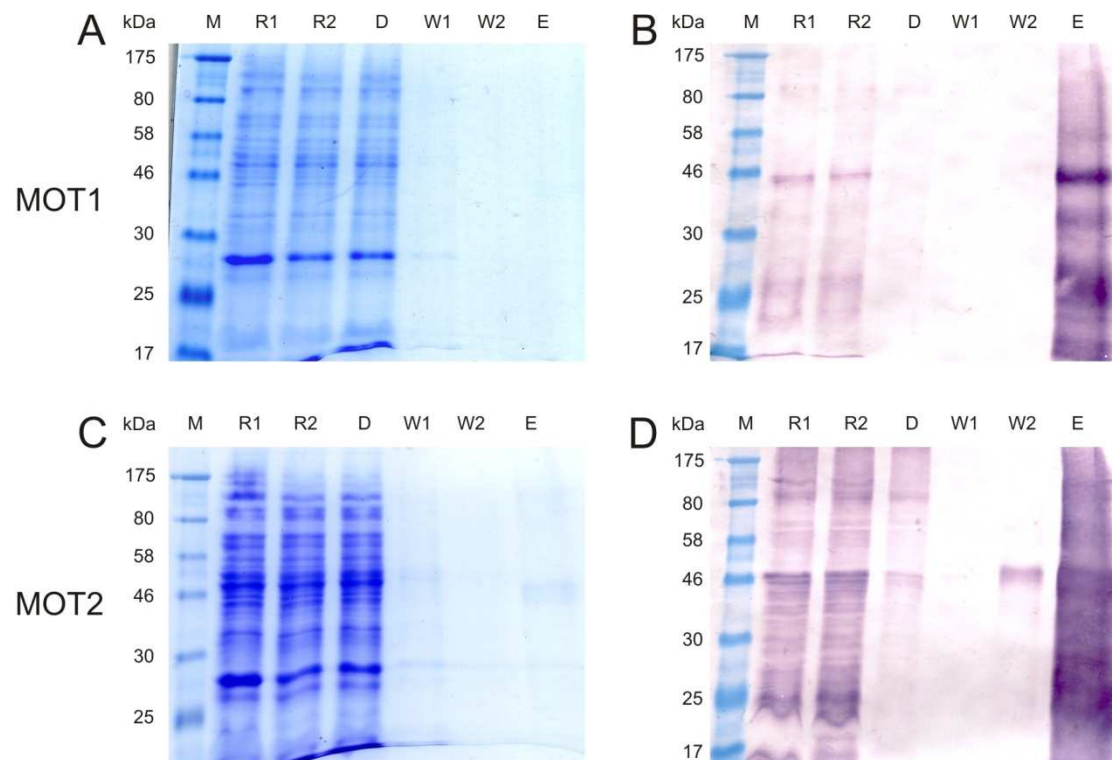


Abb. 3.5: Reinigung von MOT1 und MOT2 als rekombinante Proteine mit N-terminalem His-Tag

Reinigung von MOT1 und MOT2 mittels IMAC nach heterologer Expression der Proteine in *E. coli*-Rosetta Zellen. Die Proben wurden in 12%igen Acrylamidgelen getrennt und entweder mit Coomassie-Blau gefärbt (A und C) oder nach Transfer auf Nitrozellulose-Membranen mittels His-Tag-Antikörper immungefärbt (B und D). Die Spuren wurden wie folgt beladen: M: Marker, R1 Rohextrakt vor und R2 Rohextrakt nach Solubilisierung mit 70 mM NLS und Ultrazentrifugation, D: Durchfluss, W1: Wachpuffer (10 mM Imidazol), W2: Waschpuffer (60 mM Imidazol), E: Elutionspuffer (500 mM Imidazol). Von den Fraktionen R1, R2 und D sind jeweils 15 μ l und von den Proben W1, W2 und E jeweils 25 μ l aufgetragen. Der Marker (M) ist mit Größenangaben der Referenzproteine in kDa dargestellt. Methodische Details sind in den Abschnitten 2.5.5 bis 2.5.9 aufgeführt.

Wie in Abb. 3.5 zu erkennen ist, war die heterologe Expression beider Proteine, sowie deren Reinigung mittels IMAC, erfolgreich. MOT1 ist nach der Reinigung im Eluat nur mit dem His-Tag spezifischen Antikörper nach Immunfärbung auf dem Western Blot zu detektieren (Abb 3.5 B), nicht aber nach Gelfärbung mit Coomassie-Blau (Abb 3.5 A). Das rekombinante Protein mit His-Tag hat ein Molekulargewicht von 50,9 kDa und läuft im Gel auf einer Höhe von ca. 44 kDa. Bei MOT2 ist die

Expression etwas stärker, das Protein ist bereits nach Gelfärbung mit Coomassie-Blau detektierbar (Abb. 3.5 C). Nach der wesentlich sensitiveren Methode der Immunfärbung ist im Eluat eine große Bande etwas oberhalb von 45 kDa detektierbar. Das rekombinante MOT2-Protein mit His-Tag hat ein Molekulargewicht von 52 kDa. Die geringen Unterschiede zwischen dem theoretischen und dem apparenten Molekulargewicht beruhen auf der Trennung von Proteinen im SDS-Acrylamidgel. Bei dieser Methode weisen Membranproteine andere Laufeigenschaften auf als lösliche Proteine, welche als Marker eingesetzt wurden. So scheint das apparente Molekulargewicht der hydrophoben Membranproteine stets etwas geringer als das tatsächliche Molekulargewicht.

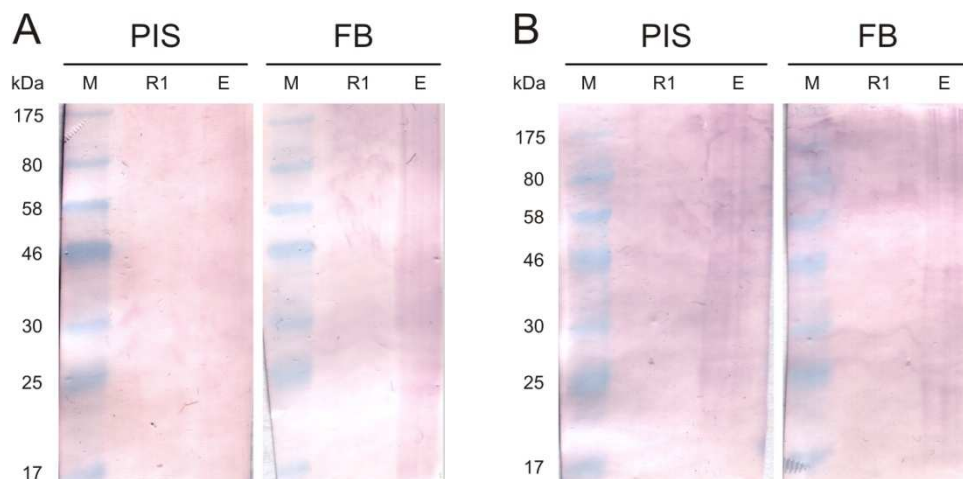


Abb 3.6: Test der jeweils gegen MOT1 und MOT2 gerichteten polyklonalen Antikörperseren

Test der Antikörperseren gegen MOT1 (A) und MOT2 (B). Es wurde neben dem Marker (M) jeweils 15 μ l Rohextrakt 1 (R1) und 25 μ l Eluat (E) aus den Reinigungen von MOT1 (A) und MOT2 (B) aufgetragen. Die Western-Blots wurden entweder im Präimmunserum (PIS) oder im Serum der Finalen Blutung (FB) inkubiert (jeweils 1:100 in TBS/BSA). Die Immunfärbung erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase, welche mit dem, gegen Kaninchenantigene gerichteten, sekundären Antikörper konjugiert ist. Der Marker (M) ist mit Größenangaben der Referenzproteine in kDa dargestellt. Methodische Details sind in den Abschnitten 2.5.5 bis 2.5.9 aufgeführt.

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörperserums sowohl gegen MOT1 als auch MOT2 wurde jeweils 400 μ g des gereinigten Proteins zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Es wurden pro Antigen zwei Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) immunisiert. Zum Test der gewonnenen Antikörperseren wurden die Antigene auf Western-Blots transferiert und jeweils mit dem Serum vor (Präimmunserum) und nach (Finale Blutung) der Immunisierung inkubiert. Als sekundärer Antikörper fungiert ein gegen Kaninchen-Antigene gerichteter Antikörper. Dieser ist mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert, welche die Farbreaktion zur

Auswertung der Western-Blots ermöglicht. Im Folgenden sind die Untersuchungen der Seren von jeweils nur einem Kaninchen pro Antigen dargestellt.

Die polyklonalen Antikörperseren führen weder im Fall von MOT1 noch von MOT2 (Abb 3.6 A bzw. B) zu einer immunologischen Detektion des jeweiligen Antigens. Diese charakterisiert sich durch die immunologische Reaktion mit dem rekombinanten Protein. Diese müsste sich als Bande auf der Höhe von etwa 46 kDa darstellen, wenn als primärer Antikörper das Serum der finalen Blutung (FB) herangezogen wird.

Da mittels der polyklonalen Antikörperseren keine Detektion des entsprechenden Antigens möglich war, wurde des Weiteren damit begonnen, einen monoklonalen Antikörper zu gewinnen. Dazu wird ebenfalls ein Kaninchen mit dem rekombinanten Protein immunisiert, anschließend aber einige Milzzellen entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Die dadurch entstehenden Hybridoma-Zelllinien enthalten jeweils nur Antikörper gegen ein Epitop (monoklonal) und können diese uneingeschränkt sezernieren. Diese Vorteile monoklonaler Antikörper bedingen allerdings auch größeren Aufwand bezüglich der Herstellung. Daher wurde zunächst nur MOT1 als Antigen eingesetzt. Um den gesundheitsschädigenden Aspekt des Detergenz bei der Injektion des Kaninchens zu reduzieren, wurde das Reinigungsprotokoll geändert. Statt die Solubilisierung des rekombinanten MOT1 in allen Reinigungspuffern durch NLS zu gewährleisten, enthielt der Elutionspuffer das milde Detergenz DDM (1%).

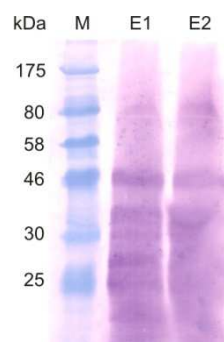


Abb 3.7: Reinigung von MOT1 als rekombinantes Protein mit N-terminalem His-Tag

Immunfärbung der Nitrozellulosemembran mittels His-Tag-Antikörper. Elution von MOT1 nach oben dargestellter Reinigung (Abb 3.5) mit DDM (1%) als Detergenz in Elutionspuffer 1 (E1) und anschließend NLS (70 mM) als Detergenz in Elutionspuffer 2 (E2). Der Marker (M) ist mit Größenangaben der Referenzproteine in kDa dargestellt. Methodische Details sind in den Abschnitten 2.5.5 bis 2.5.9 aufgeführt.

Die Elution von MOT1, nach Expression in *E. coli*-Rosetta Zellen und Reinigung mittels IMAC, durch DDM-haltigen Elutionspuffer war erfolgreich (Abb. 3.7). Dies zeigt die dominierende Proteinbande in der Spur E1 bei etwa 46 kDa. Dieses Eluat wurde wegen des besser verträglichen DDM zur Injektion des Kaninchens verwendet. Zurzeit stehen die Selektion der Hybridomalinien und deren anschließender Antikörpertest noch aus. Dazu steht Antigen aus einer zweiten Elution (Abb. 3.7, E2) mit NLS-haltigem Elutionspuffer bereit.

3.2 Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien mit Insertionen im MOT1-, MOT2- oder beiden Genen

Zur Untersuchung der Bedeutung von Proteinen für den Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* bietet sich die Analyse von „Knock Out“- (KO)-Mutanten an, deren Genom eine T-DNA-Insertion im Gen des Proteins von Interesse aufweist. Liegt die Insertion im offenen Leseraster des Gens, so führt dies zu einer Deletion der Aktivität des Proteins und der Phänotyp der entsprechenden KO-Pflanze erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins. Für die Proteine MOT1 und MOT2 wurden entsprechende T-DNA-Linien (mot1 und mot2) bereits in der Doktorarbeit von Ingmar Feifer charakterisiert (s. Tab. 2.1, Feifer, 2008). Innerhalb dieser Arbeit gelang es, die beiden Linien zu kreuzen und eine sogenannte „Doppelmutante“ mit Insertionen sowohl im MOT1-, als auch im MOT2-Gen (mot1,2) zu generieren. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der physiologischen Analysen der Pflanzenlinien mot1, mot2 und mot1,2 beschrieben.

3.2.1 Auswirkung molybdatfreier Anzucht auf das Wachstum der KO-Linien mot1, mot2 und mot1,2

Da Pflanzen der KO-Linien bei Anzucht unter Standardbedingungen auf Erde keinerlei sichtbaren Wachstumsphänotyp zeigten, wurde das Wachstum von Keimlingen in Flüssigkultur untersucht. Diese etablierte Methode der Hydrokultivierung von Pflanzen erlaubt eine exakte Kontrolle der Nährstoffverfügbarkeit während des Wachstums der Pflanzen (Abschnitt 2.2.2, Scheible *et al.*, 2004). So kann die Entwicklung des Keimlings in molybdathaltigem Vollmedium mit dem in molybdatfreiem Medium verglichen werden.

In Abb. 3.8 sind 10 Tage alte Keimlinge der KO-Linien *mot1*, *mot2*, sowie der Doppelmutante *mot1,2* im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen dargestellt. Alle Linien wurden sowohl in molybdathaltigem (+Mo) als auch in molybdatfreiem (-Mo) Medium angezogen.



Abb. 3.8: Wachstumsanalyse von Wt-, *mot1*-, *mot2*- und *mot1,2*-Keimlingen

Die Pflanzen wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt entweder 75 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (+Mo) oder kein Molybdat (-Mo). Die Balken als Maßstab entsprechen 2 mm.

Man erkennt in Abb. 3.8, dass das Wachstum der Pflanzen auf Vollmedium (+Mo) bei allen Linien gleich ist. In molybdatfreiem Medium (-Mo) zeigt die Linie *mot2* keine phänotypische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp, aber das Wachstum der Linien *mot1* und *mot1,2* ist retardiert.

Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden das Frischgewicht und der Chlorophyllgehalt der Linien unter den beiden Wachstumsbedingungen ermittelt (Abb.3.9). Die Quantifizierung des unterschiedlichen Wachstums bestätigt den morphologischen Phänotyp in Abb. 3.8. Man erkennt, dass die Keimlinge aller vier Genotypen bei Anzucht in Vollmedium (+Mo) sowohl beim Frischgewicht (zwischen 0,71 und 0,84 g) als auch beim Chlorophyllgehalt (zwischen 0,12 und 0,14 mg/g FW) kaum Unterschiede aufweisen. Auch zeigen Wt- und *mot2*-Keimlinge bei molybdatfreier Anzucht (-Mo) keine deutliche Reduktion des Frischgewichts (Abb. 3.9 A) und nur geringe Reduktion im Chlorophyllgehalt (0,093 bzw. 0,097 mg/g FW). Hingegen zeigen sowohl *mot1*- als auch *mot1,2*-Keimlinge (0,61 bzw 0,54 mg/g FW) einen etwa um die Hälfte verminderten Chlorophyllgehalt (Abb. 3.9 B) im Vergleich zu molybdathaltiger Anzucht. Im Frischgewicht letzterer beider Linien schlägt sich zusätzlich das verlangsamte Wachstum nieder (Abb 3.9 A). Bei molybdatfreier Anzucht reduziert sich das Frischgewicht der *mot1*-Keimlinge um 28% (0,6 g), das

der mot1,2-Keimlinge sogar um 58% (0,29 g) gegenüber der Anzucht im Vollmedium (+Mo).

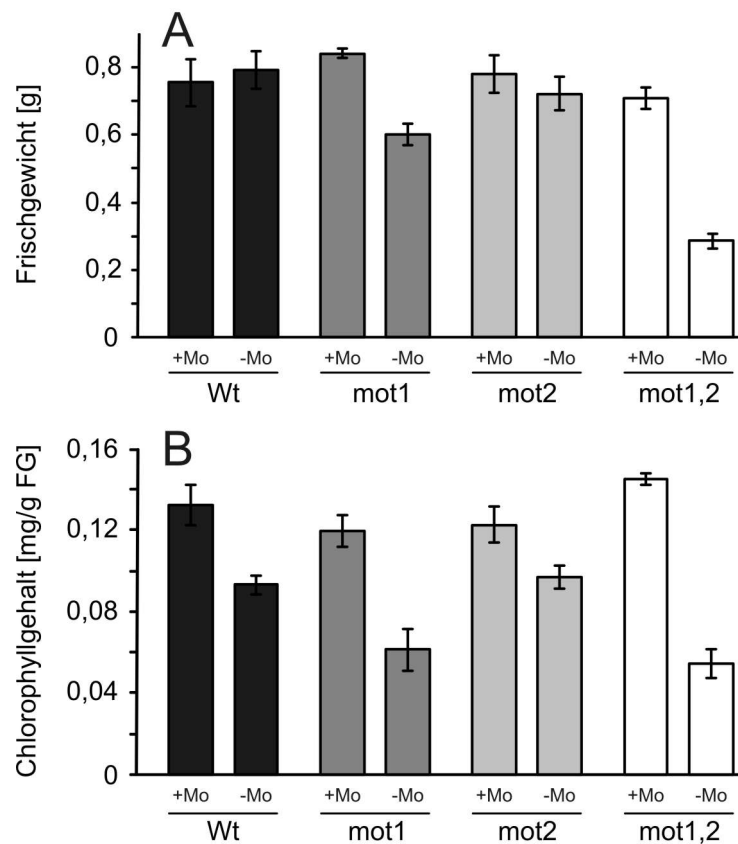


Abb. 3.9: Frischgewicht und Chlorophyllgehalt von Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Keimlingen

Die Pflanzen wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt entweder 75 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (+Mo) oder kein Molybdat (-Mo). Das Frischgewicht (A) wurde von jeweils 100 Keimlingen gemessen, der Chlorophyllgehalt (B) ist in Relation zum Frischgewicht gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei jeweils n=5 dar.

3.3 Molybdatgehalte in Wt- und KO-Pflanzen

3.3.1 Molybdatgehalte in verschiedenen Geweben

Die Beobachtung des Wachstumsphänotyps der mot1 KO-Linie, sowie der Doppelmutante mot1,2 impliziert eine Rolle zumindest von MOT1 im Molybdatmetabolismus von Arabidopsis. Somit ist es von Interesse, die Molybdatgehalte verschiedener Gewebe von Wt-Pflanzen und Pflanzen der KO-Linien mot1, mot2, sowie der Doppelmutante mot1,2 zu untersuchen. Die geringen Mengen an Molybdat in einer Pflanze schließen allerdings den Einsatz chromatographischer Methoden zur Messung der Gehalte aus. Eine besonders

exakte Applikation zur Quantifizierung von Elementen geringer Abundanz stellt die „inductively coupled plasma optical emission spectrometry“ (ICP-OES) dar (s. Abschnitt 2.6.2). Dabei werden die Elemente einer Probe in einem Argon-Plasma ionisiert und die dabei freiwerdenden optischen Emissionsspektren quantifiziert.

Im Folgenden sind die Molybdänmessungen verschiedener Gewebetypen dargestellt, die Pflanzen wurden hierzu auf Erde angezogen.

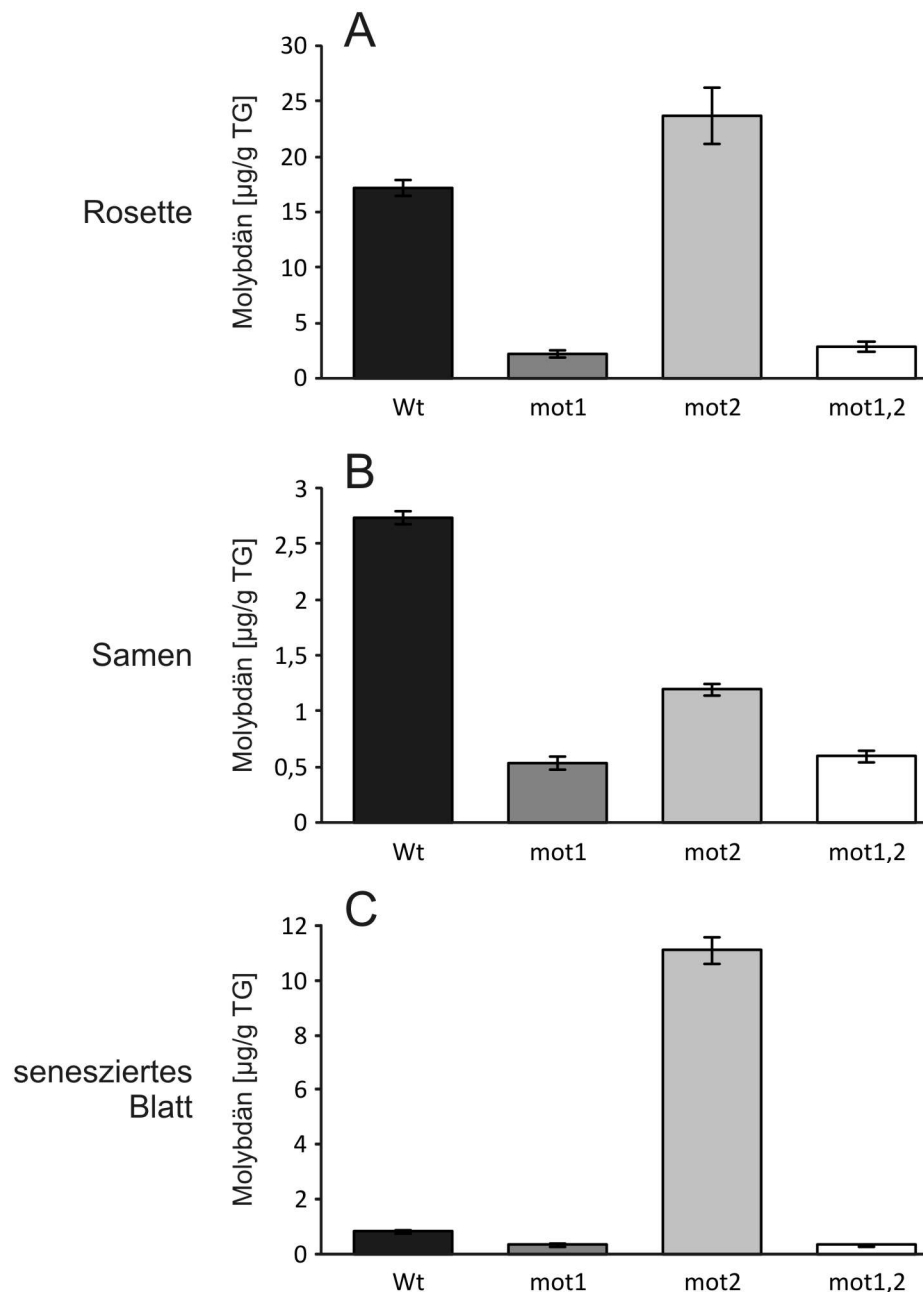


Abb. 3.10: Molybdängehalte von Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Pflanzen

Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Mittels ICP-OES wurde der Molybdängehalt lyophilisierter Proben von sechs Wochen alten ganzen Rosetten (A), Samen (B) und seneszierten Blättern von Pflanzen, deren Lebenszyklus vollendet war (C), bestimmt. Die Molybdängehalte der Proben sind in Relation zum Trockengewicht (TG) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei $n=3$ (A, B) oder $n=4$ (C) dar.

In verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* weisen die KO-Linien *mot1* und *mot2*, sowie die Doppelmutante *mot1,2* Molybdängehalte auf, die sich stark von Wildtyp-Pflanzen unterscheiden. In Rosetten von Wt-Pflanzen beträgt der Molybdängehalt 17,2 µg/g TG, in Rosetten von Pflanzen der KO-Linie *mot1* und der Doppelmutante ist dieser auf 13% reduziert (Abb. 3.10 A). Dahingegen weisen *mot2*-Rosetten mit 23,8 µg/g TG sogar einen erhöhten Molybdängehalt auf. Diese Erhöhung hält einer statistischen Überprüfung mittels T-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,066 stand.

Bei Molybdängehalten in Samen zeichnet sich ein anderes Bild ab (Abb. 3.10 B). Auch hier sind die Gehalte von *mot1*- und *mot1,2*-Samen im Vergleich zum Wildtyp (2,7 µg/g TG) auf etwa 20% reduziert. Im Gegensatz zu den erhöhten Werten in Rosetten (Abb. 3.10 A) sind die Molybdängehalte in *mot2*-Samen aber mit 1,2 µg/g TG um mehr als die Hälfte reduziert (Abb. 3.10 B). Dieser Sachverhalt spricht für eine gestörte Mobilisierung von Molybdän aus den Blättern zur Versorgung sich entwickelnder Samen.

Um diese These zu belegen wurden die Molybdängehalte in Blättern von Pflanzen bestimmt, bei welchen der Vorgang der Samenbildung, und damit der Mobilisierung von Nährstoffen und Mineralien, komplett abgeschlossen war (Abb. 3.10 C). Hierbei liegen die Werte in seneszierten Wt-Blättern bei 0,86 µg/g TG und in den seneszierten Blättern von *mot1*- und *mot1,2*-Pflanzen bei 0,36 µg/g TG bzw. 0,34 µg/g TG. Im großen Gegensatz dazu enthalten Blätter komplett seneszierter *mot2*-Pflanzen 11,1 µg/g TG Molybdän.

3.3.2 Molybdätgehalte in Vakuolen

Die Gesamtmolybdängehalte verschiedener Gewebe von *mot1*-, *mot2*-, sowie *mot1,2*-Pflanzen weisen Unterschiede zu Wildtyppflanzen auf. Unter Berücksichtigung dessen und der subzellulären Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine von MOT1 und MOT2 im ER bzw. der Vakuolenmembran ist die Analyse der intrazellulären Molybdätverteilung von Interesse. Die Isolierung von Vakuolen aus *Arabidopsis thaliana* mittels Zentrifugation in einem Ficoll-Gradienten stellt allerdings eine äußerst diffizile Methode dar. Problematisch ist neben der geringen Ausbeute an Vakuolen auch deren Verunreinigung durch andere Organellen, hauptsächlich Chloroplasten. Nach Optimierung der Methode ist es nun möglich, aus Blättern drei Wochen alter Pflanzen intakte Vakuolen von hohem

Reinheitsgrad zu isolieren. Diese wurden mittels ICP-OES auf ihren Molybdängehalt untersucht und die jeweiligen Proben auf die Aktivität von α -Mannosidase, einem vakuolären Markerenzym, bezogen.

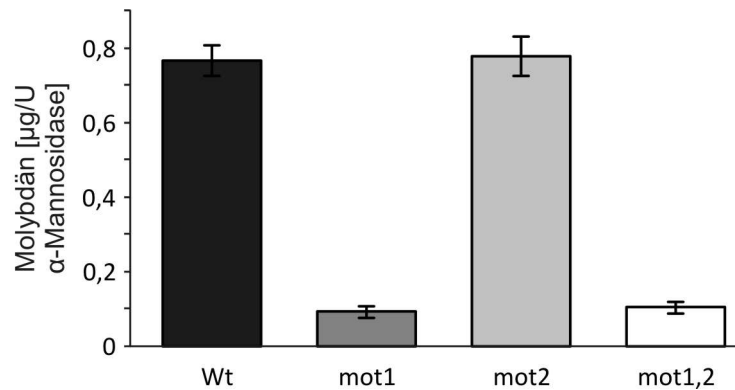


Abb. 3.11: Vakuoläre Molybdängehalte von Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Pflanzen

Die Vakuolen wurden aus drei Wochen alten Pflanzen isoliert. Mittels ICP-OES wurde der Molybdängehalt der Vakuolenfraktion bestimmt und auf die Aktivität des vakuolären Markerenzym α -Mannosidase bezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei n=4 dar.

In Abb. 3.11 erkennt man, dass die Vakuolen von Wildtyp- und mot2-Pflanzen mit jeweils um 0,77 $\mu\text{g}/\text{U}$ α -Mannosidase gleiche Mengen Molybdän enthalten. Deutlich reduziert ist dagegen der Gehalt an Molybdän in Vakuolen der Pflanzen mot1 und der Doppelmutante mot1,2 (Abb. 3.11). Hier ließen sich Werte von 0,09 und 0,11 $\mu\text{g}/\text{U}$ α -Mannosidase bestimmen. Letztere Linien zeigen somit eine Reduktion an vakuolärem Molybdän um Faktor 7 im Vergleich zum Wildtyp.

3.3.3 Identifikation der T-DNA-Insertion im ORF des *MOT2*-Gens als Ursache für den Phänotypen der KO-Linie mot2

Die Insertion von T-DNA-Elementen in das Genom von *Arabidopsis thaliana* stellt eine etablierte Methode des „knock-out“ (KO), also des Ausschaltens, von Genen dar. Nach Identifikation des Ortes der Insertion ins Genom können diese Insertionslinien zur Bestimmung der physiologischen Funktion des kodierten Proteins herangezogen werden. In etwa 50% der Fälle weisen diese Insertionslinien allerdings multiple T-DNA-Insertionen auf. Es muss also sichergestellt sein, dass der beobachtete Phänotyp einer Insertionslinie nicht auf der Insertion abseits vom „gene of interest“ basiert. Im Fall der KO-Linie mot1 (SALK_118311) wurde der Nachweis über eine unabhängige T-DNA Insertionslinie (SALK_069683) geführt (Tomatsu *et al.*, 2007). Für die KO-Linie mot2 (SALK_015044) war dies nicht möglich, da die

unabhängige Insertionslinie GABI_856F09 mit T-DNA-Insertion im Promotor-Bereich des *MOT2*-Gens keinen Phänotyp zeigt. Daher wurde die T-DNA-Insertionslinie *mot2* durch Wiedereinführung des intakten *MOT2*-Gens komplementiert (s. Abschnitt 2.2).

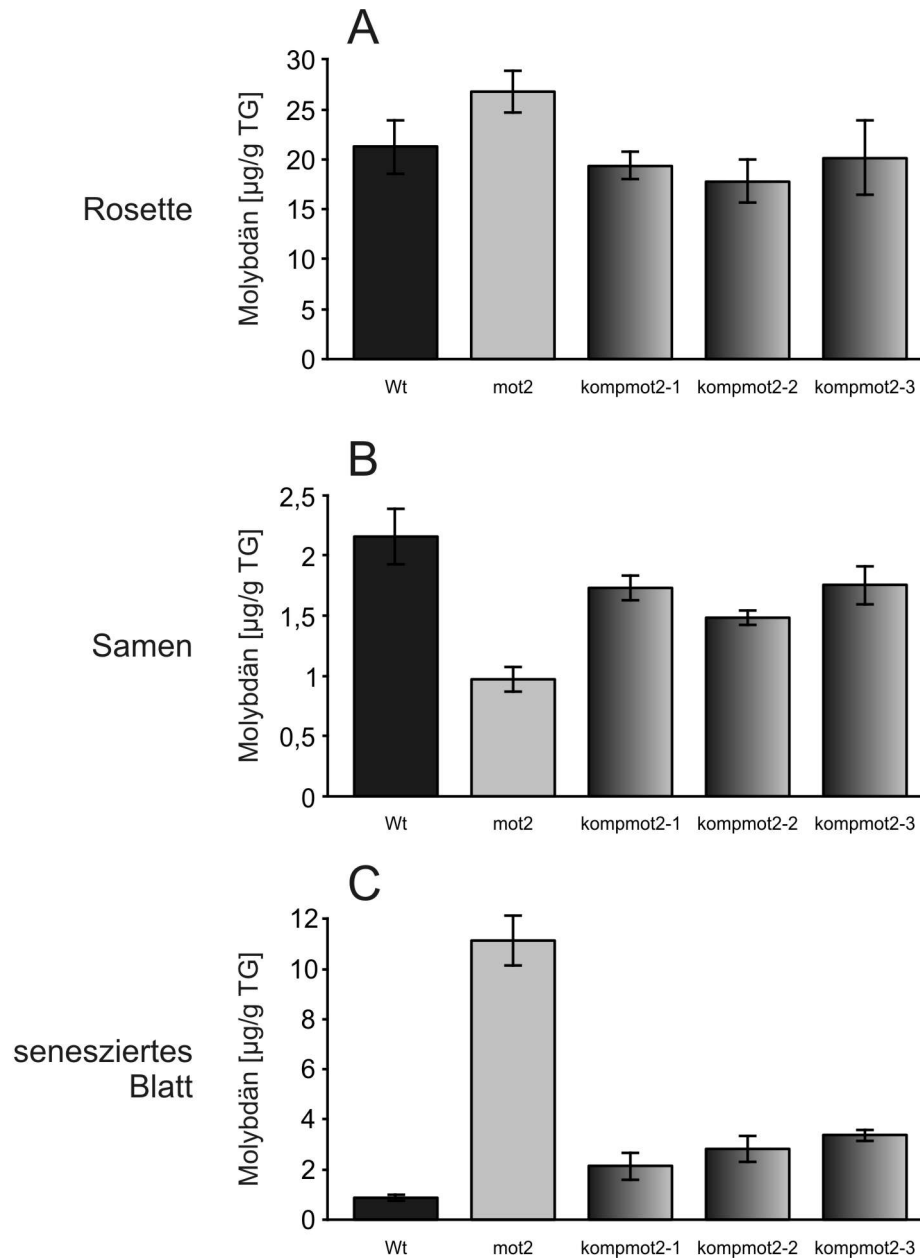


Abb 3.12: Molybdängehalte von Wt-, *mot2*- und *kompmot2*-Pflanzen

Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Mittels ICP-OES wurde der Molybdängehalt lyophilisierter Proben von sechs Wochen alten ganzen Rosetten (A), Samen (B) und seneszierten Blättern von Pflanzen, deren Lebenszyklus vollendet war (C), bestimmt. Die Molybdängehalte der Proben sind in Relation zum Trockengewicht (TG) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei $n=3$ (A) oder $n=4$ (B,C) dar.

Eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps mit Hilfe der Komplementation beweist die Kausalität des Phänotyps der *mot2*-Linie aufgrund der Insertion der T-

DNA im Gen *MOT2*. Im Zuge dessen wurden die Molybdängehalte dreier unabhängiger Komplementationslinien bestimmt.

In den untersuchten Geweben weisen die drei unabhängigen Komplementationslinien ähnliche Molybdängehalte wie der Wildtyp auf. So enthalten die Komplementationslinien *kompmot2-1*, *kompmot2-2* und *kompmot2-3* mit 17,7 bis 20,1 µg/g TG weniger Molybdän als *mot2*-Pflanzen im sechs Wochen alten Blatt (Abb. 3.12 A). Die Samen der Komplementationslinien weisen hingegen mit 1,5 bis 1,75 µg/g TG höhere Molybdängehalte als *mot2*-Samen auf (Abb. 3.12 B). Im seneszierten Blatt ist mit 2,1 bis 3,4 µg/g TG deutlich weniger Molybdän als in der *mot2*-Linie zu detektieren (Abb. 3.12 C). Die Komplementation stellt in Rosettenblättern, Samen und seneszierten Blättern nahezu die Molybdängehalte des Wildtyps wieder her, was die Spezifität des Phänotyps der *mot2*-Linie bestätigt.

3.4 Auswirkungen des veränderten Molybdatmetabolismus der KO-Linien auf molybdataabhängige Enzyme

In Pflanzen sind derzeit vier Enzyme bekannt, deren Aktivität von dem molybdatahaltigen Kofaktor Moco abhängt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Nitratreduktase (NR), Aldehydoxidase (AO), Xanthindehydrogenase (XD) und Sulfinoxidase (SO). Aufgrund der veränderten Molybdatgehalte in den KO-Linien und der Wachstumsdefizite in Flüssigkultur ist eine Beeinflussung der Aktivitäten der Moco-abhängigen Enzyme möglich. Daher sind im Folgenden die Untersuchungen dieser Aktivitäten in Wildtyp- und KO-Pflanzen dargestellt.

3.4.1 Nitratreduktase

Von den pflanzlichen Enzymen, die Molybdat in Form des Kofaktors Moco zur Funktionalität benötigen, stellt die Nitratreduktase das mit Abstand bedeutendste Enzym hinsichtlich des Primärmetabolismus von *Arabidopsis* dar. Es katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und nimmt somit eine Schlüsselposition in der Nitratassimilation ein.

Der Einfluss des veränderten Molybdatmetabolismus der KO-Linien *mot1*, *mot2* und *mot1,2* auf die Aktivität der NR wurde nach Anzucht in Flüssigkultur analysiert. Wieder wurden die Keimlinge sowohl in molybdatahaltigem Vollmedium (+Mo) als auch in molybdatafreiem Medium (-Mo) angezogen. Zunächst wurde mittels

Ionenchromatographie das Anionenspektrum der Pflanzen untersucht. Darin ist der Gehalt an Nitrat, dem Substrat der NR, von besonderem Interesse.

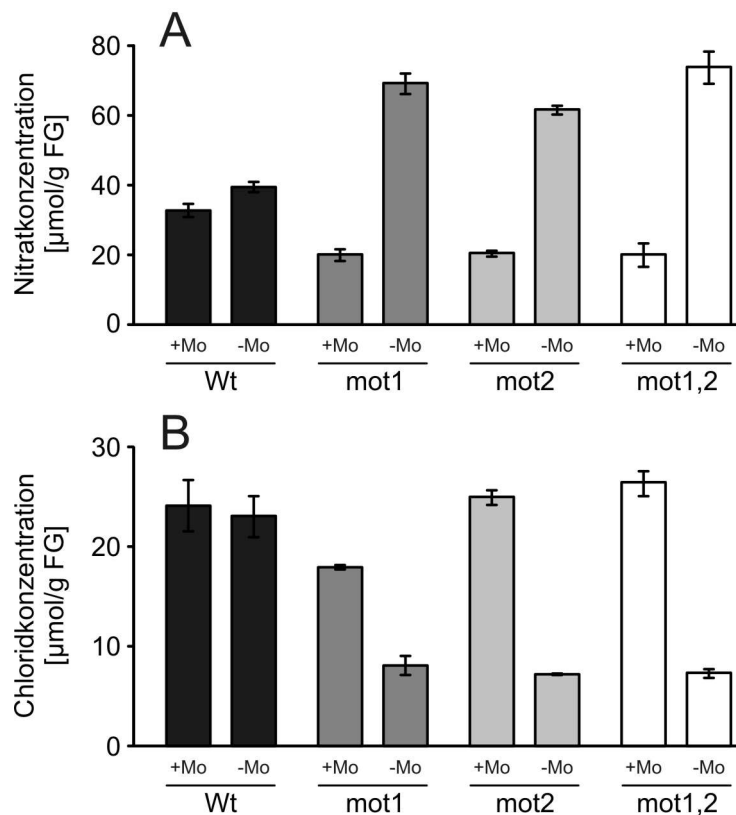


Abb. 3.13: Anionenkonzentrationen von Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Keimlingen

Die Pflanzen wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt entweder 75 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (+Mo) oder kein Molybdat (-Mo). Die Anionen NO_3^- (A) und Cl^- (B) wurden ionenchromatographisch durch eine Anionensäule getrennt, aufgrund ihrer Leitfähigkeit quantifiziert und in Relation zum Frischgewicht (FG) dargestellt. Methodische Details sind im Abschnitt 2.6.1 aufgeführt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei jeweils $n=3$ dar.

Unterschiede im Nitratgehalt bei Anzucht mit (+Mo) oder ohne (-Mo) Molybdat treten bei allen KO-Linien auf, jedoch kaum bei Wt-Keimlingen (Abb. 3.13 A). Einer Steigerung des Nitratgehalts von 33 auf 39,7 $\mu\text{mol/g}$ FG im Wt stehen Steigerungen um 200 - 260% in den KO-Linien entgegen. Auch der direkte Vergleich von mot1-, mot2- und mot1,2-Keimlingen (69,4; 61,6 bzw. 73,9 $\mu\text{mol/g}$ FG) unter molybdatfreien Bedingungen (-Mo) mit Wt-Keimlingen (39,7 $\mu\text{mol/g}$ FG) zeigt nahezu eine Verdopplung der Nitratkonzentration (Abb. 3.13 A). Bei Anzucht im Vollmedium (+Mo) sind die Nitratgehalte der KO-Linien deutlich niedriger, sogar reduziert gegenüber dem Wildtyp.

Die Phosphat- und Sulfatgehalte weisen keine Unterschiede zwischen den getesteten Pflanzenlinien und Anzuchtbedingungen auf. Bei den Chloridkonzentrationen konnten allerdings dem Nitrat gegenläufige Tendenzen beobachtet

werden (Abb 3.13 B). So enthalten *mot1*-, *mot2*- und *mot1,2*-Keimlinge bei molybdatfreier Anzucht mit 8,1, 7,2, bzw. 7,3 $\mu\text{mol/g}$ FG nur etwa 30% der Chloridmenge des Wildtyps (23 $\mu\text{mol/g}$ FG). Beim Wachstum in Gegenwart von Molybdat ist dies nicht zu beobachten.

Der starke Anstau von Nitrat in den KO-Linien deutet auf eine reduzierte Nitratreduktase-Aktivität hin. Die Messung dieser Aktivität ist mit einem photometrischen Test möglich, bei dem die Menge an Nitrit, dem Produkt der NR, quantifiziert wird. So wurde die NR-Aktivität der Keimlinge unter den oben beschriebenen Bedingungen untersucht.

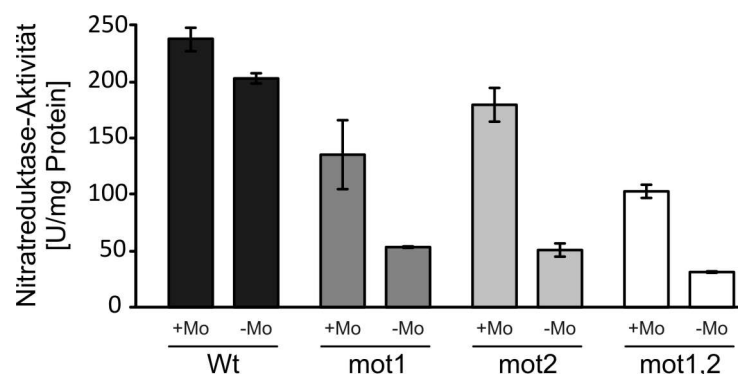


Abb. 3.14: Aktivität der Nitratreduktase von Wt-, *mot1*-, *mot2*- und *mot1,2*-Keimlingen

Die Pflanzen wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt entweder 75 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (+Mo) oder kein Molybdat (-Mo). Die Messung der Aktivität ist in Abschnitt 2.5.1 ausführlich beschrieben. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei jeweils $n=3$ dar.

Wie in Abb. 3.14 zu erkennen ist, liegt die Aktivität der Nitratreduktase unter Wachstum im Vollmedium in *mot2*-Keimlingen bei 180 U/mg Protein und in *mot1*- und *mot1,2*-Keimlingen bei 136 bzw. 104 U/mg Protein. Die Aktivität im Wildtyp ist mit 238 U/mg Protein höher. Deutlich stärker ist die Reduktion der Nitratreduktase-Aktivität allerdings beim Wachstum der KO-Linien in molybdatfreiem Medium (-Mo). In diesem Fall liegt die Aktivität in Wt-Keimlingen bei 204 U/mg Protein, bei *mot1*- und *mot2*-Keimlingen jedoch nur bei 52 bzw. 54 U/mg Protein, was einer Reduktion auf 25% entspricht (Abb. 3.14). Noch stärker ist die Reduktion auf 16% der Wt-Aktivität in *mot1,2*-Keimlingen (32 U/mg Protein).

Um den Einfluss transkriptioneller Regulation der Nitratreduktase auszuschließen wurde die Expression des Gens *NR1* mittels Northern-Blot untersucht.

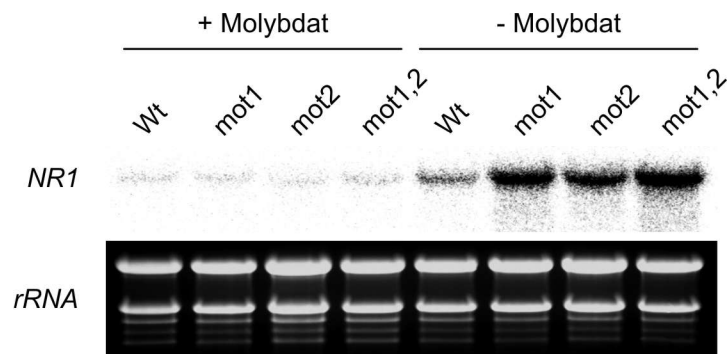


Abb. 3.15: Untersuchung des Transkriptgehalts von *NR1*-mRNA in Wt-, *mot1*-, *mot2*- und *mot1,2*-Keimlingen

Die Pflanzen wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt entweder 75 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (+ Molybdat) oder kein Molybdat (- Molybdat). Nach Transfer (Northern-Blot) wurden die Membranen mit einer ^{32}P -markierten Sonde inkubiert. Die Basensequenz der Sonde war komplementär zur *NR1*-Sequenz. Als Beladungskontrolle ist die korrespondierende UV-Aufnahme der durch Ethidiumbromid gefärbten ribosomalen RNA (rRNA) dargestellt.

Die Analyse des Transkriptgehalts der Nitratreduktase in Keimlingen (Abb. 3.15) zeigt, dass die Expression bei Anzucht in Vollmedium (+ Molybdat) sehr schwach ist und keine Unterschiede zwischen Wt- und KO-Pflanzen aufweist. Bei Anzucht in molybdatfreiem Medium (Abb. 3.15, - Molybdat) sind hingegen deutliche Unterschiede zu erkennen. Keimlinge der *mot2*-Linie zeigen eine Steigerung des Nitratreduktase-Transkriptgehalts gegenüber Wt-Keimlingen und in *mot1*-, sowie *mot1,2*-Keimlingen ist diese Steigerung noch stärker ausgeprägt. Auch beim Vergleich der Anzuchtbedingungen der jeweiligen Linien erkennt man Unterschiede zwischen den KO-Linien und dem Wildtyp. So ist die Erhöhung des Transkriptgehalts in Wt-Keimlingen unter molybdatfreier Anzucht deutlich geringer als in den Keimlingen der drei KO-Linien (Abb. 3.15).

Die bisher dargestellten Analysen zur Aktivität der Nitratreduktase bezogen sich auf Keimlinge, angezogen in Flüssigkultur. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zeigten sich phänotypische Wachstumsunterschiede der KO-Linien *mot1* und *mot1,2* nur unter molybdatfreier Anzucht (Abb. 3.8 und 3.9). Während der Anzucht auf Erde, wo der Pflanze Molybdat im Überschuss zur Verfügung steht, bleiben Wachstumsunterschiede aus. Allerdings sind die Molybdatgehalte dieser Pflanzen im Vergleich zu Wt-Pflanzen stark reduziert (Abb. 3.10). Es wurde daher die Aktivität der Nitratreduktase in Rosettenblättern von auf Erde angezogenen Pflanzen untersucht.

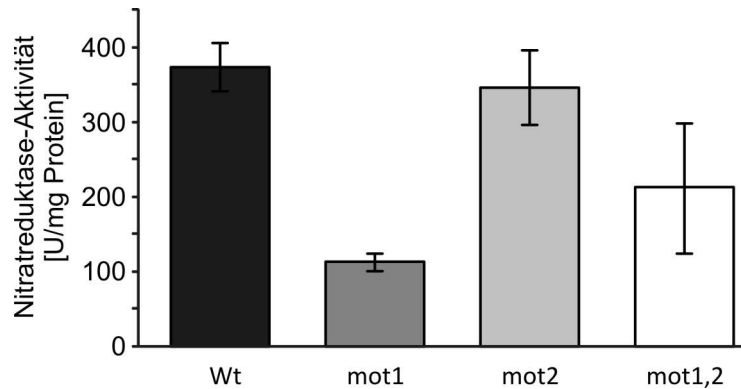


Abb. 3.16: Aktivität der Nitratreduktase 6 Wochen alten Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Pflanzen

Die Pflanzen wurden 6 Wochen auf Erde angezogen, anschließend wurde die gesamte Rosette zur Messung der Nitratreduktase-Aktivität geerntet. Die Messung der Aktivität ist in Abschnitt 2.5.1 ausführlich beschrieben. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler bei jeweils $n=3$ dar.

Nach Anzucht der Pflanzen auf Erde liegt die Aktivität der Nitratreduktase in Wt- und mot2-Pflanzen mit 374 bzw. 347 U/mg Protein auf einem Niveau (Abb. 3.16). Deutlich reduziert ist dagegen die Aktivität in mot1,2-Pflanzen mit 213 U/mg Protein und in mot1-Pflanzen, bei denen nur eine Aktivität von 113 U/mg Protein messbar ist.

3.4.2 Aktivitäten der weiteren Moco-abhängigen Enzyme

Neben der Nitratreduktase ist die Funktionalität drei weiterer Enzyme von Moco und damit von Molybdät abhängig, nämlich der Sulfitoxidase, der Aldehydoxidase und der Xanthindehydrogenase.

Die Aktivitäten weiterer Moco-abhängiger Enzyme bestätigen die Tendenzen der Nitratreduktase-Aktivität (Abb. 3.16). So ist die Aktivität der Sulfitoxidase (Abb. 3.17 A) in mot1- und mot1,2-Pflanzen mit 0,42 bzw. 0,23 nmol/min-mg Protein gegenüber dem Wildtyp reduziert (1,04 nmol/min-mg Protein). In mot2-Pflanzen ist die Sulfitoxidase-Aktivität mit 1,3 nmol/min-mg Protein sogar höher als im Wildtyp, aufgrund der hohen Standardabweichung allerdings nicht statistisch signifikant. Auch bei den Aktivitäten der Aldehydoxidase und der Xanthindehydrogenase (Abb. 3.17 B, C) spiegelt sich dieses Bild wider. Die Aktivitäten wurden in einem „in gel assay“ quantifiziert, hier reflektiert die Stärke der Färbung des gebildeten Produkts im Gel die Aktivität des jeweiligen Enzyms. Im Fall der Aldehydoxidase (Abb. 3.17 B) erkennt man deutlich reduzierte Aktivitäten der mot1- und mot1,2-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp, mot2-Pflanzen scheinen sogar eine leicht erhöhte Aktivität aufzuweisen. Die Xanthindehydrogenase-Aktivität (Abb. 3.17 C) weist ebenfalls diese Unterschiede, wenn auch deutlich schwächer, auf.

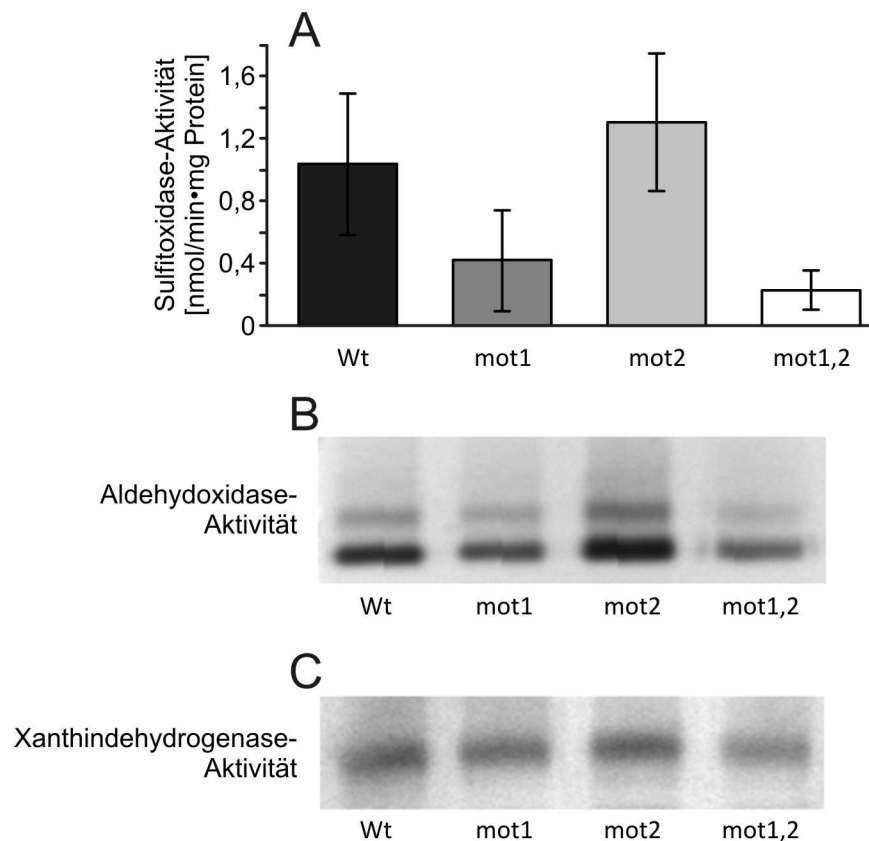


Abb. 3.17: Aktivitäten weiterer Moco-abhängiger Enzyme in 6 Wochen alten Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Pflanzen

Die Pflanzen wurden 6 Wochen auf Erde angezogen, anschließend wurde die gesamte Rosette zur Messung der Enzymaktivitäten geerntet. Sulfitoxidase-Aktivität (A) wurde als Umsatz von Sulfid durch OH^- -vermittelte Fuchsin-Entfärbung gemessen. Aldehydoxidase- (B) und Xanthindehydrogenase-Aktivitäten (C) wurden mittels „in gel assay“ bestimmt, die Stärke der Färbung spiegelt die Aktivität wider. Die Messung der Aktivitäten ist in den Abschnitten 2.5.2 und 2.5.3 ausführlich beschrieben. Die Fehlerbalken in (A) stellen die Standardabweichung bei jeweils $n=3$ dar.

3.4.3 Moco-Gehalte der KO-Linien

Wie einleitend erwähnt, ist Molybdät in Form des Molybdän-Kofaktors (Moco) biologisch aktiv. Obwohl alle KO-Linien beim Wachstum auf Erde dem Wildtyp optisch ähneln, zeigen die molybdatabhängigen Enzyme der KO-Linien mot1 und mot1,2 etwas geringere und mot2 leicht erhöhte Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp. Dies deutet auf Beeinträchtigungen des Molybdätmetabolismus der jeweiligen KO-Linien hin. Daher sollte die Moco-Konzentration der verschiedenen KO-Linien untersucht werden, was allerdings aufgrund der geringen Stabilität des Moco erschwert wird. Die Untersuchung umfasst eine chromatographische Quantifizierung via HPLC. In Vorbereitung dieser Quantifizierung werden sowohl

Moco, als auch dessen molybdatfreie Vorstufe MPT, zu deren gemeinsamem Derivat FormA oxidiert. Letzteres ist stabil genug um eine Quantifizierung zu ermöglichen, erlaubt aber nicht, zwischen Moco und MPT zu unterscheiden (Johnson und Rajagopalan, 1982). Eine genaue Beschreibung der FormA-Quantifizierung ist in Abschnitt 2.6.3 aufgeführt.

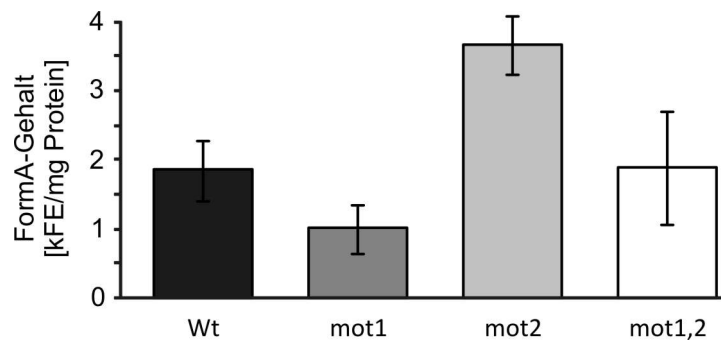


Abb. 3.18: FormA-Gehalt in 6 Wochen alten Wt-, mot1-, mot2- und mot1,2-Pflanzen

Die Pflanzen wurden 6 Wochen auf Erde angezogen, anschließend wurde die gesamte Rosette zur Messung des FormA-Gehalts geerntet. Die Quantifizierung via HPLC ist im Abschnitt „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben. Dargestellt ist der FormA-Gehalt in Form von HPLC-Flächeneinheiten (FE) bezogen auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung bei jeweils n=5 dar.

Die FormA-Gehalte, also die gemeinsame Menge aus Moco und dessen Vorstufe MPT, zeigen Unterschiede, die den Aktivitäten der Molybdoenzyme tendenziell entsprechen (Abb. 3.16 und 3.17). So ist der Gehalt in mot1-Pflanzen mit 1005 kFE/mg Protein fast halb so hoch wie im Wildtyp mit 1850 kFE/mg Protein (Abb. 3.18). In Pflanzen der KO-Linie mot2 lässt sich hingegen mit 3660 kFE/mg Protein doppelt so viel FormA nachweisen. Erstaunlicherweise zeigt die Doppelmutante mot1,2 mit 1890 kFE/mg Protein ähnliche FormA-Gehalte wie der Wildtyp.

3.5 Expressionsprofile der Gene von MOT1 und MOT2

3.5.1 Expression der Gene *MOT1* und *MOT2* während des Wachstums unter verschiedenen Molybdatkonzentrationen

Das Substrat eines Transporters kann Einfluss auf dessen Genexpression haben und so durch Veränderung der mRNA die Abundanz des entsprechenden Proteins variieren. Um den Einfluss der Molybdatkonzentration, unter welcher die Pflanzen wachsen, auf die Expression von MOT1 und MOT2 zu untersuchen, wurden die Pflanzen wie bereits beschrieben in Flüssigkultur unter definierter Molybdatverfügbarkeit angezogen. Anschließend wurde aus den Keimlingen RNA isoliert und mittels Northern-Blot untersucht.

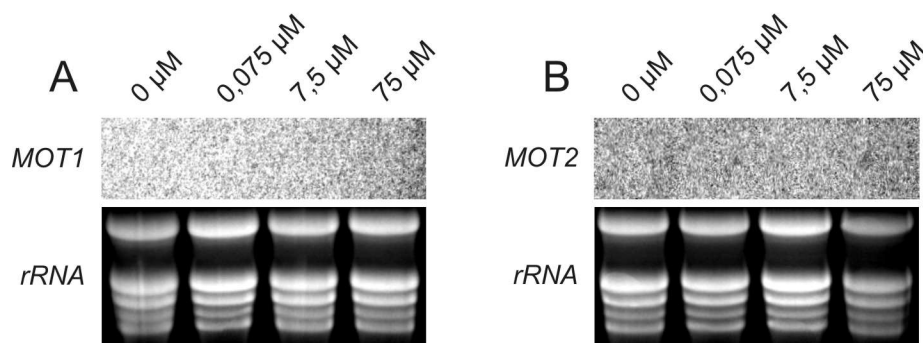


Abb. 3.19: Einfluss der Molybdatkonzentration auf den *MOT1*- und *MOT2*-Transkriptgehalt

RNA wurde aus 10 Tage alten Wildtyp-Keimlingen isoliert, welche in Flüssigkultur angezogen wurden. Das Kulturmedium enthielt 0 μM, 0,075 μM, 7,5 μM oder 75 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Nach Transfer (Northern-Blot) wurden die Membranen mit ^{32}P -markierten Sonden inkubiert. Die Basensequenz der Sonden war jeweils komplementär zur *MOT1*- (A) oder *MOT2*-Sequenz (B). Als Beladungskontrolle ist die korrespondierende UV-Aufnahme der durch Ethidiumbromid gefärbten ribosomalen RNA (rRNA) dargestellt.

Aus der Northern-Blot Analyse ist ersichtlich, dass die Molybdatkonzentration, unter welcher die Keimlinge wachsen, keinen detektierbaren Einfluss auf die Transkription der *MOT1*- oder *MOT2*- Gene hat. Wie in Abb. 3.19 dargestellt, ist weder *MOT1*- noch *MOT2*-mRNA detektierbar. Dies gilt sowohl für molybdatfreies Wachstum als auch für Wachstum unter 1000fach erhöhter Molybdatkonzentration (Abb. 3.19, 75 μM).

3.5.2 Expression der Gene *MOT1* und *MOT2* unter Seneszenz

In der bereits erwähnten Doktorarbeit von Ingmar Feifer wurde eine zunehmende Akkumulation des *MOT2*-Transkripts in *Arabidopsis* Blättern in Abhängigkeit von deren Alter beobachtet (Feifer, 2008). So war mehr *MOT2* mRNA in 7 Wochen alten Rosettenblättern nachweisbar als in 4 Wochen alten Blättern. *MOT1*-Transkript war in diesen Proben hingegen nicht detektierbar. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung und der scheinbaren Rolle von *MOT2* in seneszenten Blättern, wo die Molybdäatgehalte in *mot2*-Blättern wesentlich höher sind als in *Wt*- und *mot1*-Blättern (Abb. 3.10 C), wurde der *MOT1*- und *MOT2*-Transkriptgehalt in seneszenten Blättern mittels Northern-Blot untersucht.

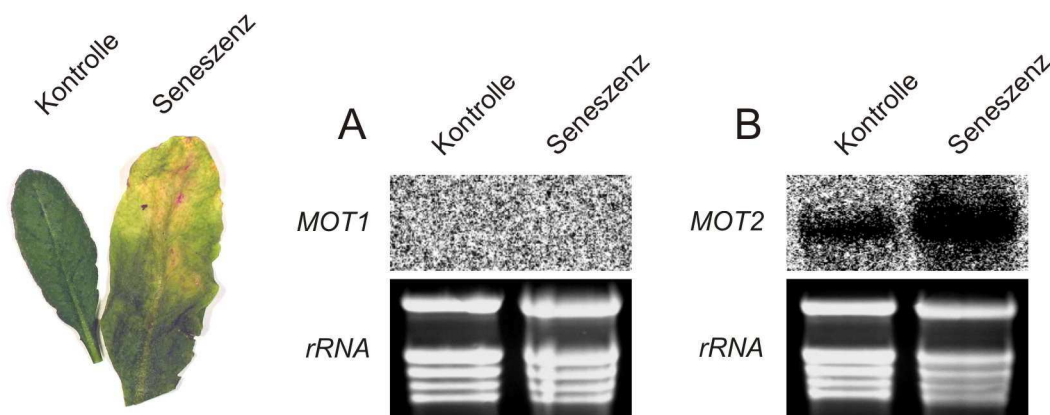


Abb. 3.20: Einfluss des Blattalters auf den *MOT1*- und *MOT2*-Transkriptgehalt

RNA wurde aus 7 Wochen (Kontrolle) und 11 Wochen alten Blättern (Seneszenz) isoliert. Nach Transfer (Northern-Blot) wurden die Membranen mit ^{32}P -markierten Sonden inkubiert. Die Basensequenz der Sonden war jeweils komplementär zur *MOT1*- (A) oder *MOT2*-Sequenz (B). Als Beladungskontrolle ist die korrespondierende UV-Aufnahme der durch Ethidiumbromid gefärbten ribosomalen RNA (rRNA) dargestellt.

In Abb. 3.20 B erkennt man eine massive Akkumulation von *MOT2*-mRNA in seneszenten Blättern. So ist in 11 Wochen alten Rosettenblättern ein deutlich höherer Transkriptgehalt detektierbar als in Blättern im Alter von 7 Wochen. Allerdings ist in keiner der Proben *MOT1*-Transkript detektierbar (Abb 3.20 A).

4. Diskussion

Molybdat stellt ein Spurenelement im Boden mit essentieller Bedeutung für Pflanzen dar. Diese beruht auf den Redox-Eigenschaften des Übergangsmetalls, welche es in die Lage versetzt, als Kofaktor von Elektronen übertragenden Enzymen zu dienen. Der Molybdat-Kofaktor (Moco) in Pflanzen ist strukturell von einem Pterin abgeleitet und zu dessen Funktionalität muss Molybdat im Cytosol der Pflanzenzelle bereitgestellt werden. Dies erfordert die Aufnahme von Molybdat aus dem Boden über die Plasmamembran. Eine Möglichkeit der Molybdadataufnahme in die Zelle stellen Mitglieder der Sulfattransporter-Familie (Sultr) dar. So sind in der Fabaceae *Stylosanthes hamata* und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* Sulfattransporter bekannt, welche den Transport von Molybdat über die Plasmamembran katalysieren (Fitzpatrick, *et al.*, 2008; Tejada-Jimenez *et al.*, 2007).

Neben diesen Transportern mit dem Hauptsubstrat Sulfat konnte kürzlich ein Protein identifiziert werden, welches Molybdat, jedoch nicht Sulfat, transportiert. Dieser Molybdat-Transporter (MOT1) wurde zunächst an *C. reinhardtii* und kurz darauf auch dessen Homolog aus *Arabidopsis thaliana* untersucht (Tejada-Jimenez *et al.*, 2007; Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Letzterer wurde bis dahin unter dem Namen Sultr5,2 zur Familie der Sulfattransporter gezählt, zeigt in der Sequenzanalyse mit seinem Homolog (Sultr5,1) jedoch als fünfte Gruppe nur geringe Ähnlichkeiten zu den vier anderen Gruppen der Familie (Hawkesford, 2003). Das Homolog weist eine 72%ige Ähnlichkeit auf Basis der Aminosäuresequenz zum MOT1 auf. Zusammen mit dem in der vorliegenden Dissertation dargestellten Einfluss von Sultr5,1 auf den Molybdatstoffwechsel von *A. thaliana* begründet sich die hier gewählte Bezeichnung des Proteins als MOT2.

Zu der Funktion von MOT1 im pflanzlichen Stoffwechsel ist nur recht wenig bekannt. Bislang wurden hauptsächlich die subzelluläre Lokalisierung und die Transportfunktion analysiert (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Entsprechende T-DNA-Insertionslinien wurden lediglich auf Ihren Molybdatgehalt hin untersucht. Studien zu dem Transporter MOT2 wurden noch nicht publiziert. Ziel dieser Dissertation sollte die detailliertere Untersuchung beider Proteine hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion sein.

4.1 MOT1 bewirkt als Transportprotein im Endoplasmatischen Retikulum die Beladung der Vakuole mit Molybdat

Sehr kontrovers wird die Funktion des Transporters MOT1 im Pflanzenstoffwechsel bereits hinsichtlich seiner subzellulären Lokalisierung diskutiert. Eine GFP-Fusion mit MOT1 wies punktuelle Fluoreszenzmuster auf, welches als Beweis für eine Lokalisierung des Proteins in Plasma- und Endomembran interpretiert wurde (Tomatsu *et al.*, 2007). Eine andere Forschergruppe erkannte ebenfalls ein punktuellies Fluoreszenzmuster, ordnete es aber in Verbindung mit einem mitochondrialen Marker den Mitochondrien zu (Baxter *et al.*, 2008). Diese Diskrepanz bezüglich der Lokalisierung des Proteins MOT1 erschwert die Einordnung in den zellulären Kontext, weshalb die Analyse des Proteins MOT1 mit einer C-terminalen GFP-Fusion im Zuge dieser Arbeit rekapituliert wurde.

Die transiente Expression von MOT1-GFP in Epidermiszellen von *A. cepa* ermöglichte keine genaue Aussage über die Lokalisierung in der Zelle (Abb. 3.1 A, B). Es wurde lediglich klar, dass die Fluoreszenz ungleichmäßig im Bereich des Cytosols verteilt ist. Daher war eine Analyse der Fluoreszenz in *A. thaliana* Protoplasten nötig, welche sich deutlich als Abbildung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellt (Abb. 3.2 A-C). Zur Kontrolle der Interpretation wurde das Konstrukt *MOT1-GFP* zusammen mit einem Marker für das ER in Arabidopsis Protoplasten koexprimiert. In Abb. 3.3 A-D erkennt man, dass die Fluoreszenzmuster von MOT1-GFP und dem ER-Marker CD3-959 identisch sind und somit eine Lokalisierung von MOT1 im ER postuliert werden kann.

Dies deckt sich mit der Beobachtung von Tomatsu, welcher ohne die Analyse eines ER-Markers neben dem ER die Plasmamembran als möglichen Zielort von MOT1 vorschlug (Tomatsu *et al.*, 2007). Allerdings lässt sich eine Lokalisierung in der Plasmamembran aufgrund der in den Abbildungen 3.1 bis 3.3 dargestellten Ergebnisse ausschließen. Zusätzlich fehlt MOT1 die für Plasmamembran-ständige Sulfattransporter typische C-terminale STAS-Domäne (Shibagaki und Grossman, 2004). Obwohl das Fluoreszenzsignal deutlich dem ER zuzuordnen ist und keinerlei Spuren für eine Lokalisierung des MOT1-GFP Fusionsproteins in der Plasmamembran zu erkennen sind, kann eine duale Zielsteuerung in zwei verschiedene Membransysteme, ER und Plasmamembran, nicht ausgeschlossen werden. Eine solche duale Zielsteuerung wurde kürzlich für einige Soluttransporter, unter anderem ein Nikotintransporter, diskutiert (Morita *et al.*, 2009). Bemerkenswert ist in diesem

Zusammenhang allerdings auch, dass MOT1 bei Analysen des Plasmamembran-Proteoms nicht gefunden wurde (Alexandersson *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004). Im Widerspruch zu den hier vorliegenden Ergebnissen (Abb. 3.1 - 3.3) und denen von Tomatsu, wurde von Baxter eine mitochondriale Lokalisierung vorgeschlagen. In seiner Arbeit deckt sich das Fluoreszenzmuster von MOT1-GFP allerdings nicht vollständig mit dem Mitochondrienfarbstoff „Mitotracker Red“ (Baxter *et al.*, 2008). Außerdem verweist der Autor in seiner Diskussion auf ein mitochondriales Target-Motiv, welches der N-Terminus von MOT1 aufweist. Dies kann mit öffentlich zugänglichen Vorhersageprogrammen allerdings nicht bestätigt werden, so ergibt sich mit MitoProtII (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>; Claros und Vincens, 1996) lediglich eine Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisierung von 1,04%. Unstimmigkeiten zwischen Vorhersageprogrammen und experimentellen Lokalisierungsstudien traten allerdings auch bei dem zum MOT1 verwandten Sulfattransporter Sultr4,1 auf. In diesem Fall wurde aufgrund eines N-terminalen Transitpeptids eine chloplastidäre Lokalisierung vorhergesagt (Takahashi *et al.*, 1999), experimentelle Daten wiesen später aber nach, dass Sultr4,1 im Tonoplasten lokalisiert ist (Kataoka *et al.*, 2004).

Zusätzlich ist eine mitochondriale Lokalisierung von MOT1, auf Basis des derzeitigen Wissensstands zum Molybdat-Metabolismus, sehr schwer in den pflanzlichen Stoffwechsel zu integrieren. Zum Einen akkumuliert Molybdat nicht in Mitochondrien, in welchen darüber hinaus auch keine Moco-abhängigen Enzyme lokalisiert sind. Zum Anderen findet die Inkorporation von Molybdat in Metallbindendes Pterin (MPT), zur Bildung funktionalen Mocos, exklusiv im Cytosol statt (Mendel, 2007).

Als unabhängiger Nachweis der Lokalisierung von Proteinen bietet sich die *in situ* Methode des „immunogold labelling“ an. Dabei werden Präparate mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein inkubiert, welche mit Goldpartikeln konjugiert wurden. Diese ermöglichen nach Untersuchung des Präparats mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie Rückschlüsse auf die Lokalisierung des Proteins. Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörperserums wurden sowohl MOT1 als auch MOT2, jeweils mit einem Histidin-Tag versehen, in *E. coli* Zellen exprimiert. In Abb. 3.5 erkennt man, dass die heterologe Expression beider Proteine, sowie eine anschließende affinitätschromatographische Reinigung mittels Nickel-NTA, möglich ist.

Leider verlief die Immunisierung der Wirte, in diesem Fall Kaninchen, nicht erfolgreich. Abb. 3.6 zeigt den Test der Antikörperseren vor und nach der Immunisierung des Wirts. Das jeweilige Antigen, als gereinigtes, heterolog exprimiertes Protein, wird nicht vom Antikörper enthaltenden Serum erkannt. Ein negativer Test der Antikörperseren mit dem gereinigten Protein lässt auf einen so geringen Titer schließen, dass weitere Versuche mit den Seren, beispielsweise mit pflanzlichen Proben, entfallen. Über die Ursache lässt sich nur spekulieren. So ist die Immunisierung mit Membranproteinen seltener erfolgreich als mit löslichen Proteinen. Naheliegend ist die Annahme, dass stark hydrophobe Proteinbereiche oder der damit einhergehende Einsatz von Detergenzien die Immunisierung erschweren.

Obwohl die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers methodisch wesentlich aufwändiger ist, könnte dies zu einem brauchbaren Antikörper führen, da die verschiedenen Klone einzeln auf Ihr Potenzial zur Antigendetektion hin untersucht werden können. So kann der Klon mit den besten Detektionseigenschaften identifiziert und für weitere Versuche verwendet werden. Zur Immunisierung zwecks Herstellung eines monoklonalen Antikörpers wurde MOT1 wie oben beschrieben heterolog exprimiert und gereinigt. Um den schädlichen Einfluss des Detergens auf den Wirt zu minimieren wurde das Protein nach Reinigung mit dem starken Detergens n-Lauroyl-Sarcosin (NLS) erfolgreich mit n-Dodecyl beta-D-Maltosid (DDM) eluiert (Abb. 3.7). Letzteres führt bei der Immunisierung des Wirts zu weniger schädlichen Nebenwirkungen. Leider stand der monoklonale Antikörper zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung. Neben dem direkten Nachweis mittels GFP-Fluoreszenzanalysen kann man jedoch auch vom Phänotyp der „knock-out“-Linie mot1 Rückschlüsse bezüglich der Lokalisierung von MOT1 ziehen. Beim Wachstum dieser KO-Linien auf Erde zeigen sich keine Unterschiede zum Wildtyp (Wt). Erst die Anzucht der Pflanzen in Flüssigkultur erlaubte die Analyse der Abhängigkeit des Wachstums der Linien von Molybdat. Das Spurenelement kann dem Nährmedium in definierter Konzentration zugegeben oder ganz vorenthalten werden, was bei Anzucht auf Erde nicht möglich ist. So zeigte sich ein retardiertes Wachstum der Linien mot1 und mot1,2 in Abwesenheit von Molybdat (Abb. 3.8). Die MOT2 KO-Linie mot2 wächst vergleichbar zum Wt, auch die Chlorophyllgehalte und Biomassen aller Linien bestätigen diesen visuellen Phänotyp (Abb 3.9).

Diese phänotypischen Auswirkungen der Deletion von MOT1 in Pflanzen sprechen gegen die von Tomatsu *et al.* vorgeschlagene Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran. Zwar wurde in der Arbeit ebenfalls ein reduziertes Wachstum der Linie *mot1* auf molybdatfreiem Medium beschrieben, dies wurde aber als Beweis dafür interpretiert, dass *mot1*-Pflanzen kein Molybdat aufnehmen können, was wiederum die postulierte Lokalisierung von MOT1 in der Plasmamembran verifizieren sollte (Tomatsu *et al.*, 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass *mot1*-Pflanzen sehr wohl in der Lage sind, Molybdat aufzunehmen. Betrachtet man nämlich das Wachstum von Keimlingen auf Vollmedium (Abb. 3.8, +Mo), so gleichen Pflanzen ohne MOT1-Aktivität (*mot1*) dem Wildtypen. Erst das Wachstum in Abwesenheit von Molybdat ist bei *mot1*-Pflanzen verlangsamt (Abb. 3.8, -Mo), was auch über die entsprechenden Frischgewichte und Chlorophyllgehalte quantifizierbar ist (Abb. 3.9). Eine Pflanze deren Fähigkeit zur Molybdataufnahme von außen gestört ist, was von Tomatsu für *mot1*-Pflanzen postuliert wurde, sollte aber Wachstumsdefizite unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Molybdat aufweisen.

Darüber hinaus kann durch die Analyse der Molybdatgehalte der Samen gezeigt werden, warum der Wachstumsphänotyp von *mot1* von der Molybdatverfügbarkeit abhängt. Die *mot1*-Samen weisen, im Vergleich zum Wildtyp, stark reduzierte Molybdatgehalte auf (Abb. 3.10 B), was das Wachstum der Keimlinge in Abwesenheit von Molybdat negativ beeinträchtigt. Erst die Zugabe von Molybdat ins Nährmedium führt zu einem stärkeren Wachstum mit erhöhter Chlorophyllsynthese und größerer Gewichtszunahme (Abb. 3.8 und 3.9). Wt-Samen verfügen hingegen über einen Molybdatgehalt, welcher für eine unbeeinträchtigte Keimung der Pflanze unter Abwesenheit von Molybdat ausreicht (Abb. 3.10 B und 3.8).

Zusammenfassend kann Molybdat nach den hier vorliegenden Daten sehr wohl ins Cytosol von *mot1*-Pflanzen gelangen. Eine Ursache für die Wachstumsunterschiede von *mot1* in Abhängigkeit von der Molybdatverfügbarkeit könnte man in der Aktivität des Molybdoenzyms Nitratreduktase vermuten. Dieses katalysiert den ersten Schritt der Nitrat-Assimilation und ist somit von elementarer Bedeutung für den Stickstoff-Metabolismus der Pflanze. Dessen Aktivität zeigt eine starke Erhöhung nach Zugabe von Molybdat ins Nährmedium (Abb. 3.14), womit auch eine Reduktion des Substrats Nitrat einher geht (Abb. 3.13 A). Um osmotische Effekte aufgrund der erhöhten Nitratgehalte unter molybdatfreiem Wachstum auszugleichen, wird die Chloridkon-

zentration angepasst (Abb. 3.13 B) (Glass und Siddiqi, 1985). Außerdem wird durch den Anstau von Nitrat die Transkription des NR-Gens angeregt (Abb. 3.15) (Campbell, 1999). Des Weiteren könnten auch die reduzierten Chlorophyllgehalte (Abb. 3.9 B) auf einen gestörten Stickstoffmetabolismus hindeuten, da die Aminosäure Glutamat als Ausgangspunkt für die Chlorophyll-Biosynthese in den Chloroplasten dient (Heldt, 2003).

Diese Unterschiede zwischen Wt und mot1 in Abhängigkeit von der Molybdatverfügbarkeit zeigen, dass Molybdat unabhängig von der MOT1-Aktivität von der Pflanze aufgenommen, also über die Plasmamembran transportiert werden kann, und erfolgreich in funktionellen Molybdän-Kofaktor (Moco) integriert werden kann. Diese Aufnahme kann, wie einleitend schon erwähnt, durch die Aktivität von Sulfat-Transportproteinen vermittelt werden. In Anbetracht der geringen Konzentrationen von Molybdat im Boden, sowie in der Pflanze, ist es ein durchaus vorstellbares Szenario, dass die geringen Mengen Molybdat, die von der Pflanze benötigt werden, nicht zwangsläufig einen speziellen, hoch affinen, Molybdat-Transporter erfordern.

Werden Pflanzen auf Erde angezogen, spielt der geringe Molybdatgehalt der mot1-Samen keine Rolle, da das Spurenelement im Überschuss zur Verfügung steht. Dementsprechend zeigt sich kein visueller Unterschied zwischen mot1- und Wt-Pflanzen. Allerdings sind in mot1-Pflanzen die Molybdatgehalte in Rosettenblättern von sechs Wochen alten Pflanzen, sowie in isolierten Vakuolen um den Faktor 7 gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 3.10 A und 3.11). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Vakuole der Hauptspeicherort von Molybdat in der Pflanzenzelle darstellt. Überschüssiges Molybdat wird in der Vakuole gespeichert, was daraus ersichtlich ist, dass mot1-Pflanzen trotz ihrer wesentlich reduzierten Molybdatgehalte in Blättern und isolierten Vakuolen (Abb. 3.10 A und 3.11) keine Beeinträchtigung im Wachstum auf Erde zeigen. Das überschüssige Molybdat im Wildtyp wird also nicht zur Moco-Synthese und damit zur Gewährleistung der Funktionalität der Molybdoenzyme benötigt, sondern in der Vakuole gespeichert. Schon vor einigen Jahren wurde hinsichtlich der Toleranz von hohen Mengen des Metalls, die Vakuole als Ziel der Sequestration von Molybdat identifiziert (Brune *et al.*, 1994).

Neben der Eigenschaft der Vakuole als Hauptspeicherort von Molybdat zeigen die Molybdatgehalte in Rosettenblättern und Vakuolen auch, dass MOT1 ausschlaggebend für die Beladung der Vakuole mit Molybdat ist (Abb. 3.10 A und 3.11). Diese Bedeutung kommt dem Transporter zu, obwohl MOT1 nicht in der Vakuolenmembran

lokalisiert ist. Unter Berücksichtigung der Lokalisierung des Transporters im ER könnte MOT1 überschüssiges Molybdat aus dem Cytosol ins ER-Lumen transportieren. Daraufhin folgt die Beladung der Vakuole mit Molybdat über einen Vesikelfluss vom ER zur Vakuole.

Es gibt zunehmende Hinweise auf die Bedeutung von Vesikelfläßen für die intrazelluläre Ionenhomöostase und die Beladung der Vakuole mit Metaboliten. So wird überschüssiges Mangan aus der Zelle über Golgi-Vesikel exportiert (Peiter *et al.*, 2007). Auch konnte eine durch Saccharose induzierte Endocytose als Mechanismus für den Nährstofftransport zur Vakuole identifiziert werden (Etxeberria *et al.*, 2005). Das wichtigste Beispiel für Vesikelfluss stellt jedoch *myo*-Inosit-1,2,3,4,5,6-Hexakisphosphat (IP₆) dar, eine bedeutende Speicherform von *myo*-Inosit, Phosphat und Kationen in Form von Chelaten. Dieses wird aus dem Cytosol ins ER-Lumen importiert und über Vesikelfluss sukzessive in die Vakuole transportiert (Greenwood und Bewley, 1984). Dieser Mechanismus kann durch die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse auch für den Transport von Molybdat zur Vakuole über MOT1 angenommen werden.

4.2 MOT2 ist essentiell für den Export von Molybdat aus der Vakuole, speziell während der Seneszenz

Arbeiten bezüglich des Homologs von MOT1, in dieser Arbeit als MOT2 bezeichnet, wurden bisher nicht publiziert. Zur Einordnung eines Proteins in den stoffwechselphysiologischen Kontext ist es wichtig, die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins zu kennen. Zur subzellulären Lokalisierung von MOT2 ist bislang noch nichts bekannt, diese kann nun aber nach der Analyse des MOT2-GFP Fusionsproteins als tonoplastidär identifiziert werden. Sowohl in *A. cepa* als auch in *A. thaliana* weist das Fluoreszenzmuster eine definierte Linie auf, die entweder durch den Zellkern der Epidermiszelle (Abb. 3.1 C, D) oder durch Chloroplasten der Protoplasten (Abb. 3.2 E) invaginiert ist. Dies stellt das typische Fluoreszenzmuster tonoplastidärer Membranproteine dar, welches schon beim Dikarbonsäuretransporter TDT oder beim Monosaccharidtransporter TMT beschrieben wurde (Emmerlich *et al.*, 2003; Wormit *et al.*, 2006).

Auch wird die tonoplastidäre Lokalisierung durch einige Proteomanalysen unterstützt. So kann das Protein MOT2 (At1g80310) mittels Massenspektrometrie in Isolaten

reiner Tonoplastenmembranen identifiziert werden (Carter *et al.*, 2004; Dr. O. Trentmann, pers. Kommunikation).

Die Untersuchung der KO-Linie *mot2* führte zu einem zunächst verwirrenden Ergebnis, so führt die Abwesenheit von MOT2 in der Pflanze zu einem Anstau von Molybdat in Rosettenblättern (Abb. 3.10 A). Vergleicht man die Linie *mot2* mit dem Wildtyp, ähnelt der Anstau der Situation der kürzlich identifizierten vakuolären Sulfat-exporter *Sultr4,1* und *Sultr4,2* (Kataoka *et al.*, 2004) und dem vakuolären Inositoltransporter *INT1* (Schneider *et al.*, 2008). Diese Transportproteine fungieren als vakuoläre Exporter und die korrespondierenden KO-Linien weisen erhöhte Gehalte der entsprechenden Substrate im Vergleich zum Wildtyp auf. Die physiologische Funktion von MOT2 könnte demnach der Export von Molybdat aus der Vakuole sein. Dieser ist erforderlich, wenn cytosolische Molybdatengpässe auftreten oder während der Remobilisierung von Nährstoffen und Mineralien aus dem Blatt zur Versorgung der Samen.

Aus diesem Grund wurden die Molybdatgehalte von Samen und seneszierten Blättern von *mot2*- und Wildtyp-Pflanzen untersucht. Die relativen Veränderungen des Molybdatgehalts in seneszierten Blättern und Samen von *mot2*-Pflanzen (Abb. 3.10 B und C) unterstützen die Annahme, dass MOT2 als vakuolärer Exporter von Molybdat fungiert. Eine Pflanze ohne MOT2-Aktivität ist demnach nicht in der Lage, das Molybdat aus der Vakuole zu mobilisieren und der Samenentwicklung zur Verfügung zu stellen, was zu einem Anstau des Ions in seneszierten Blättern und einem Defizit in Samen führt. Es ist bekannt, dass 80% des Molybdats aus *Arabidopsis*-Blättern während der Seneszenz mobilisiert wird und Molybdän somit eines der am stärksten remobilisierten Elemente in *Arabidopsis* darstellt (Himmelblau und Amasino, 2001). Dies erfordert ein effizientes Exportsystem von Molybdat in der Vakuolenmembran seneszierender Blätter, welches MOT2 laut der gezeigten Ergebnisse repräsentiert.

Die Tatsache, dass MOT2 das Exportprotein für Molybdat in der Vakuole darstellt, wird weiterhin durch Expressionsanalysen des Gens *MOT2* gestützt. Die Expression ist in seneszierenden Blättern stark erhöht (Abb. 3.20). Diese elf Wochen alten Blätter zeigen bereits eine fortgeschrittene Chlorosen, in *Arabidopsis* ein eindeutiges Zeichen für seneszenten Blätter, deren Nährstoffe und Mineralien zum Transport in die Samen mobilisiert werden (Hörtensteiner, 2006). Die erhöhte *MOT2*-mRNA Akkumulation, sowie die hohen Molybdatgehalte im seneszierten *mot2*-Blatt weisen

deutlich auf die Rolle von MOT2 im Prozess der Molybdatmobilisierung aus dem Blatt hin.

Eine *in silico* Studie über Seneszenz-assoziierte Genexpression wies unabhängig von den hier präsentierten Daten die erhöhte Akkumulation von *MOT2*-mRNA unter natürlichen Seneszenz-Bedingungen nach (van der Graaf *et al.*, 2006). Auch konnte in dieser Studie wie auch in den hier präsentierten Expressionsanalysen keine *MOT1*-mRNA detektiert werden, eine spezielle Rolle von *MOT1* unter Seneszenz kann somit nicht angenommen werden. Das Gen, welches das letzte Protein kodiert, scheint generell in sehr geringem Maß exprimiert zu werden. So war auch nach einer gesteigerten Zugabe von Molybdat ins Wachstumsmedium weder *MOT1*- noch *MOT2*-mRNA detektierbar (Abb. 3.19). Auch frühere Transkriptanalysen beider Gene konnten nur *MOT2*-mRNA in sieben Wochen alten Rosettenblättern nachweisen (Feifer, 2008). Die Induktion der Genexpression von *MOT2* unter Seneszenz wird auch durch die Anwesenheit der Seneszenz-spezifischen Promotor-Elemente -ACGTG- (an Position -147 bp) und -CATGTG- (an Position -307bp) unterstützt (Simpson *et al.*, 2003). Diese Promotor-Elemente treten im *MOT1*-Promotor nicht auf.

Unter Berücksichtigung der entwicklungsabhängigen Aktivität des tonoplastidären Molybdatexporters *MOT2* kann man auch die Molybdatkonzentrationen von isolierten *mot2*-Vakuolen erklären (Abb. 3.11). Diese sind kaum höher als im Wildtyp, obwohl man eine Erhöhung vermuten könnte, da Molybdat bei fehlender Aktivität des Exporters in der Vakuole anstauen müsste. Allerdings stellt die Isolierung der Vakuolen eine hoch sensible Methode dar, welche als Ausgangsmaterial junge Pflanzen im Alter von drei Wochen erfordert. Zu diesem Zeitpunkt scheint *MOT2* also nicht aktiv zu sein, die Erforderlichkeit eines Molybdatexports beginnt daher mit großer Wahrscheinlichkeit erst mit zunehmendem Alter (Abb. 3.10 A, sechs Wochen alte Pflanzen) und erreicht ihren Höhepunkt während der Seneszenz (Abb. 3.10 C). Zur Klärung dieses Zusammenhangs ist es unumgänglich, eine Methode zur Isolierung von Vakuolen aus älteren Blättern zwecks Molybdatquantifizierung, zu etablieren.

Bei der Beladung der Samen mit dem Spurenelement Molybdän könnte *MOT2* noch eine weitere Rolle neben der Mobilisierung des Molybdats aus Mesophyllzellen zukommen. In *Arabidopsis*-Samen wird das Endosperm während der Entwicklung des Embryos degradiert und viele Nährstoffe werden vorübergehend in Vakuolen des

chalazalen Endosperms zwischengespeichert (Otegui *et al.*, 2002). An der Remobilisierung von Molybdat aus diesen Vakuolen könnte ebenfalls MOT2 beteiligt sein, was ein weiterer Grund für die reduzierten Molybdatgehalte in Samen der KO-Linie *mot2* sein könnte (Abb. 3.10 B).

Nicht unerheblich ist der Nachweis der Spezifität eines Phänotyps in Bezug auf die T-DNA-Insertion. Tatsächlich integrieren oft mehrere T-DNA-Abschnitte in verschiedene Stellen im Genom einer T-DNA-Insertionslinie (http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html). Um zu beweisen, dass die beobachteten Effekte der Insertion im *MOT2*-ORF tatsächlich auf der Deletion des Gens *MOT2* und nicht auf einer Insertion in einem weiteren Gen beruhen, wurde das intakte *MOT2*-Gen unter nativem Promotor in die KO-Linie *mot2* eingeführt. Aus dieser Transformation wurden drei unabhängige Komplementationslinien hinsichtlich ihrer Molybdatgehalte in sechs Wochen alten Blättern, Samen und seneszierten Blättern untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Geweben die Molybdatgehalte des Wildtyps zu finden sind. Dies weist die Spezifität der T-DNA-Insertion im ORF von *MOT2* nach.

Die Annahme, dass es sich bei *MOT2* um einen Transporter mit dem Substrat Molybdat handelt, beruht auf der Addition der beobachteten Effekte, welche durch die Deletion des Proteins in der KO-Linie *mot2* hervorgerufen werden. Der direkte Nachweis der Transportaktivität, sowie eine eingehende Bestimmung der biochemischen Charakteristika, wie Affinität, Substratspezifität und Energetisierung des Transports, sind im Zusammenhang dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Zur Charakterisierung des Transports wäre die funktionale Expression des Proteins in heterologen Organismen, wie Bakterien oder Hefen, erforderlich. Obwohl es gelang, das Protein in *E. coli* Zellen zu exprimieren (Abb. 3.5 C und D), war an diesen Zellen keine Transportaktivität messbar. Auch gelang es nicht, diese Aktivität an *S. cerevisiae* Zellen oder *X. laevis* Oocyten zu demonstrieren. Der direkte Nachweis der Transportaktivität von *MOT2* wird ein wesentlicher Bestandteil der zukünftigen Charakterisierung des Proteins sein.

4.3 Ein hypothetisches Modell für intrazellulären Molybdattransport

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zum Molybdattransporter MOT1 und dessen Homolog, dem putativen Molybdattransporter MOT2 erlauben erstmals die Erstellung eines hypothetischen Modells des intrazellulären Molybdatflusses.

Die Aufnahme von Molybdat in die pflanzliche Zelle ist bislang noch nicht charakterisiert, könnte aber über ein bislang noch unbekanntes Molybdattransporter oder Sulfattransporter, wie die in der Plasmamembran lokalisierten Sultr1,1 oder Sultr1,2, ins Cytosol gelangen. Cytolisches Molybdat wird zu einem geringen Teil in Metall-bindendes Pterin (MPT) inkorporiert um die Aktivität von Molybdoproteinen in Form des Molybdän-Kofaktors (Moco) zur Verfügung zu stehen.

Überschüssiges Molybdat wird in der Vakuole zwischengespeichert, ein tonoplastidäres Protein, welches diesen Transport katalysiert, ist bislang nicht bekannt. Die hier präsentierten Daten zu den stark reduzierten Molybdatgehalten in *mot1*-Vakuolen zeigen, dass MOT1-Aktivität ausschlaggebend für die Beladung der Vakuole mit Molybdat ist (Abb. 3.11). Auch die Lokalisierung des Proteins in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.2 A-C und 3.3). Die Molybdat-Transportaktivität für MOT1 wurde mehrfach an Hefezellen demonstriert (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008). Zusammengefasst lässt dies den Schluss zu, dass MOT1 Molybdat ins ER importiert, welches dann per Vesikelfluss zur Vakuole gelangt.

Der Export von Molybdat aus der Vakuole, besonders im Zuge der Remobilisierung des Spurenelements während der Blatt-Seneszenz, scheint durch MOT2 katalysiert zu werden. Dieses Protein ist im Tonoplasten lokalisiert und seneszierende Blätter der KO-Linie *mot2* sind nicht in der Lage, Molybdat zu remobilisieren. Leider konnte die Transportaktivität des Proteins nicht direkt gezeigt werden, aufgrund der hohen Homologie (72%) zu MOT1 gilt der Transport des gleichen Substrats als sehr wahrscheinlich.

Zur Veranschaulichung ist das Modell des intrazellulären Molybdatflusses in Abb. 4.1 dargestellt.

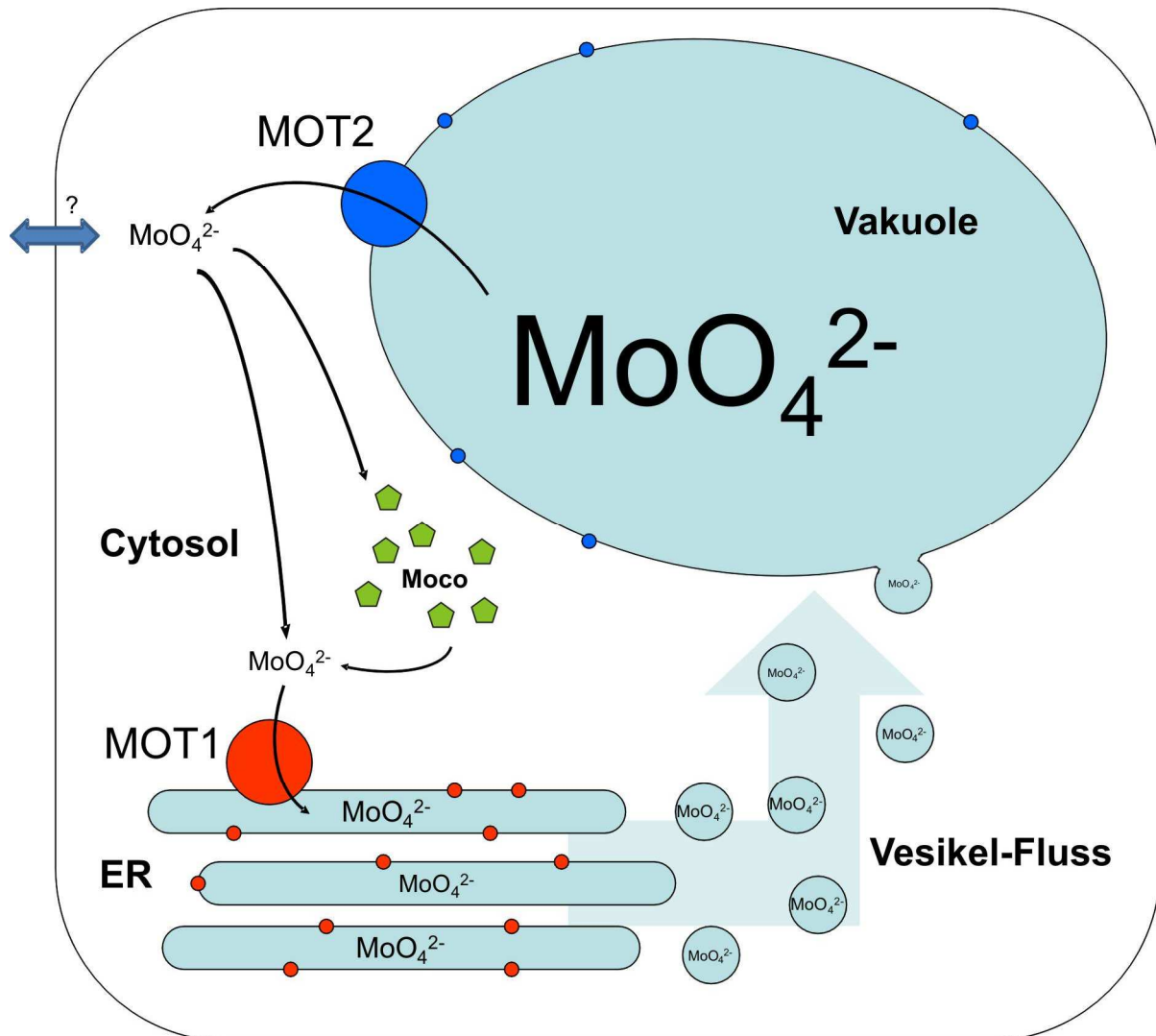


Abb. 4.1: Funktionen von MOT1 und MOT2 in einem hypothetischen Modell des intrazellulären Molybdätsstoffwechsels

Das hier abgebildete Schema beruht auf den physiologischen Daten dieser Dissertation, diese schlossen sowohl Untersuchungen an KO-Linien, als auch zur subzellulären Lokalisierung ein. Die detaillierte Beschreibung ist der Diskussion dieser Dissertation zu entnehmen.

4.4 Der Molybdätsgehalt der Vakuole könnte Einfluss auf die cytosolische Konzentration des Molybdän-Kofaktors haben

Bei Anzucht der KO-Linien *mot1*, *mot2* und *mot1,2* auf Erde zeigen sich keine morphologischen Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen. Trotzdem unterscheiden sich die Moco- und MPT-Werte (zusammen quantifiziert als FormA) in den KO-Linien *mot1* und *mot2* signifikant vom Wildtyp (Abb. 3.18). Blätter von *mot1*-Pflanzen weisen reduzierte Molybdätsgehalte (Abb. 3.10 A) und etwa die Hälfte an Moco/MPT im

Vergleich zum Wildtyp auf. Dahingegen kann man in mot2-Blättern mehr Molybdat und mehr Moco/MPT als im entsprechenden Wildtyp-Gewebe nachweisen. Die Beobachtungen dieser beiden KO-Linien erlaubt zunächst die Identifizierung einer positiven Korrelation zwischen Molybdat- und Moco/MPT-Gehalt im Blatt von *Arabidopsis thaliana*.

Auf den ersten Blick könnte man die Steigerung von Molybdat- und Moco/MPT-Gehalt im Blatt von mot2-Pflanzen mit niedrigen Molybdatkonzentrationen im Cytosol erklären. Durch die Abwesenheit des Exporters MOT2 kann das Molybdat, welches durch die Aktivität von MOT1 in der Vakuole gelagert wird, nicht mehr aus der Vakuole entlassen werden, was zu niedrigen cytosolischen Molybdatkonzentrationen führt. Als Konsequenz könnte die Pflanze die Biosynthese von Moco aktivieren, was zu den messbar hohen Moco/MPT-Gehalten führt. Die Aktivitäten aller Molybdoenzyme Nitratreduktase (Abb. 3.16), Sulfitoxidase, Aldehydoxidase und Xanthin-dehydrogenase in mot2-Blättern (Abb. 3.17) ist allerdings im Vergleich zum Wildtyp kaum bis gar nicht erhöht. Diese Erhöhung der Aktivität spiegelt jedenfalls nicht die Verdopplung des Moco/MPT-Gehalts in mot2 wider. Daher kann man annehmen, dass die hohen FormA-Werte (Moco und MPT) in mot2-Blättern (Abb. 3.18) auf einen gesteigerten MPT- und nicht Moco-Gehalt zurückzuführen sind.

Falls dieses Szenario korrekt ist, ist die positive Korrelation zwischen niedrigen Molybdat- und Moco/MPT-Gehalten in mot1-Blättern im Vergleich zum Wildtyp schwierig zu verstehen. Da die Zellen dieser KO-Linie aber Probleme haben, die Vakuole mit Molybdat zu beladen (Abb. 3.11), wäre ein Anstau von Molybdat im Cytosol möglich, also eine höhere Molybdatkonzentration als Cytosol des Wildtyp. Das wiederum könnte, im Einklang zu den Beobachtungen aus mot2-Blättern, zur Reduktion der Moco-Biosynthese führen. Dementsprechend sind die FormA-Gehalte (Moco und MPT) von mot1-Blättern gegenüber dem Wildtyp reduziert. Dies wird auch durch die reduzierten Aktivitäten der Molybdoenzyme in mot1-Blättern reflektiert (Abb. 3.16 und 3.17). In diesem Fall sollte also der Moco-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp reduziert sein, was dafür spricht, dass der relative Moco Anteil am gemessenen FormA im Fall von Wildtyp und mot1 höher ist als in mot2-Blättern.

Zusammenfassend ist es also denkbar, dass die Molybdatkonzentration in *Arabidopsis* regulierend auf die Moco-Biosynthese wirkt. Hohe cytosolische Molybdatkonzentrationen könnten negativ und niedrige positiv auf die Biosynthese des Moco wirken. Das „Sensing“ der Molybdatkonzentration könnte sogar in der

Vakuole stattfinden, denkbar wäre ein tonoplastidär lokalisiertes Protein. Im Fall von hohen vakuolären Molybdatgehalten wird die Moco-Biosynthese aktiviert, wohingegen die Biosynthese bei niedriger vakuolärer Molybdatkonzentration reduziert wird. Es gibt allerdings keinerlei Hinweise auf die Proteine, welche „Sensing“ und Signaltransduktion bewerkstelligen könnten. Neben diesen Spekulationen bleibt aber dennoch die positive Korrelation zwischen Molybdatt- und Moco/MPT-Konzentration im Blatt.

4.5 Die Lokalisierung von MOT2 im Tonoplasten hängt von einem N-terminalen Dileucin ab

Bislang ist wenig über die Zielsteuerung von Proteinen zum Tonoplasten bekannt. Diese werden kotranslational in die Membran des ER inseriert und strukturelle Elemente des Proteins müssen für die Überbringung zu Plasmamembran, Tonoplast, Golgimembran oder den Verbleib in der ER Membran verantwortlich sein. In Tieren und Hefen sind Dileucin-Motive bekannt, welche sich für den Transfer von Membranproteinen vom Golginetzwerk zu Lysosomen verantwortlich zeichnen (Bonifacino und Traub, 2003). Diese C-terminalen Motive lauten nach einem der beiden Konsense [DE]xxxL[LI] oder DxxLL.

Kürzlich wurde ein N-terminales Leucin-Motiv als ausschlaggebend für eine Zielsteuerung des pflanzlichen Monosaccharidtransporters ESL1 zur Membran der Vakuole entdeckt (Yamada *et al.*, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass Deletionen jedes einzelnen Leucinrestes in der Aminosäurefolge LxxxLL dazu führen, dass das Protein fälschlicherweise zur Plasmamembran gesteuert wird. Im N-Terminus von MOT2 tritt ebenfalls ein Dileucin auf, welches für die Zielsteuerung des Proteins über den sekretorischen Weg zum Tonoplasten verantwortlich ist (Abb. 3.4 A). Ein Aminosäureaustausch dieser beiden Leucinreste durch Alaninreste führt zu einer Lokalisierung des MOT2-GFP in der Plasmamembran (Abb. 3.4 B-D). Dies erlaubt eine Erweiterung der These von Yamada hinsichtlich des ersten Leucinrestes im Motiv LxxxLL, welches nicht für alle Leucin-gesteuerten tonoplastidären Proteine essentiell zu sein scheint.

Es bleibt allerdings unklar, welche Mechanismen dieser Zielsteuerung unterliegen. Aus dem HI-Virus ist das Protein Nef beschrieben, welches zu Fehldistributionen von Proteinen der Wirtszelle führt, und welches über Dileucine der Wirtsproteine mit

diesen interagiert (Janvier *et al.*, 2003). Es wäre denkbar, dass das Dileucin als Bindestelle für Hilfsproteine, beispielsweise Chaperone, dient, über die Determinante, welche letztendlich die ultimative Lokalisierung des Proteins im Tonoplasten bestimmt, kann nur spekuliert werden. Aminosäuren mit einer sauren Seitengruppe sind in diesem Zusammenhang bei Hefezellen Bestandteil der Diskussion (Bonifacino und Traub, 2003), das direkte N-terminale Umfeld des Dileucin-Motivs von MOT2 besteht aber aus ungeladenen Threoninen (Abb. 3.4 A). Auch kann das Dileucin am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz die Zielsteuerung eines Proteins zum Tonoplasten bewirken (pers. Kommunikation Dr. S. Schneider). Die Lokalisierung des Dileucin-Motivs muss also nicht auf den N-Terminus beschränkt sein.

Die Identifikation des LxxxLL-Motivs als Zielsteuerungssequenz für Proteine über den sekretorischen Weg zum Tonoplasten bringt Licht in diese bisher noch kaum untersuchten Mechanismen. Die Bedeutung des Motivs wird auch dadurch untermauert, dass zahlreiche tonoplastidäre Proteine, wie Sultr4,1, Sultr 4,2, TDT oder INT1 ein Dileucin oder LxxxLL-Motiv am N- oder C-Terminus aufweisen. Durch den in dieser Dissertation präsentierten Mutagenese-Versuch konnte nun gezeigt werden, dass das erste Leucin im Motiv LxxxLL für die korrekte Lokalisierung des Proteins im Tonoplasten nicht zwingend erforderlich ist.

4.6 Ausblick

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse geben einen neuen Einblick in den bislang noch recht wenig untersuchten intrazellulären Molybdattransport. Obwohl die Transportaktivität von MOT1 in früheren Arbeiten an Hefezellen demonstriert werden konnte, steht die genaue Charakterisierung des Transportmodus noch aus. Auch muss ein System etabliert werden, welches die Charakterisierung der Transportaktivität von MOT2 ermöglicht. Hier könnte der Vergleich isolierter Vakuolenmembranen von *mot2*- und *Wt*-Pflanzen Aufschluss geben. Auch eine Modifizierung von MOT2 dahingehend, dass das Protein in die Plasmamembran von Hefezellen gesteuert wird, könnte die Charakterisierung ermöglichen.

Die Rolle des MOT2 als vakuolärem Molybdatexporter, welcher diese Funktion erst mit zunehmendem Alter des Blatts aufzunehmen scheint, kann noch genauer herausgearbeitet werden. Hierzu ist allerdings die Etablierung einer Methode zur Isolierung von Vakuolen aus Mesophyllzellen älter als drei Wochen nötig um eine postulierte Zunahme von Molybdat in *mot2*-Vakuolen in Abhängigkeit vom Pflanzenalter zu bestätigen.

Zur endgültigen Schlichtung der Kontroverse bezüglich der subzellulären Lokalisierung von MOT1 ist ein experimenteller Nachweis unabhängig von GFP-Fluoreszenzanalysen erforderlich. Die Herstellung eines polyklonalen Antikörperserums war bis dato nicht erfolgreich, allerdings könnte ein monoklonaler Antikörper Lokalisierungsstudien mittels „immunogold labelling“ ermöglichen.

Es konnte eine positive Korrelation zwischen Molybdatgehalt und Moco-Biosynthese entdeckt werden. Hier sind allerdings noch alle molekularen Zusammenhänge, welche zu dieser Korrelation führen, wie Art und Ort des „Sensing“, sowie die darauf folgende Signaltransduktion, offen.

Ein sehr interessantes Ergebnis dieser Dissertation, welches sich nicht direkt auf den Molybdatstoffwechsel bezieht, ist die Identifikation eines für die korrekte Zielsteuerung zum Tonoplasten erforderlichen Dileucins am N-terminus von MOT2. Fraglich ist, ob ein Dileucin auch am C-Terminus oder in einem hydrophilen Bereich die Zielsteuerung beeinflussen kann. Auch eine Zielsteuerung von nicht-vakuolären Proteinen mittels eines Dileucins zum Tonoplasten könnte als Hilfsmittel zur Untersuchung der Funktion von Membranproteinen oder zum Design genetisch veränderter Nutzpflanzen beitragen. Dazu könnten Mutageneseversuche mit GFP-fusionierten Proteinen erste Ergebnisse liefern.

Zu guter Letzt könnten die in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, schwermetallbelastete Böden mittels Phytoremediation zu säubern. Zwar spielt Molybdän in diesem Zusammenhang keine besonders große Rolle, allerdings könnte die Identifikation von vakuolären Exportproteinen für Arsen, Cadmium oder Blei hilfreich sein. Die jeweiligen Exporter-defizienten Mutanten, ob genetisch manipuliert oder klassisch gezüchtet, könnten die Phytoremediation durch Zurückhalten der Bodenkontaminante im seneszenten Blatt verbessern.

5. Zusammenfassung

Vor kurzem wurde MOT1 als Molybdat-Transportprotein in *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Unter Zuhilfenahme von GFP-Fusionsproteinen konnte als subzelluläre Lokalisierung des Proteins die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in dieser Arbeit identifiziert werden. Auch wurde hier demonstriert, dass das mit Abstand nächste Homolog des Proteins, MOT2, ist in der vakuolären Membran, dem Tonoplasten, lokalisiert ist.

Unter Standardbedingungen zeigten mot1-KO-Pflanzen reduzierte Molybdatgehalte im Blatt und Keimlinge wiesen Wachstumsdefizite in Abwesenheit von Molybdat auf. Dies führte zu der Annahme, dass MOT1 nicht, wie bislang angenommen, den Hauptimporter für Molybdat in die Zelle darstellt. Durch die Quantifizierung vakuolärer Molybdatgehalte konnte einerseits die Vakuole als Hauptspeicherort für Molybdat in der pflanzlichen Mesophyllzelle und andererseits MOT1 als wichtigstes Protein zur Beladung der Vakuole mit dem Spurenelement identifiziert werden.

Die Blätter von mot2-KO-Pflanzen zeigten erhöhte Molybdatgehalte und die Bedeutung des Proteins für die Remobilisierung des essentiellen Molybdats während der Seneszenz konnte mittels Transkriptanalysen und Molybdatquantifizierung in Samen und seneszenten Blättern gezeigt werden.

Mittels Fluoreszenzanalysen konnte zusätzlich eine wichtige Determinante der Zielsteuerung von Proteinen zum Tonoplasten identifiziert werden. Durch Mutagenese zweier Leucinreste am N-Terminus von MOT2 ist das korrekte Targeting in die vakuoläre Membran gestört und das Protein lokalisiert fälschlicherweise in der Plasmamembran.

Es konnte ein Modell für den intrazellulären Molybdattransport vorgestellt werden. So transportiert MOT1 das Anion ins ER, von wo aus es über Vesikelfluss zur Vakuole gelangt. MOT2 stellt das tonoplastidäre Protein für den Export des Spurenelements aus der Vakuole, besonders während der Seneszenz, dar.

Auch konnte eine Korrelation zwischen dem Molybdatgehalt und der Konzentration von Moco, sowie dessen Vorstufe MPT, identifiziert werden. Dies liefert Hinweise auf eine Regulation der Moco-Biosynthese in Abhängigkeit von der zellulären Molybdatkonzentration.

6. Literatur

Aguey-Zinsou K.F., Bernhardt P.V., Kappler U., McEwan A.G. (2003) Direct electrochemistry of a bacterial sulfite dehydrogenase. *J Am Chem Soc* 125(2), 530-535.

Alexandersson E., Saalbach G., Larsson C., Kjellbom P. (2004) Arabidopsis Plasma Membrane Proteomics Identifies Components of Transport, Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1543-1556.

Alhendawi R.A., Kirkby E.A., Pilbeam D.J. (2005) Evidence That Sulfur Deficiency Enhances Molybdenum Transport in Xylem Sap of Tomato Plants. *Journal of Plant Nutrition*, Volume 28, Issue 8, 1347-1353.

Attaya F.S., Witte C.P., Galvan A., Igeno M.I., Fernandeu E. (2003) Mcp1 Encodes the Molybdenum Cofactor Carrier Protein in *Chlamydomonas reinhardtii* and Participates in Protection, Binding, and Storage Functions of the Cofactor. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 10885-10890.

Baxter I., Muthukumar B., Park H.C., Buchner P., Lahner B., Danku J., Zhao K., Lee J., Hawkesford M.J., Guerinot M.L., Salt D.E. (2008) Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genet.* 4(2), e1000004.

Bevers L.E., Hagedoorn P., Krijger G.C., Hagen W.R. (2006) Tungsten Transport Protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: the First Member of a New Class of Tungstate and Molybdate Transporters. *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, No. 18, 6498-6505.

Birnboim H.C., Doly J. (1979) Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Bonifacino J.S., Traub L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72, 395-447.

Bradford M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brune A., Urbach W., Dietz K.J. (1995) Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytologist* 129, 403 - 409.

Buchner R., Chen T., Hefter G. (2004) Complexity in Simple Electrolyte Solutions: Ion Pairing in MgSO₄(aq). *Journal of Physical Chemistry* 108, 2365-2375.

Buchner P., Takahashi H., Hawkesford M.J. (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J.Exp.Bot.* 55, 1765-1773.

Burgess B.K., Lowe D.J. (1996) Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev* 96, 2983–3012.

Byrne R.S., Hänsch R., Mendel, R.R., Hille R. (2009) The oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. Generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. *J Biol Chem* 284, 35479-35484.

Campbell, W.H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 277-303.

Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E.L., Girke T., Raikhel N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unpredicted proteins. *Plant Cell* 16, 3285-3303.

Church G.M., Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 81, 1991-1995.

Claros M., Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences *Eur J Biochem* 241, 779-786

Delgado M.J., Tresierra-Ayala A., Talbi C., Bedmar E.J. (2006) Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* modA and modB genes involved in molybdenum transport. *Microbiology* 152, 199-207.

Dietzel U., Kuper J, Doebbler J.A., Schulte A., Truglio J.J., Leimkühler S., Kisker C. (2009) Mechanism of Substrate and Inhibitor Binding of *Rhodobacter capsulatus* Xanthine Dehydrogenase. J Biol Chem 284, 8768–8776.

Dudev T., Lim C. (2004) Oxyanion Selectivity in Sulfate and Molybdate Transport Proteins: An ab Initio/CDM Study. J. Am. Chem. Soc. 126, 10296–10305.

Einsle O., Tezcan F.A., Andrade S.L.A., Schmid B., Yoshida M., Howard J.B., Rees D.C. (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. Science 297, 1696–1700.

Emmerlich V., Linka N., Reinhold T., Hurth M.A., Traub M., Martionioia E., Neuhaus H.E. (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 11122-11126.

Etxeberria E., Baroja-Fernandez E., Munoz F.J., Pozueta-Romero J. (2005) Sucrose-inducible endocytosis as a mechanism for nutrient uptake in heterotrophic plant cells. Plant Cell Physiol 46, 474-481.

Feifer I. (2008) Molekularphysiologische Charakterisierung der putativen Sulfat-Transportproteine Sultr 5.1 und Sultr 5.2 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, TU Kaiserslautern

Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 137, 266-267.

Fitzpatrick K.L., Tyerman S.D., Kaiser B.N. (2008) Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. FEBS Letters, 582 (10), 1508-1513.

Forde B.G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochimica et Biophysica Acta 1465, 219-235.

Greenwood J.S., Bewley J.D. (1984) Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean: a possibility for its synthesis in the cytoplasm prior to deposition within protein bodies. Planta 160, 113-120.

Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. (1985) Nitrate Inhibition of Chloride Influx in Barley: Implications for a Proposed Chloride Homeostate. *Journal of Experimental Botany*, 36;165, 556-566.

Hänsch R., Lang C., Rennenberg H. Mendel R. R. (2007) Significance of Plant Sulfite Oxidase. *Plant Biol* 9, 589-595.

Hale K., McGrath S.P., Lombi E., Stack S.M., Terry N., Pickering I.J., George G.N., Pilon-Smits E.A.H. (2001) Molybdenum Sequestration in Brassica Species. A Role for Anthocyanins? *Plant Physiology*, 126, 1391–1402.

Hawkesford M.J. (2003) Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family — redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* 117, 155 - 163.

Heldt H.W. (2003) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag Berlin, Heidelberg 3. Auflage.

Heuwinkel H., Kirkby E.A., Le Bot J., Marschner H. (1992) Phosphorus deficiency enhances molybdenum uptake by tomato plants. *Journal of Plant Nutrition*, Volume 15 (5), 549-568.

Himmelblau E. and Amasino R.M. (2001) Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis during leaf senescence. *J Plant Physiol*, 158, 1317-1323.

Hörtensteiner S. (2006) Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 55–77.

Igarashi Y., Aoki K.F., Mamitsuka H., Kuma K., Kanehisa M. (2004) The evolutionary repertoires of the eukaryotic-type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol* 21(11), 2149-2160.

Imperial J., Hadi M., Amy N.K. (1998) Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system, *Biochim Biophys Acta* 1370, 337–346.

- Janvier K., Kato Y., Boehm M., Rose J.R., Martina J.A., Kim B.Y., Venkatesan S., Bonifacino J.S. (2003)** Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J. Cell Biol.* 163, 1281-1290.
- Johnson J.L., Rajagopalan K.V. (1982)** Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6856-6860.
- Kataoka T., Watanabe-Takahashi A., Hayashi N., Ohnishi M., Mimura T., Buchner P., Hawkesford M.J., Yamaya T., and Takahashi H. (2004)** Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2693-2704
- Kaiser WM, Huber SC (2001)** Physiology and Ecology of Plants under Stress. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany.* 52: 1981-1989.
- Kertesz, M. A. (2001)** Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res Microbiol* 152, 279–290.
- Kretschmer M., Leroch M., Mosbach A., Walker A.S., Fillinger S., Mernke D., Schoonbeek H.J, Pradier J.M., Leroux P., De Waard M.A., Hahn M. (2009)** Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* 5, e1000696.
- Kruse T., Gehl C., Geisler M., Lehrke M., Ringel P., Hallier S., Hänsch R. Mendel R.R. (2010)** Identification and biochemical characterization of molybdenum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 285, 6623-6635.
- Lee J.H., Wendt J.C., Shanmugam K.T., (1990)** Identification of a new gene, molR, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 2079–2087.
- Lepora N. (2007)** Molybdenum. Marshall Cavendish Benchmark, Tarrytown, NY
- Llamas A., Kalakoutskii K.L. (2000)** Molybdenum cofactor amounts in *Chlamydomonas reinhardtii* depend on the Nit5 gene function related to molybdate transport. *Plant, Cell & Environment*, Volume 23 Issue 11, 1247-1255.

Loes E.B., Hagedoorna P.L., Hagen W.R. (2009) The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coordination Chemistry Reviews* 253, 269-290.

Marmagne A., Rouet M., Ferro M., Rolland N., Alcon C., Joyard J., Garin J., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G. (2004) Identification of New Intrinsic Proteins in Arabidopsis Plasma Membrane Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 675-691.

Marschner H. (1995) Mineral nutrition in higher plants. New York: Academic Press

Mendel,R.R. (1997) Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* 203, 399-405.

Mendel R.R., Bittner F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 621-635.

Mendel R.R. (2007) Biology of the molybdenum cofactor. *Journal of Experimental Botany* 58, 2289-2296.

Moura J.J.G., Brondino C.D., José Trincão J.,Romão M.J. (2004) Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9, 791-799.

Morita,M., Shitan,N., Sawada,K., Van Montagu,M.C., Inze,D., Rischer,H., Goossens,A., Oksman-Caldentey,K.M., Moriyama,Y., and Yazaki,K. (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2447-2452.

Nelson B.K., Cai X., Nebenführ A. (2007) A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* 51, 1126–1136.

Otegui M.S., Crap R., Staehelin L.A. (2002) Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuolae and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 14, 1311-1327.

Pachmayr F. (1960) Vorkommen und Bestimmungen von Schwefel in Mineralwasser. Dissertation, München

Pau R.N. und Lawson D.M. (2002) Transport, homeostasis, regulation, and binding of molybdate and tungstate to proteins. *Met. Ions Biol. Syst.* 39, 31–74.

Peiter E., Montanini B., Gobert A., Pedas P., Husted S., Maathuis F.J., Blaudez D., Chalot M., and Sanders D. (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8532-8537.

Poirier Y., Bucher M. (2002) Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists

Reddy KJ, Munn LC, Wang L. (1997). Chemistry and mineralogy of molybdenum in soils. In: Gupta UC, ed. *Molybdenum in agriculture*. Cambridge: Cambridge University Press.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Scheible W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K., Stitt M. (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol* 136, 2483-2499.

Schneider S., Beyhl D., Hedrich R., Sauer N. (2008) Functional and physiological characterization of Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol. *Plant Cell* 20, 1073-1087.

Schwarz G., Mendel R.R., Ribbe M.W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460, 839-847.

Self W.T., Grunden A.M., Hasona A., Shanmugam K.T. (2001) Molybdate transport. *Res.Microbiol.* 152, 311-321.

Shaw S., Jayatilleke E. (1990) The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem J*, 268, 579-583.

Shibagaki N. and Grossman A.R. (2004) Probing the function of STAS domains of the Arabidopsis sulfate transporters. *J Biol Chem*. 279, 30791-30799.

Simpson S.D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*, 33, 259-270.

Smarelli J., Campbell W.H. (1983) Heavy metal inactivation and chelator stimulation of higher plant nitrate reductase. *Biochim Biophys Acta* 742, 435-445.

Takahashi H., Asanuma W., and Saito K. (1999) Gene note. Cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a chloroplast localizing sulphate transporter isoform. *J Exp Bot*. 50, 1713-1714.

Tejada-Jiménez M., Llamas A., Sanz-Luque E., Galván A., Fernández E. (2007) A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20126–20130.

Tomatsu H., Takano J., Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Shibagaki N., Fujiwara T. (2007) An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18807–18812.

Trentmann O., Horn M., Terwisscha van Scheltinga A.C., Neuhaus H.E., Haferkamp I. (2007) Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from Chlamydiae. *PLoS Biol* 5(9), e231.

van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flügge U.I., Kunze R. (2006) Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol*. 141, 776-792.

Wentd U.K., Wenderoth I., Tegeder A., Von S.A. (2000) Molecular Charakterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato. *Plant J*. 23, 723-733.

Wormit A., Trentmann O., Feifer I., Lohr C., Tjaden J., Meyer S., Schmidt U., Martinoia E., Neuhaus H.E. (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* 18, 3476-3490.

Yamada K., Osakabe Y., Mizoi J., Nakashima K., Fujita Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010) Functional Analysis of an *Arabidopsis thaliana* Abiotic Stress-inducible Facilitated Diffusion Transporter for Monosaccharides. *J Biol Chem* 285, 1138-1146.

Zarepour M., Kaspari K., Stagge S., Rethmeier R., Mendel R.R, Bittner F. (2010) Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity *Plant Molecular Biology* 72, 301-310.

Zhang Y., Gladyshev V.N. (2008) Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization *J Mol Biol*, 379, 881-899.

7. Anhang

7.1 Aminosäurealignment der Sequenzen von MOT1 und MOT2

Die Aminosäuresequenzen wurden mittels ClustalW (<http://www.expasy.ch/tools>) verglichen. Die Symbole bedeuten gleiche Aminosäure (*) sowie Aminosäuren mit mehreren (:) oder einer (.) gleichen chemischen Eigenschaft.

```

MOT1      MESQSQRGQHETPKRSRFTGMFHKLKTNLVFRSKLAEINGAMGDLGTYIPIVLALTLAKD 60
MOT2      METTTTP--LLPGDRSRCGWLRRLRLKKNPLSS---ELSGAVGDLGTFIPIVLTTLVSN 55
          **: :      . .***      : ::*: : : *   *:.**:*:*:*:*:*:*:*:*:.:

MOT1      LDLGTTLIFTGIYNAITGAVYGVPMVPQPMKSIAAAVAISSTAEDFGIPEIMAAGICTGGI 120
MOT2      LDLSTTLIFTGFYNIATGLLFDIPMPVQPMKSIAAAVAVS-ESPHLTPSQIAAAGASTAAT 114
          ***.*****:* *  * :.:*****:* : .: .:* ** .*.

MOT1      LFLVGLISGLMQLVFNIIPVVRGIQLSQGLAFAMSAVKYIRKEQNFSSK-SVGDRPWL 179
MOT2      LLLLGATGAMSFYNIIPVVRGVQLSQGLQFAFTAICYVRFNYDTATLKPSSSPRIWL 174
          *.:** :* *.:*:*****.*****:*:*:*:* : : .: * * . * **

MOT1      GLDGLVLAALVCVLFIVLVNGDGESEEEEE---EGDGSRGRGRWGSVRKVIANVPSALLI 235
MOT2      GLDGLLILALAALLFIILSTGSGNDREAEDGDLAETSSNESQSRRLRLR-LLSSIPSALIV 233
          *****:*:*:.:***:* .*.*:.* *:   * .....* : * :.:*:*:*:.:

MOT1      FLLGVVLAFAFIRKPSIVHDIKFGPSKMKIVRISRKAWRNGFLKGTVPQLPLSVLNSVAVC 295
MOT2      FALGLVLCFIRDPSIFKDLKFGPSKHFILRISWDDWKIGFLRAAIPQIPLSVLNSVIAVC 293
          * **:**.***.***.:*:*****.:*:** . *: ***.:*:*:*****:*

MOT1      KLSYDLFPEKEFSAASVSMTVGLMNMVGCWFGAMPVCHGAGGLAGQYKFGGRSGGCVALL 355
MOT2      KLSNDLF-DKELSATTVISVGMNLIWCWFGAMPVCHGAGGLAGQYRFGARSGLSVIFL 352
          *** ** :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*****.*****:**.*** .* :*

MOT1      GVAKLVGLVGLGGSLVGILEKFPVGVLGALLLFAGVELAMAARDMNTKGDVFLMCTSV 415
MOT2      GIGKLIVGLVFGNSFVRILSQFPIGILGVLLLFAGIELAMASKDMNSKEDSFIMLVCAAV 412
          *.:**:*:*:*:*.*:* * *.:*:*:*.*****.*****.:*:* * *:*:*:*:.:

MOT1      SLG-SNAAGFVAGDLLYVVLWMRNYGRAKPSLPPQSGEHA----- 456
MOT2      SMTGSSAALGFGCVLYLLKLRLDCSSVTLFSRSSDESQVDSEAAPRDV 464
          *:  *.*:* * . * :*:*: :* . . : .: .*.

```

7.2 Symbole für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7.3 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
AP	Alkalische Phosphatase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bsp.	beispielsweise
C	Cytosin

°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH ₃ COOH	Essigsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
d	desoxy
dATP	2'-Desoxyadenintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Flavindinukleotid
FE	Flächeneinheit(en)
FeMo	Eisen-Molybdän
G	Guanin
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamat
GTP	Guanosintriphosphat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₃ BO ₃	Borsäure
HNO ₃	Salpetersäure

ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy
I ₂ /KI	Jod-Kaliumjodid-Lösung
kb	Kilobase(n)
KCH ₃ CO ₂	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kompmot2	Komplementation der mot2-„knock-out“-Pflanze (T-DNA-Insertion im <i>MOT2</i> -Gen) mit dem nativen <i>MOT2</i> -Gen
λ (Lambda)	Wellenlänge
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro
m	milli
mm	Millimeter
M	molar
Mbp	Megabasenpaare
MCS	„multiple cloning site“
MCP	“ <u>M</u> oco <u>C</u> arrier <u>P</u> rotein”
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
Mo	Molybdat
MoBP	<u>M</u> oco <u>B</u> inde <u>P</u> rotein
Moco	<u>M</u> olybdän- <u>C</u> ofaktor
mol	Einheit für die Stoffmenge
MoO ₄ ²⁻	Molybdat-Anion
MOPS	2-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPT	Molybdopterin
MPT-AMP	adenyliertes Molybdopterin
MOT1	<u>M</u> olybdät <u>T</u> ransporter 1
MOT2	putativer <u>M</u> olybdät <u>T</u> ransporter 2
<i>MOT1</i>	Gen, kodiert für <u>M</u> olybdät <u>T</u> ransporter 1
<i>MOT2</i>	Gen, kodiert für den putativen <u>M</u> olybdät <u>T</u> ransporter 2

mot1	„knock-out“-Pflanze, T-DNA-Insertion im <i>MOT1</i> -Gen
mot2	„knock-out“-Pflanze, T-DNA-Insertion im <i>MOT2</i> -Gen
mot1,2	„knock-out“-Pflanze, T-DNA-Insertion im <i>MOT1</i> - und <i>MOT2</i> -Gen
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
n	nano
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-dinukleotid, reduzierte Form
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniumheptamolybdat
NO ₂ ⁻	Nitrit-Ion
NO ₃ ⁻	Nitrat-Ion
nm	Nanometer
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ψ	Psi
³² P	radioaktives Phosphat
pBSK	pBluescript (SK), Klonierungsvektor
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pET	Expressionsvektor
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
p	pico
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	„messenger“-RNA
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minuten
RT	Raumtemperatur

SDS	Natrium-(„sodium“-)-dodecylsulfat
s	Sekunde(n)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
Tet	Tetrazyklin
TMT	Tonoplastic Monosaccharide Transporter
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit : Mengenangabe bei Enzymen)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozente
w/v	Gewichtsprozente
WT	Wildtyp

Beiträge zu Fachtagungen

- 09/2009 Botanikertagung 2009 in Leipzig
- Poster: Identification of Two Intracellular Molybdate Transport Proteins in Arabidopsis
-
- 12/2008 Seminar des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern in Altleinigen
- Vortrag: Two Vacuolar Molybdate Transporters in Arabidopsis: One for Import and One for Export

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Unterstützung dieser Arbeit sowie für die wissenschaftliche Ausbildung.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Erstellung des Zweit-Gutachtens und für die Mitbenutzung einiger Laborgeräte sowie bei Herrn Prof. Dr. Joachim Deitmer für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ganz besonders möchte ich Dr. Oliver Trentmann für die Betreuung der letzten Jahre und die Korrektur der Arbeit danken. Deine antreibende Art konnte mich einige Male anfeuern.

Auch Dr. Benjamin Jung gilt ein herzliches Dankeschön für die Zusammenarbeit im Labor, die Korrektur der Arbeit sowie die fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen. Deine Einladungen zum Betzter waren extrem prägend!

Bei Dr. Torsten Möhlmann, Dr. Ilka Haferkamp und Dr. Michelle Ast möchte ich mich für die permanente und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bedanken.

Dr. Ingmar Feifer danke ich für die Bereitstellung der Pflanzenlinien.

Ein großes Dankeschön muss ich auch an Sandra Klaumann aussprechen, die im Zuge Ihrer Diplomarbeit eine große Hilfe bei vielen Experimenten dieser Arbeit war. Auch Deine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft wie zuletzt bei der Korrektur dieser Arbeit oder unser Klima im Labor haben mir sehr geholfen.

Dank gilt auch Stefanie Klär für Ihre praktische Unterstützung.

Auch die vielen Hilfestellungen von Wolfgang, Ruth, Sarah, Sabrina, Ute und auch Christa haben mir das Leben erleichtert. Herzlich danke ich auch Tanja, Rieder Gerd, Carsten, Steffi, Julia, sowie den „jungen Wilden“ Patrick, Benne und Hasi für die schöne Atmosphäre der letzten Jahre.

Für ihre fachliche Unterstützung gilt weiterhin Dr. Florian Bittner und Prof. Dr. Ralf Mendel, Dr. Sabine Schneider und Prof. Dr. Norbert Sauer sowie Dr. Aleksandra Trampcynska und Prof. Dr. Stephan Clemens besonderer Dank

Aber nicht nur im Labor konnte ich mich auf tolle Leute verlassen. Für die Aufnahme in die Lautrer Musikszene muss ich mich aus vollem Herzen bei den Painted Dogs Kai, Tommy und Helmut sowie Hermann und Andreas bedanken.

Auch die Jungs von Angerstation, Kai (dem kann ich nicht oft genug danken) Gallé, Niels und Giesi, haben mich mit einer tollen Zeit auf (und abseits) der Bühne sehr unterstützt.

Und natürlich danke ich auch Bibi, Andrea und allen anderen Lautrern, die ich in den vergangenen acht Jahren kennenlernen durfte.

Zuguterletzt gilt der größte Dank meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke.

Lebenslauf

Name	Andreas Gasber
Geburtsdatum	27.04.1982
Geburtsort	Trier
Familienstand	ledig
Schullaufbahn	
08/1988-06/1992	Grundschule Kenn
08/1992-06/2001	Max Planck Gymnasium Trier Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
07/2001-04/2002	Caritas Sozialstation am Dom in Trier
Studium	
10/2002-05/2007	Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern
09/2006-05/2007	Diplomarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Neuhaus Titel: Biochemische und physiologische Charakterisierung pflanzlicher Dikarbonsäuretransporter
Promotion	
06/2007-heute	Promotion an der TU Kaiserslautern in der Abteilung Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Neuhaus Thema: Physiologische Charakterisierung zweier intrazellulärer Molybdätrahtransporter in Arabidopsis

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 Juni 2010

Andreas Gasber