

**Charakterisierung von ausgewählten
Protein-Phosphatasen und MATE-Proteinen
aus *Arabidopsis thaliana***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Molekularbiologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Klaus Pellengahr

Oktober 2004

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in
Golm und am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Müller-Röber angefertigt.

meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	i
	Abkürzungsverzeichnis.....	v
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	vii
I.	Einleitung.....	1
I.1.	Schließzellen dienen als Modellsystem zum Verständnis pflanzlicher Zellfunktion.....	1
I.1.1.	Die Schließzellbewegung wird durch den Membrantransport von Ionen gesteuert.....	2
I.1.2.	Wichtige Signalmoleküle innerhalb der Schließzelle.....	4
I.1.2.1.	Kalzium fungiert als zentrales Signalmolekül in der Schließzelle.....	4
I.1.2.2.	ROS und NO.....	5
I.1.2.3.	PIP, IP und cADPR.....	5
I.1.3.	Weitere Proteine mit wichtigen Funktionen in Schließzellen.....	6
I.1.4.	Beeinflussung der Schließzellfunktion durch posttranslationale Modifikationen.....	6
I.1.4.1.	Einfluss von Farnesylierung auf die stomatäre Signaltransduktion.....	6
I.1.4.2.	Einfluss von Protein-Kinasen auf die stomatäre Signaltransduktion.....	7
I.1.4.3.	Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die stomatäre Signaltransduktion...	8
I.1.5.	Zielsetzung (PP-Teil).....	10
I.2.	Membranproteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
I.2.1.	Translokatoren und Kanalproteine.....	12
I.2.2.	Membranprotein-Familien aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
I.2.3.	Die MATE-Familie von Membranproteinen.....	15
I.2.4.	Zielsetzung (MATE-Teil).....	16
II.	Material und Methoden.....	17
II.1.	Chemikalien.....	17
II.2.	Reaktionskits.....	17
II.3.	Enzyme.....	17
II.4.	Pflanzen.....	18
II.5.	<i>Xenopus laevis</i>	18
II.6.	Bakterien- und Hefestämme.....	18
II.7.	Oligonukleotide.....	19
II.8.	Vektoren.....	21

II.9.	Puffer, Lösungen und Medien.....	21
II.10.	Programme und Datenbanken zur <i>in silico</i> Analyse.....	22
II.11.	Auftrennung, Modifikation und Klonierung von DNA	23
II.12.	Präparation von DNA und RNA aus pflanzlichen Geweben.....	23
II.13.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
II.14.	Präparation von RNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
II.15.	PCR.....	24
II.16.	<i>In vitro</i> Transkription.....	24
II.17.	cDNA-Synthese.....	24
II.18.	RNA-Blot Analyse.....	25
II.19.	Transformation von <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> und <i>S. cerevisiae</i>	25
II.20.	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
II.21.	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
II.22.	GUS-Färbung.....	26
II.23.	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	26
II.24.	Injektion von cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	26
III.	Ergebnisse.....	27
III.1.	Charakterisierung ausgewählter Protein-Phosphatasen aus <i>A. thaliana</i>	27
III.1.1.	TOPP2.....	
III.1.1.1.	RNA-Blot Analyse der Expression von EST74 und <i>TOPP2</i>	27
III.1.1.2.	Expressionsanalyse von <i>TOPP2</i> mittels Promotor-GUS Fusionen.....	29
III.1.1.3.	Reduktion der <i>TOPP2</i> -Genaktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
III.1.2.	Identifikation und Charakterisierung weiterer Protein-Phosphatasen aus EF.....	34
III.1.2.1.	Screeningstrategie.....	34
III.1.2.2.	Isolation neuer PP-Transkripte aus EF.....	35
III.1.2.3.	Untersuchung der zellulären Expression von <i>TOPP1</i> , <i>TOPP5</i> , <i>STH1</i> und <i>STH2</i>	37
III.1.2.3.1.	Analyse von <i>TOPP1</i> - und <i>TOPP5</i> -Promotor vermittelter <i>gusA</i> -Expression	38
III.1.2.3.2.	Analyse von <i>STH1</i> - und <i>STH2</i> -Promotor vermittelter <i>gusA</i> -Expression.....	40
III.1.3.	Identifikation und Analyse von <i>STH1</i> -Insertionsmutanten.....	42
III.2.	Identifikation und Charakterisierung von Membranproteinen der NIC-Familie	45
III.2.1.	Identifikation von NIC1.....	45
III.2.1.1.	Klonierung eines EF-spezifischen PCR-Produkts.....	45

III.2.1.2.	<i>In silico</i> Analyse von Fragment 9-4.....	46
III.2.1.3.	Homologie von NIC1 zu Proteinen aus <i>A. thaliana</i> und anderen Organismen.....	47
III.2.1.4.	Klonierung von <i>NIC1</i>	53
III.2.2.	Heterologe Expression von NIC1 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	54
III.2.2.1.	NIC1 induziert spannungsabhängige Ströme in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten..	54
III.2.2.2.	Chlorid-Abhängigkeit der NIC1-induzierten Ströme in <i>X. laevis</i> Oozyten.....	56
III.2.2.3.	Inhibition NIC1-induzierter Ströme durch Lanthan- und Gadoliniumionen....	58
III.2.2.4.	NIC4-induzierte Ströme in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	59
III.2.3.	Heterologe Expression von NIC1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
III.2.3.1.	Untersuchung der Salztoleranz des Hefestamms Y04177.....	59
III.2.3.2.	Expression von NIC1 im Hefestamm Y00000.....	61
III.2.3.3.	Untersuchung der Salztoleranz von NIC1-exprimierenden Hefestämmen....	61
III.2.3.4.	Die Mutation G326T in NIC1 beeinflusst den „Lithium-Phänotyp“.....	64
III.2.3.5.	Einfluss von NIC2- und NIC4-Expression auf die Salztoleranz von Hefen...	66
III.2.4.	Modulation und Lokalisation der NIC1-Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	67
III.2.4.1.	Lokalisation der NIC1-Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
III.2.4.2.	Veränderung der <i>NIC1</i> -Genaktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
III.2.5.	T-DNA Insertionsmutanten von MATE-Genen aus <i>A. thaliana</i> : Kultivierung und erste Charakterisierung von neun GABI-KAT Linien.....	73
IV.	Diskussion.....	77
IV.1.	Charakterisierung der PP-Gene <i>TOPP1</i> , <i>TOPP2</i> , <i>TOPP5</i> , <i>STH1</i> und <i>STH2</i>	77
IV.1.1.	Expressionsanalyse von <i>TOPP2</i>	77
IV.1.2.	Analyse der <i>TOPP2</i> -RNAi Pflanzen.....	78
IV.1.3.	Screeningansatz zur Identifikation von PP-Transkripten aus EF.....	80
IV.1.4.	Charakterisierung der Expression von <i>TOPP1</i>	81
IV.1.5.	Charakterisierung der Expression von <i>TOPP5</i>	82
IV.1.6.	Charakterisierung der Expression von <i>STH1</i> und <i>STH2</i>	82
IV.1.7.	Analyse der <i>STH1</i> -Insertionsmutanten.....	83
IV.2.	Charakterisierung von NIC1 und weiteren MATE-Proteinen aus <i>A. thaliana</i>	84
IV.2.1	Das EF-spezifische Fragment 9-4 führte zur Klonierung von <i>NIC1</i>	84
IV.2.2	NIC-Proteine lassen sich in <i>S. cerevisiae</i> und <i>X. laevis</i> Oozyten charakterisieren.....	85
IV.2.3.	NIC1 wird hauptsächlich im vaskulären Gewebe exprimiert.....	90
IV.2.4.	NIC1 beeinflusst die Entwicklungsgeschwindigkeit der Pflanzen.....	91
IV.2.5.	Untersuchung von Insertionsmutanten weiterer MATE-Gene.....	93

V.	Zusammenfassung.....	94
VI.	Literatur.....	98
	Danksagung.....	108
	Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
$\alpha^{32}\text{P}$	Phosphorisotop der relativen Masse 32
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
CIP	Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et. al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
M	Mol / Liter
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunden
N_2 liq.	flüssiger Stickstoff
OD_x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm

Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris und Trizma Base	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Trizma Hydrochlorid	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent vom Volumen
w/v	Gewichtsprozent vom Volumen
wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-GlcA	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> (Afrikanischer Krallenfrosch)

Aminosäuren:

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

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. I.1.	Beeinflussung der Stomatabewegung durch den Membrantransport von Ionen und die Kalziumkonzentration im Cytosol der Schließzellen.....	3
Tab. I.1.	Funktionell charakterisierte Serin/Threonin-PK aus Schließzellen.....	8
Tab. I.2.	Eigenschaften von Serin/Threonin-modifizierenden PP aus Pflanzen.....	9
Tab. I.3.	Wirkung der Inhibitoren OA und CA in pflanzlichen Schließzellen.....	10
Tab. 1.4.	Studien zu Membranproteinfamilien aus <i>A. thaliana</i> (seit 1998).....	13
Abb. III.1.	RNA-Blot Analyse von <i>TOPP2</i> und <i>EST74</i> in EF und Gesamtblatt.....	28
Abb. III.2.	Klonierung von <i>TOPP2</i> -Promotorelementen in pCAMBIA1303.....	29
Abb. III.3.	<i>TOPP2</i> -Promotor vermittelte Expression von GUS in transgenen Pflanzen.....	30
Abb. III.4.	Herstellung eines <i>TOPP2</i> -spezifischen RNAi-Konstrukts.....	31
Abb. III.5.	Blattphänotypen von <i>TOPP2</i> -RNAi Pflanzen.....	32
Abb. III.6.	RNA-Blot Analyse und Phänotyp von Pflanzen mit verminderter <i>TOPP2</i> -Genaktivität.....	33
Abb. III.7.	Screeningansatz zur Isolation von PP-cDNAs aus EF.....	34
Abb. III.8.	Im Screeningansatz mit degenerierten Primern isoliert cDNAs aus EF.....	35
Abb. III.9.	Aminosäuresequenzen der klonierten <i>STH</i> -Fragmente und Homologie zu anderen Proteinen.....	36
Abb. III.10.	Promotor- <i>gusA</i> Fusionen von <i>TOPP1</i> , <i>TOPP5</i> , <i>STH1</i> und <i>STH2</i>	37
Tab. III.1.	<i>TOPP1</i> -, <i>TOPP2</i> - und <i>TOPP5</i> -Promotor vermittelte GUS-Aktivitäten.....	38
Abb. III.11.	<i>TOPP1</i> -Promotor gesteuerte Expression von <i>gusA</i> in transgenen Pflanzen.....	39
Abb. III.12.	<i>TOPP5</i> -Promotor gesteuerte Expression von <i>gusA</i> in transgenen Pflanzen.....	40
Tab. III.2.	<i>STH1</i> - und <i>STH2</i> -Promotor vermittelte GUS-Aktivitäten.....	41
Abb. III.13.	<i>STH1</i> -Promotor gesteuerte Expression von <i>gusA</i> in transgenen Pflanzen.....	41
Abb. III.14.	<i>STH2</i> -Promotor gesteuerte Expression von <i>gusA</i> in transgenen Pflanzen.....	42
Abb. III.15.	Phänotyp von drei F1-Pflanzen einer T-DNA Insertionsmutante von <i>STH1</i>	43
Abb. III.16.	PCR-Analyse zur Identifikation von T-DNA Insertionen in <i>STH1</i> -Allelen...	44
Abb. III.17.	Identifikation eines EF-spezifischen Transkripts.....	46
Abb. III.18.	Verwandtschaft von NIC1 zu MATE-Proteinen aus <i>A. thaliana</i> und anderen Organismen.....	48

Abb. III.19.	Homologie von NIC1 zu 55 weiteren MATE-Sequenzen aus <i>A. thaliana</i> .	49
Abb. III.20.	Sequenzvergleich der acht NIC-Proteine mit TT12, ALF5, DTX1, EDS5 und FRD3.....	51
Abb. III.21.	Vergleich der Hydrophilizitätsprofile der acht NIC-Proteine.....	52
Abb. III.22.	Modell zur Orientierung von NIC1 in der Membran.....	53
Abb. III.23.	NIC1-Aktivität bei heterologer Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	55
Abb. III.24.	Chloridabhängige Stromantworten von NIC1-exprimierenden <i>X. laevis</i> Oozyten.....	56
Abb. III.25.	Chlorid-Abhängigkeit der NIC1-induzierten Tail-Ströme in <i>X. laevis</i> Oozyten.....	57
Abb. III.26.	Lineare Abhängigkeit zwischen der maximalen Amplitude der NIC1-induzierten Tail-Ströme und dem Logarithmus der Chloridkonzentration im Messpuffer.....	57
Abb. III.27.	Inhibition der NIC1-induzierten Ströme durch mikromolare Konzentrationen von La^{3+} oder Ga^{3+}	58
Abb. III.28.	Phänotyp von Hefestamm Y04177 und Expression von NIC1 in Hefestamm Y00000.....	62
Abb. III.29.	NIC1-Expression in <i>S. cerevisiae</i> vermittelt erhöhte Lithiumtoleranz.....	63
Abb. III.30.	NIC1-Expression in <i>S. cerevisiae</i> erhöht die Natriumsensitivität.....	64
Abb. III.31.	Mutation der Aminosäuresequenz RVNELGA zu RVNELTA.....	65
Abb. III.32.	Aminosäuremutation G326T erhöht die NIC1-vermittelte Lithiumtoleranz in <i>S. cerevisiae</i>	66
Abb. III.33.	Klonierung von zwei <i>NIC1</i> -Promotorfragmenten in pCAMBIA1303.....	67
Abb. III.34.	<i>NIC1</i> -Promotor vermittelte Expression von GUS in transgenen Pflanzen	68
Abb. III.35.	Klonierung von <i>NIC1</i> in „sense“- und „antisense“-Orientierung in pCAMBIA 1302.....	69
Abb. III.36.	Phänotypen und RNA-Blot Analysen der Pflanzen #12, #3 (Linie S7) und #2, #30 (Linie S52).....	71
Abb. III.37.	Phänotypen und RNA-Blot Analysen der Pflanzen #33 (Linie S100) und #8 (Linie S61).....	72
Abb. III.38.	Phänotypen der Pflanzen #1, #7 und #11 (F1-Pflanzen der Linie D12)....	74
Abb. III.39.	Vorgehensweise und Ergebnisse der PCR-Analysen von F1-Pflanzen der Linie D12.....	75
Abb. III.40.	Brassinolidbehandlung von F1-Pflanzen der Linie D12.....	76
Abb. IV.1.	Übersicht potenzieller Substrate von MATE-Proteinen.....	85
Tab. IV.1.	Substratspektren beschriebener MATE-Proteine.....	86

I. Einleitung

Die Identifikation und Charakterisierung von spezifisch exprimierten Genen und Proteinen ist von zentraler Bedeutung zum Verständnis der Funktion einzelner Gewebe innerhalb einer Pflanze. Die Untersuchung von schließzellspezifischen Genen und Proteinen bildet deshalb einen Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe Müller-Röber (Müller-Röber *et al.*, 1995 und 1998; Menke *et al.*, 2000; Plesch *et al.*, 2000 und 2001). Jeweils zwei Schließzellen bilden als hoch spezialisierte Zellen innerhalb der Epidermis eine Spaltöffnung, durch die der Wasser- und Gasaustausch zwischen Pflanze und Atmosphäre stattfindet. Auf diese Weise sind sie an Transpiration und Photosynthese beteiligt und beeinflussen zwei der wichtigsten Prozesse innerhalb Höherer Pflanzen (Blatt, 2000). Über 95 % der gesamten Wasserabgabe der Pflanze findet durch die Spaltöffnungen statt (Schroeder *et al.*, 2001), und auch der größte Teil des zur Photosynthese benötigten Kohlendioxids wird durch sie aufgenommen. Der erste Teil der Einleitung (I.1.) fasst wichtige Eigenschaften der Schließzellen zusammen und schildert die bisher erst ansatzweise verstandene Rolle von Protein-Kinasen (PK) und Protein-Phosphatasen (PP) bei der Signaltransduktion dieser Zellen.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Einleitung steht NIC1, ein Protein, welches zu einer neuen Familie pflanzlicher Membranproteine gehört. Zum Zeitpunkt der Klonierung der cDNA von *NIC1* war in *Arabidopsis thaliana* für keines der mindestens 56 Mitglieder dieser Familie eine Funktion beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden heterologe Systeme zur Charakterisierung von NIC-Proteinen etabliert und Versuche zum Verständnis der NIC1-Funktion *in planta* unternommen.

Da den beiden Teilen dieser Arbeit unterschiedliche Fragestellungen zugrunde lagen, sind die Einleitung, der Ergebnisteil und die Diskussion entsprechend aufgeteilt. So folgt auf die Abschnitte zur Funktion und Signaltransduktion pflanzlicher Schließzellen (I.1.) im zweiten Teil der Einleitung (I.2.) eine Zusammenfassung wichtiger Studien zu Membranproteinen aus *A. thaliana*. Besonders wird dabei auf die Rolle der MATE-Proteinfamilie eingegangen.

I.1. Schließzellen dienen als Modellsystem zum Verständnis pflanzlicher Zellfunktion

Die Bewegungen der Spaltöffnungen (Stomata) werden durch Volumenänderungen der Schließzellen gesteuert. Eine Zunahme des Volumens erfolgt durch Akkumulation von osmotisch aktiven Substanzen und hat das Öffnen der stomatären Pore zur Folge. Dementsprechend führt der Verlust osmotisch aktiver Substanzen zu einer Volumenreduktion und zum Stomataschluss. Das schnelle Öffnen und Schließen der Stomata als Antwort auf variable Umweltbedingungen und endogene Stimuli ist von großer Bedeutung für das Überleben einer Pflanze. In der Signaltransduktion einer Schließzelle

müssen dabei Wasserstatus, hormonelle Stimuli, Licht, CO₂-Konzentration und andere Umweltbedingungen wahrgenommen und verarbeitet werden (Schroeder *et al.*, 2001). Die Fähigkeit, eine Vielzahl von Signalen aufnehmen und verarbeiten zu können, setzt das Vorhandensein von vielfältigen Rezeptoren und Signalmechanismen voraus. Dieser Umstand und die Möglichkeit, die Reaktion auf verschiedene Stimuli anhand der Stomatabewegung beobachten zu können, haben die Schließzellen zu einem der am besten erforschten pflanzlichen Zelltypen gemacht. Im Folgenden wird geschildert, welche Mechanismen zum Öffnen und Schließen der stomatären Pore führen (I.1.1.) und welche entscheidende Rolle dabei Signalmoleküle wie Kalzium, reaktive Sauerstoffmoleküle, Stickstoffmonoxid, Phosphatidylinositol-Phosphate, Inositol-Phosphate und zyklische ADP-Ribose spielen (I.1.2.). Im anschließenden Abschnitt (I.1.3.) wird zusammengefasst, wie vielfältig die Proteine, für die bereits wichtige Funktionen in Schließzellen beschrieben wurden, sind. Es folgt eine Übersicht der Studien, die zur Rolle von Proteinmodifikationen wie Farnesylierung, Phosphorylierung und Dephosphorylierung in Schließzellen bekannt sind (I.1.4.). Aus den Studien zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung ergab sich die Zielsetzung für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit (I.1.5.).

I.1.1. Die Schließzellbewegung wird durch den Membrantransport von Ionen gesteuert

Sowohl das Pflanzenhormon Auxin (Lohse und Hedrich, 1992) als auch rotes (Serrano *et al.*, 1988) und blaues Licht (Shimazaki *et al.*, 1986; Kinoshita *et al.*, 2001) führen zu H⁺-ATPase vermitteltem Protonenexport durch die Plasmamembran der Schließzelle. Es wird angenommen, dass die Protonenbewegung zu einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran und damit zur Aktivierung einwärts gerichteter Kaliumkanäle führt (Thiel *et al.*, 1992). Der ebenfalls stattfindende Anionenimport in die Schließzelle wird wahrscheinlich durch H⁺/Anionen-Symporter oder OH⁻/Anionen-Antiporter in der Plasmamembran katalysiert (Schroeder *et al.*, 2001). Als weitere osmotisch aktive Substanzen werden Malat und Saccharose beim Öffnen der stomatären Pore in der Schließzelle angereichert (Talbot und Zeiger, 1996). Eine mögliche Funktion beim Transport von Kohlenhydraten in die Schließzelle kommt dabei dem kürzlich beschriebenen Monosaccharid-Symporter AtSPT1 zu (Stadler *et al.*, 2003). Die Akkumulation von Kalium, Anionen und osmotisch aktiven Kohlenstoffverbindungen führt zum Wassereinstrom in die Schließzelle und zu ihrem Anschwellen. Die Induktion der Stomataöffnung durch rotes und blaues Licht läuft dabei parallel mit verstärkter Photosynthese, da Licht dieser Wellenlängen auch vom Chlorophyll absorbiert wird (Assmann und Shimazaki, 1999).

Als Folge von Wassermangel gebildete Abscisinsäure (ABA), Dunkelheit, erhöhte CO₂-Konzentrationen in den Blättern (Assmann, 1999), Pathogenbefall (Lee *et al.*, 1999) oder

starke Luftverschmutzungen (z.B. durch Ozon; Torsethaugen *et al.*, 1999) bewirken ein Schließen der stomatären Pore. In der Schließzelle kommt es zu einem Ansteigen der cytosolischen Kalziumkonzentration und zu einem Efflux von osmotisch aktiven Substanzen. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zur Inaktivierung von H^+ -ATPasen in der Plasmamembran (Kinoshita *et al.*, 1995). Gleichzeitig werden auswärts gerichtete Anionenkanäle aktiviert (Dietrich und Hedrich, 1994). Als Folge der Depolarisierung der Plasmamembran werden die einwärts gerichteten Kaliumkanäle deaktiviert und die auswärts gerichteten Kaliumkanäle aktiviert (Thiel und Wolf, 1997). Der Verlust an osmotisch aktiven Substanzen führt zum Wasserausstrom, die Schließzelle verliert an Turgor und es kommt zum Schluss der stomatären Pore. In Abbildung I.1. werden die wichtigsten Ionenströme und die Rolle von Kalzium beim Öffnen und Schließen einer stomatären Pore dargestellt.

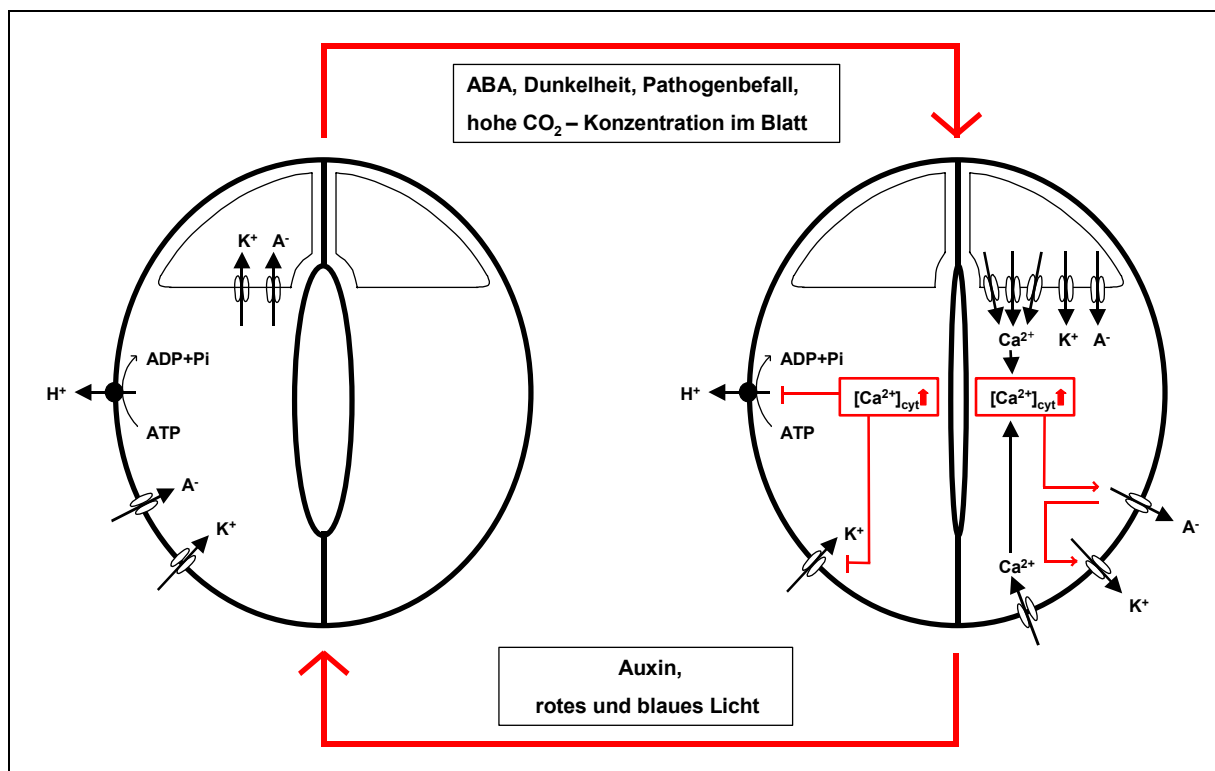


Abb.I.1. Beeinflussung der Stomatabewegung durch den Membrantransport von Ionen und die Kalziumkonzentration im Cytosol der Schließzellen

Dargestellt sind die wichtigsten Transportprozesse von Ionen beim Öffnen (linker Teil der Abbildung) und Schließen (rechter Teil der Abbildung) einer stomatären Pore. Für den Stomataschluss ist außerdem die Rolle der erhöhten cytosolischen Kalziumkonzentration skizziert. Beim Öffnen der Stomata kommt es zu einem H^+ -ATPase-vermittelten Ausstrom von Protonen (H^+) aus dem Cytoplasma der Schließzelle. Die Hyperpolarisierung der Membran führt zur Aktivierung einwärts gerichteter Kalium- (K^+ -) Kanäle. Auch Anionen (A^-) strömen in die Schließzelle. Viele der osmotisch aktiven Substanzen werden anschließend in die Vakuole (jeweils im oberen Teil der Schließzellen zu erkennen) transportiert.

Beim Schluss der stomatären Pore führt eine erhöhte cytosolische Kalziumkonzentration zur Hemmung des Protonenexportes durch H^+ -ATPasen und des Kaliumimports durch einwärts gerichtete Kaliumkanäle. Es kommt zu einer Depolarisierung der Plasmamembran und einer Aktivierung auswärts gerichteter Kaliumkanäle. Als Quelle des cytosolischen Kalziums spielen sowohl endogene Speicher als auch der Kalziumeinstrom von außen

eine Rolle. Die Vakuole ist dabei der am besten untersuchte endogene Kalziumspeicher. Für die Vakuolenmembran wurden verschiedene Kalziumkanäle, die z.B. durch Inositol-3-Phosphat oder zyklische ADP-Ribose (cADPR) aktiviert werden, beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass auch andere Kompartimente der Zelle, wie z.B. das Endoplasmatische Retikulum, als Kalziumspeicher fungieren. Die Vakuole dient ebenfalls für Anionen und Kalium als wichtiger Speicher. Während des Stomataschlusses werden diese Ionen durch Vakuolen- und Cytoplasmamembran nach außen transportiert.

Es konnte gezeigt werden, dass über 90 % des bei Stomataöffnung aufgenommenen Kaliums anschließend in der Vakuole lokalisiert ist (Assmann und Shimazaki, 1999). Dem entsprechend muss es beim Stomataschluss durch die Vakuolenmembran und die Plasmamembran aus der Zelle transportiert werden. Den gleichen Weg nehmen auch osmotisch aktive Substanzen wie Chlorid und Malat (Assmann und Shimazaki, 1999). Sowohl für den Import als auch den Export osmotisch aktiver Substanzen durch die verschiedenen Membransysteme besitzt die Schließzelle neben den einwärts und auswärts gerichteten Kaliumkanälen eine Vielzahl von Transportern und Kanälen, auf die hier nur ansatzweise eingegangen werden kann (für einen Überblick siehe Assmann und Shimazaki, 1999; Schroeder *et al.*, 2001).

I.1.2. Wichtige Signalmoleküle innerhalb der Schließzelle

Viele der Stimuli, die den Öffnungsgrad einer stomatären Pore beeinflussen, führen zuerst innerhalb der Schließzelle zu Konzentrationsänderungen von Signalmolekülen. So hat besonders die cytosolische Kalziumkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf das Schließen der stomatären Pore (Grabov und Blatt, 1998). Studien der letzten Jahre haben außerdem gezeigt, dass reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS; Pei *et al.*, 2000) und Stickstoffmonoxid (NO; Garcia-Mata *et al.*, 2003) eine Rolle in der Signaltransduktion der Schließzellen spielen. Als wichtige Signalmoleküle innerhalb der Schließzelle wurden Phosphatidylinositol-Phosphate (PIP; Jung *et al.*, 2002), Inositol-Phosphate (IP; Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2001) und cADPR (Leckie *et al.*, 1998) beschrieben.

I.1.2.1. Kalzium fungiert als zentrales Signalmolekül in der Schließzelle

Die vier Stimuli ABA, ROS, niedrige Temperatur und externes Kalzium führen zu Oszillationen der cytosolischen Kalziumkonzentration in den Schließzellen von *A. thaliana* (Staxen *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Die Frequenz, Amplitude und Lokalisation dieser Oszillationen haben dabei als „Kalzium-Signatur“ einen wichtigen Einfluss auf die anschließende Reaktion der Stomata (Allen *et al.* 2001). Die zunehmende cytosolische Kalziumkonzentration hat wahrscheinlich sowohl intrazelluläre als auch extrazellulären Quellen. So sind aus vakuolären Membranen von Schließzellen cADPR- und IP-aktivierbare Kalziumkanäle bekannt (Schroeder *et al.*, 2001). Für Kalziumkanäle der Cytoplasma-

membran konnten z.B. Hamilton *et al.* (2000) zeigen, dass diese durch ABA-Behandlung aktiviert werden können. Studien des letzten Jahres führten außerdem zur Identifikation eines Sensors für die extrazellulären Kalziumkonzentrationen an der Zelloberfläche von Schließzellen in *A. thaliana* (Han *et al.*, 2003).

I.1.2.2. ROS und NO

In Schließzellen von *A. thaliana* führte die Inaktivierung der beiden NADPH-Oxidase Untereinheiten AtrbohD und AtrbohF zu einer gestörten Signaltransduktion nach ABA-Behandlung (Kwak *et al.*, 2003). Eine ABA-induzierte Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration und anschließender Stomataschluss waren nicht mehr zu beobachten. Eine externe Gabe von H₂O₂ konnte dieses Defizit ausgleichen. Sie bewirkte einen Stomataschluss und zeigte, dass ROS-Produktion ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion der Schließzelle ist.

Auch für NO ist seit einigen Jahren bekannt, dass es nicht nur bei Säugetieren, sondern auch in Pflanzen eine wichtige Rolle als Signalmolekül spielt (Durner und Klessig, 1999). In Schließzellen von *Vicia faba* hatte eine erhöhte NO-Konzentration Einfluss auf Kalzium-sensitive Ionenkanäle und induzierte den Ausstrom von Kalzium aus intrazellulären Kompartimenten in das Cytosol (Garcia-Mata *et al.*, 2003).

I.1.2.3. PIP, IP und cADPR

Sowohl PIP als auch IP fungieren als wichtige Signalmoleküle in der Schließzelle, die zur Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration führen oder die einwärts gerichteten Kaliumkanäle in der Plasmamembran hemmen (Schroeder *et al.*, 2001). So beeinflusst PIP das Ansteigen der cytosolischen Kalziumkonzentration nach ABA-Behandlung von Schließzellen (Jung *et al.*, 2002) und IP wirkt auf Kalium- und Kalziumkanäle (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2001). Auch cADPR beeinflusst in Schließzellen den Anstieg der cytosolischen Kalziumkonzentration. Es wird vermutet, dass dieses Signalmolekül parallel zu IP agiert und einen Einfluss auf Ryanodin-sensitive Kalziumkanäle der Vakuole hat (Allen *et al.*, 1995; Leckie *et al.*, 1998).

I.1.3. Weitere Proteine mit wichtigen Funktionen in Schließzellen

Im Laufe der letzten Jahre konnten mehrere Proteine, die eine Funktion bei der Regulation pflanzlicher Schließzellen haben, identifiziert werden. Neben Membranproteinen, die den Transport von anorganischen Ionen und weiterer osmotisch aktiver Substanzen katalysieren, oder Enzymen, die zur Synthese und zum Abbau von Signalmolekülen notwendig sind, wurden auch andere Proteinfunktionen beschrieben. So konnte von Leymann *et al.* (1999)

gezeigt werden, dass das Syntaxin Nt-Syr1 aus *Nicotiana tabacum* in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration die Aktivität von Ionenkanälen der Schließzelle beeinflusst. Es ist bekannt, dass Syntaxine die Bewegung und Fusion von Membranvesikeln steuern und deshalb einen großen Einfluss auf die Membranstruktur und Sekretion einer Zelle haben (Leyman et al., 2000). Unklar ist bisher, wo und wie Nt-Syr1 zwischen der ABA-Rezeption und den Ionenkanälen in der Schließzelle agiert. In anderen Studien (Marcus et al., 2001) konnte gezeigt werden, dass auch Tubuline eine essentielle Funktion in der Schließzellorganisation haben und dass die Mikrotubuli einer Schließzelle sich im Tagesverlauf umorganisieren (Fukuda et al., 2000).

Neben Proteinen, die an der Zellstruktur beteiligt sind, wurden auch Proteine aus anderen Bereichen isoliert. So war es z.B. möglich, ein „mRNA-Cap“- Bindeprotein aus *A. thaliana* zu isolieren, welches in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration die Expression von Genen, die für Proteine der Schließzell-Signaltransduktion kodieren, beeinflusst (Hugouvieux et al., 2001). Die hier aufgeführten Beispiele geben nur einen Ausschnitt bereits identifizierter Proteine mit wichtigen Funktionen in Schließzellen wieder (für einen umfassenderen Überblick siehe z.B. Schroeder et al., 2001).

I.1.4. Beeinflussung der Schließzellfunktion durch posttranslationale Modifikationen

Auch in Schließzellen spielen posttranslationale Modifikationen wie Farnesylierungen (I.1.4.1.), Protein-Phosphorylierungen (I.1.4.2.) und Protein-Dephosphorylierungen (I.1.4.3.) eine wichtige Rolle. Die bisher identifizierten Proteine werden im Folgenden kurz vorgestellt.

I.1.4.1. Einfluss von Farnesylierung auf die stomatäre Signaltransduktion

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass neben Glycosylierung, Methylierung oder Phosphorylierung auch Farnesylierung ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion in Pflanzen ist (Nambara und McCourt, 1999). So führte die Inaktivierung der Farnesyltransferase ERA1 oder die Gabe von Farnesyltransferase-Inhibitoren zu einer ABA-Hypersensitivität von Schließzellen (Pei et al., 1998). Es kam zu einer erhöhten Aktivierung von Anionenkanälen in der Plasmamembran und zu einem verstärkten Stomataschluss. Der Verlust der ERA1-Aktivität führte zu vermindertem Wasserverlust und zu einer erhöhten Toleranz der Pflanzen gegenüber Trockenstress.

I.1.4.2. Einfluss von Protein-Kinasen auf die stomatäre Signaltransduktion

Es wird geschätzt, dass ca. ein Drittel aller Proteine einer eukaryotischen Zelle im Laufe ihres Lebens durch Protein-Kinasen (PK) phosphoryliert wird (Zolnierowicz und Bollen,

1999). Als Ort der Phosphorylierung dienen dabei hauptsächlich Serin- oder Threoninreste. So gehen Smith und Walker (1996) davon aus, dass zu 97 % diese beiden Aminosäuren modifiziert werden. Die restlichen Phosphorylierungen in eukaryotischen Zellen erfolgen fast ausschließlich an Tyrosin- und Histidinresten. Alle Serin/Threonin-PK besitzen zwölf konservierte Domänen (Hardie und Hanks, 1995), sind außerhalb dieser Bereiche allerdings sehr variabel und lassen sich in eine Vielzahl von Untergruppen einordnen (Hardie, 1999). Die Sequenzierung von *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) zeigte, dass mit ca. tausend Sequenzen fast vier Prozent aller Gene dieser Pflanze für Serin/Threonin-PK kodieren.

Im Laufe der letzten Jahre wurde immer deutlicher, dass PK auch in pflanzlichen Schließzellen eine wichtige Rolle spielen. In Inhibitorstudien konnte gezeigt werden, dass sie einen Einfluss auf die ABA-induzierte Signaltransduktion haben (Schmidt *et al.*, 1995). Der Einsatz des PK-Inhibitors K252a führte zu einer Verminderung der Aktivität von Anionenkanälen und zu einer Reduktion des ABA-induzierten Stomataschlusses. Pei *et al.* (1996) konnten in elektrophysiologischen Experimenten an Protoplasten von *V. faba* Schließzellen eine PK-abhängige Aktivität von Anionenkanälen beobachten. Die Zugabe des aufgereinigten Proteins AK1 (eine Kalzium-abhängige PK aus *A. thaliana*) führte zur Aktivierung von Chloridkanälen. Für eine weitere Kalzium-abhängige PK (CDPK) aus *V. faba* konnte gezeigt werden, dass sie den einwärts gerichteten Kaliumkanal KAT1 phosphoryliert (Li *et al.*, 1998).

Auch aus Proteinextrakten von Schließzellen wurden aktive PK isoliert. So gelang es Li *et al.* (1996) und Mori *et al.* (1997), eine 48 kDa große PK aus *V. faba* Schließzellen zu isolieren, die keine Abhängigkeit ihrer Aktivität von der cytosolischen Kalziumkonzentration zeigte und die durch ABA induzierbar war. Das entsprechende Gen (*AAPK*) wurde von Li *et al.* (2000) beschrieben. Neben CDPKs und AAPK konnte auch für Mitogen-aktivierbare PK (MAPK) eine Beteiligung an der Signaltransduktion in Schließzellen gezeigt werden. In *Pisum sativum* verhinderte der Einsatz eines MAPK-spezifischen Inhibitors das ABA-induzierte Schließen der Stomata (Burnett *et al.*, 2000). Mit einem neuen Screeningansatz, in dem durch Infrarotbelichtung die Blatttemperatur von mutagenisierten *A. thaliana* Pflanzen gemessen wurde, gelang es Mustilli *et al.* (2002), eine weitere PK (OST1) mit wichtiger Funktion in der Schließzelle zu isolieren. Fehlte den Pflanzen OST1 (Open Stomata 1), so kam es bei ABA-Behandlung zu einem verminderten Stomataschluss, was zu erhöhter Transpiration und damit verbunden zu verringerter Blatttemperatur der Pflanzen führte. Die folgende Übersicht (Tab. I.1.) fasst die Studien zu PK, für die eine Funktion in Schließzellen beschrieben wurde, zusammen.

Tab. I.1. Funktionell charakterisierte Serin/Threonin-modifizierende PK aus Schließzellen

Protein	Organismus	Eigenschaften	Quelle
AK1	<i>A. thaliana</i>	CDPK; Aktivierung von Chloridkanälen in <i>V. faba</i>	Pei <i>et al.</i> (1996)
AAPK	<i>V. faba</i>	48 kDa; ABA-aktiviert; Kalzium-unabhängig	Li u. Assmann (1996) Li <i>et al.</i> (2000)
ABR	<i>V. faba</i>	identisch zu AAPK; K-252- und Staurosporin-Inhibition	Mori <i>et al.</i> (1997)
CDPK	<i>V. faba</i>	57 kDa; Ca ²⁺ -aktiviert; „Calmodulin-like-domain“; Inhibition durch Calmodulin-Antagonisten; Phosphorylierung von KAT1	Li <i>et al.</i> (1998)
AMBPK	<i>P. sativum</i>	43 kDa; MAPK; Kontrolle von ABA-abh. Stomataschluss	Burnett <i>et al.</i> (2000)
OST1	<i>A. thaliana</i>	Homologie zu AAPK; ABA-aktiviert; Induktion von ROS-Produktion	Mustilli <i>et al.</i> (2002) Assmann (2003)

In zukünftigen Studien wird zu klären sein, wie viele der ca. tausend Gene für Serin/Threonin-PK aus *A. thaliana* in Schließzellen exprimiert sind, welche Faktoren die Expression und Aktivität der jeweiligen Proteine steuern und welche Zielproteine phosphoryliert werden.

I.1.4.3. Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die stomatäre Signaltransduktion

Damit Phosphorylierung als schneller „An/Aus“-Mechanismus der Signaltransduktion funktionieren kann, ist es wichtig, dass sie reversibel ist. Als Gegenspieler der PK spalten dabei die Protein-Phosphatasen (PP) die PK-übertragenen Phosphatreste von Serin-, Threonin-, Tyrosin- oder Histidinresten wieder ab. Auch bei den PP finden sich hauptsächlich Serin- oder Threonin-modifizierende Proteine. Die große Übergruppe der Serin/Threonin-PP gliedert sich dabei in die vier Gruppen PP1, PP2A, PP2B und PP2C (Luan, 1998 und 2003). Die Aminosäuresequenzen der ersten drei Gruppen zeigen deutliche Homologie untereinander, unterscheiden sich aber von den PP2C-Proteinen. Neben den Serin/Threonin-PP gibt es als weitere wichtige PP-Gruppe in Pflanzen die „Dual Specificity“-PP (DSPP), welche Phosphatreste sowohl von Serin, Threonin als auch von Tyrosin abspalten können. Die folgende Tabelle (Tab. I.2.) fasst die charakteristischen Eigenschaften für PP1, PP2A, PP2B, PP2C und DSPP zusammen.

Tab. I.2. Eigenschaften von Serin/Threonin-modifizierenden PP aus Pflanzen

Klasse	Inhibitoren ^{(*)1}	Eigenschaften ^{(*)2}	Anzahl ^{(*)3}
PP1	Okadaic Acid (10 – 100 nM) Calyculin A (0,1 – 0,3 nM) Tautomycin (0,16 nM)	<u>Heterodimer</u> : katalytische C-UE mit regulatorischer R-UE	PP1 und PP2A zusammen: 23/110
PP2A	Okadaic Acid (0,1 – 1,0 nM) Calyculin A (0,1 – 0,3 nM) Tautomycin (0,8 nM)	<u>Heterodimer</u> oder <u>Heterotrimer</u> : katalytische C-UE mit regulatorischer A-UE und/oder regulatorischer B-UE	
PP2B	Cyclosporin A FK506	<u>Heterodimer</u> oder <u>Heterotrimer</u> : katalytische CnA-UE mit regulatorischer CnB-UE und/oder Calmodulin (Ca ²⁺ -abhängig)	0/110
PP2C	Keine der obigen Inhibitoren	Keine Untereinheiten Mg ²⁺ - oder Mn ²⁺ -abhängige Aktivität	69/110
DSPP	Keine der obigen Inhibitoren	Keine Untereinheiten	18/110

(*)1 die Konzentrationen in Klammern entsprechen den halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC₅₀)

(*)2 UE steht für Untereinheit

(*)3 die Werte entsprechen den gefundenen Sequenzen für katalytische UE in *A. thaliana* (Kerk *et al.*, 2002); Sequenzen für katalytische UE von PP2B wurden nicht gefunden, diese PP-Klasse wird aber trotzdem aufgelistet, weil regulatorische CnB-UE (AtCBL) isoliert werden konnten (Kudla *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999)

In Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber Inhibitoren, das Vorkommen von Untereinheiten und ihre Abhängigkeit von divalenten Kationen unterscheiden sich PP1- und PP2A-Proteine deutlich von Phosphatasen der PP2B-, PP2C- oder DSPP-Gruppen. In Inhibitorstudien kann deshalb untersucht werden, an welchen Prozessen innerhalb einer Zelle PP1- und PP2A-Proteine beteiligt sind. Durch den Einsatz der natürlichen Toxine Okadaic Acid (OA) und Calyculin (CA) wurde nachgewiesen, dass neben den charakterisierten PP2C-Proteinen ABI1 und ABI2, die auch auf molekularer Ebene identifiziert werden konnten (Leung *et al.*, 1994 und 1997), auch Proteine der PP1-/PP2A-Gruppe an der Signaltransduktion in Schließzellen beteiligt sind. Es zeigte sich, dass PP dieser Gruppen besonders durch die Regulation von Ionenkanälen Einfluss auf die Schließzellfunktion nehmen (Schröder *et al.*, 2001). So förderte OA-Gabe in Schließzellen von *V. faba*, *P. sativum* und *Nicotiana benthamiana* nach ABA-Behandlung die Aktivierung von Anionenkanälen und damit verbunden das Schließen der Stomata (Schmidt *et al.*, 1995; Grabov *et al.*, 1997; Hey *et al.*, 1997). Im Widerspruch dazu stehen Studien mit *A. thaliana*, die zu gegensätzlichen Ergebnissen führten. In Versuchen mit OA nahm der Einfluss von ABA auf die

Anionenkanäle ab (Pei *et al.*, 1997). Die unterschiedlichen Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass es bei der ABA-induzierten Signaltransduktion in Schließzellen sowohl positiv als auch negativ arbeitende Proteine der PP1-/PP2A-Gruppe gibt (Luan, 1998 und 2003; Kwak *et al.*, 2002). Thiel und Blatt (1994) und Li *et al.* (1994) konnten zeigen, dass OA-Gabe auch die Aktivität von Kaliumkanälen in Schließzellen ändert. Die einzelnen Studien der letzten Jahre sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. I.3. Wirkung der Inhibitoren OA oder CA in pflanzlichen Schließzellen

Inhibitor	Eigenschaften	Organismus/Quelle
OA	ABA-Aktivierung langsamer Anionenkanäle nimmt zu => Schließzellen reagieren stärker auf ABA	<i>V. faba</i> (Schmidt <i>et al.</i> , 1995)
OA	ABA-Aktivierung langsamer Anionenkanäle nimmt zu => Schließzellen reagieren stärker auf ABA	<i>N. benthamiana</i> (Grabov <i>et al.</i> , 1997)
OA	ABA-Aktivierung langsamer Anionenkanäle nimmt zu => Schließzellen reagieren stärker auf ABA	<i>P. sativum</i> (Hey <i>et al.</i> , 1997)
OA	ABA-Aktivierung langsamer Anionenkanäle nimmt ab => Schließzellen reagieren schwächer auf ABA	<i>A. thaliana</i> (Pei <i>et al.</i> , 1997)
OA	Verminderung der K_{in} - und K_{out} -Ströme in Schließzellen	<i>V. faba</i> (Thiel und Blatt, 1994)
OA + CA	Verminderung der K_{in} -Ströme in Schließzellen	<i>V. faba</i> (Li <i>et al.</i> , 1994)

Trotz der Vielzahl von Inhibitorstudien war auf molekularer Ebene bis vor Kurzem kein PP1- oder PP2A-Protein beschrieben, dem eine Rolle in Schließzellen zugewiesen werden konnte. Erst die Versuche von Kwak *et al.* (2002) führten zur Identifizierung von RCN1, einer regulatorischen PP2A-Untereinheit. Fehlte der Pflanze die RCN1-Aktivität, so reagierten die Schließzellen nicht mehr auf ABA. Auch die charakteristischen Kalzium-Oszillationen nach ABA-Gabe waren nicht mehr zu beobachten.

I.1.5. Zielsetzung (PP-Teil)

Die Inhibitorstudien mit OA oder CA waren ein deutlicher Hinweis, dass in der Signaltransduktion von Schließzellen wahrscheinlich mehrere Proteine vom PP1- oder PP2A-Typ eine wichtige Rolle spielen. Das erste Ziel dieser Arbeit war deshalb die molekulare Identifikation von entsprechenden PP-Genen. Zum eindeutigen Nachweis der schließzell-spezifischen Expression wurden für vorselektierte Kandidatengene zelluläre Expressionsanalysen in transgenen Pflanzen durchgeführt.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es für PP1/PP2A-Gene aus *A. thaliana* nur Studien, die eine größtenteils parallele Expression der einzelnen Isoformen beschrieben. Neben der Untersuchung der schließzellspezifischen Expression ausgewählter PP-Gene wurde deshalb in der ganzen Pflanze untersucht, ob sich diese Ergebnisse mittels Promotor-Reporterfusionen bestätigen lassen. Das Auftreten von Isoform-spezifische Expressionsmuster wäre ein erster wichtiger Hinweis, dass einzelne PP-Proteine trotz ihrer großen Übereinstimmung auf Aminosäureebene unterschiedliche Funktionen *in planta* haben können. Die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) hatte gezeigt, dass über 37 % aller Gene dieser Pflanze aus Genfamilien stammen, die mehr als fünf Mitglieder haben. Bisher ist erst ansatzweise geklärt, warum in vielen Fällen eine große Anzahl homologer Sequenzen für eine bestimmte Proteinaktivität vorhanden ist.

Um Anhaltspunkte über die Funktion ausgewählter PP-Proteine *in planta* zu bekommen, wurden im Anschluss an die Expressionsanalysen in transgenen Pflanzen die entsprechenden Genaktivitäten vermindert. Die Isoform-spezifische Modulation der Genexpression wurde durch RNAi-Ansätze oder die Nutzung von T-DNA Insertionsmutanten erreicht.

I.2. Membranproteine in *Arabidopsis thaliana*

Membranen fungieren als hochselektive Permeabilitätsbarrieren und ermöglichen es einer Zelle, in membranumgrenzten Kompartimenten und zwischen Cytoplasma und Extrazellulärraum unterschiedliche Konzentrationen von Ionen und anderen löslichen Substanzen zu generieren. Eine entscheidende Rolle bei der kontrollierten Aufnahme und Abgabe von Ionen und wasserlöslichen organischen Substanzen kommt dabei Membranproteinen, welche in die Lipiddoppelschicht der Membran integriert sind, zu. Exemplarisch wurde die Bedeutung von Ionenströmen schon bei der Beschreibung der Schließzellfunktion (I.1.) beschrieben. Im Folgenden wird dargestellt, welche Klassen von Membranproteinen es gibt (1.2.1.), welche Proteine bereits in *A. thaliana* beschrieben wurden (1.2.2.) und welche Rolle die MATE (Multidrug And Toxic Extrusion)-Proteine in Pflanzen und anderen Organismen spielen (1.2.3.). Aus den Daten zu MATE-Proteinen aus Prokaryoten, Hefen und *A. thaliana* ergab sich die Zielsetzung für diesen Teil der Arbeit (1.2.4.).

I.2.1. Translokatoren und Kanalproteine

Die Membranproteine, welche an der Wanderung von Ionen und wasserlöslichen organischen Substanzen beteiligt sind, werden in Translokatoren und Kanalproteine gegliedert (Alberts *et al.*, 1995). Translokatoren binden jeweils spezifisch Substanzen und bewirken, dass diese durch eine Pore „hindurchgereicht“ werden. Je nach Art des Transports werden dabei Symporter, Antiporter und Uniporter unterschieden. Uniporter transportieren nur ein Molekül, während es bei Symportern und Antiportern zu einem gekoppelten Transport von zwei unterschiedlichen Molekülen kommt. Ein Symporter transportiert beide Moleküle in die gleiche Richtung durch die Membran, beim Antiporter dagegen erfolgt der Transport in entgegengesetzte Richtungen. Der gekoppelte Transport ermöglicht es, Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten zu bewegen. Die hierzu benötigte Energie wird in der Regel durch den Transport des zweiten transportierten Moleküls entlang seines elektrochemischen Gradienten gewonnen.

Bei Kanalproteinen wandern Moleküle, nur ihrem elektrochemischen Gradienten folgend, durch eine hydrophile Pore. Diese Pore ist in den meisten Fällen ionenselektiv und pendelt zwischen offenem und geschlossenem Zustand. Wichtige Stimuli, die das Öffnen eines Kanals beeinflussen können, sind Spannungsänderungen zwischen den beiden Seiten der Membran, mechanische Belastungen oder die Bindung von Signalmolekülen. Auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen können die Aktivität eines Kanalproteins beeinflussen. Wie schon für die Kaliumkanäle der Schließzelle beschrieben (I.1.), steuert oft das Membranpotential die Öffnung von Kanälen.

I.2.2. Membranprotein-Familien aus *Arabidopsis thaliana*

Die Sequenzierung von *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ermöglichte es zum ersten Mal, alle Membranproteine einer Höheren Pflanze zu erfassen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller vorhergesagten oder schon identifizierten Gene wurden dabei auf das Vorkommen von hydrophoben Bereichen, welche für Transmembranbereiche charakteristisch sind (Kyte und Doolittle, 1982), untersucht. Mit dieser Methode selektierte Proteinsequenzen konnten anschließend anhand ihrer Sequenzhomologien in verwandte Familien gruppiert werden. So fand Ward (2001), dass für 18 % (4589 von 25470 Sequenzen) der von ihm untersuchten abgeleiteten Aminosäuresequenzen mindestens zwei Transmembranbereiche vorhergesagt wurden. Dieser Anteil liegt in der gleichen Größenordnung wie bei *Drosophila melanogaster* und *Saccharomyces cerevisiae*, ist aber deutlich kleiner als bei *Caenorhabditis elegans* (27 %). In einem weiteren Schritt verglich Ward diese 4589 Sequenzen miteinander und konnte 70 % (3208 Sequenzen) von ihnen in 628 Proteinfamilien gruppieren.

In den letzten Jahren wurden einige Datenbanken installiert, die es ermöglichen, die weitere Gruppierung und Analyse von Membranproteinen aus *A. thaliana* und anderen Organismen zeitnah zu verfolgen. In der PlantsT-Datenbank (Tchieu *et al.*, 2003; <http://plantst.sdsc.edu>), wurden z.B. die identifizierten Transportproteine aus *A. thaliana* (circa 24 % der 4589 Sequenzen mit mehr als zwei Transmembranspannen) nach der Klassifikation von Saier (2000; <http://tcd.db.ucsd.edu>) gruppiert. Die Datenbank ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003, <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>) beschränkt sich nicht nur auf Transportproteine, sondern enthält alle vorher gesagten Membranproteine aus *A. thaliana*, die mehr als vier putative Transmembranspannen enthalten (ca. 1800 Sequenzen). Für viele Membranproteinfamilien wurden in den letzten Jahren schon detaillierte Analysen durchgeführt. Die folgende Tabelle (Tab. I.4.) fasst wichtige Übersichtsartikel, die zu einzelnen Familien erschienen sind, zusammen.

Tab. I.4. Studien zu Membranproteinfamilien aus *A. thaliana* (seit 1998)

Familie(n)	Quelle
Kationen-Transporter	Mäser <i>et al.</i> , 2001
Kationenkanäle der Plasmamembran	Very und Sentenac, 2002
Kalium- und Kalzium-Transporter	Fox und Guerinot, 1998
Kalzium-Transporter	Sanders <i>et al.</i> , 1999
Kalziumkanäle in der Plasmamembran	White <i>et al.</i> , 2002
“Cyclic Nucleotide“ regulierte Kanäle (CNGC)	Kohler <i>et al.</i> , 1999; Talke <i>et al.</i> , 2003

Tab. I.4. (Fortsetzung)

Familie(n)	Quelle
Natrium-Transporter	Tester und Davenport, 2003
Nicht-selektive Kationenkanäle	Demidchik <i>et al.</i> , 2002
Magnesium-Transporter	Shaul, 2002; Gardner, 2003
Kalzium-ATPasen	Geisler <i>et al.</i> , 2000; Sze <i>et al.</i> , 2002
ATPasen (P-Typ)	Axelsen <i>et al.</i> , 2001; Baxter <i>et al.</i> , 2003
ATPasen der Plasmamembran	Arango <i>et al.</i> , 2003
Phosphat-Transporter	Rausch und Bucher, 2002
Sulfat-Transporter	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2002
Metal-Transporter (Nramp- und ZIP- Familien)	Thomine <i>et al.</i> , 2000; Guerinot, 2000
Metal-Transporter	Williams <i>et al.</i> , 2000
Chlorid-Kanäle (CLC)	Barbier-Brygoo <i>et al.</i> , 2000
Nitrat-Transporter	Forde, 2000; Orsel <i>et al.</i> , 2002
Ammonium-Transporter	von Wiren <i>et al.</i> , 2000; Glass <i>et al.</i> , 2002
Aminosäure-Transporter	Wipf <i>et al.</i> , 2002
Peptid-Transporter	Stacey <i>et al.</i> , 2002
Saccharose-Transporter	Lemoine, 2000; Truernit, 2001
ABC-Transporter (PDR- und MRP- Familien)	Brule <i>et al.</i> , 2002; Kolukisaoglu <i>et al.</i> , 2002
ABC-Transporter	Martinoia <i>et al.</i> , 2002
Aquaporine	Javot und Maurel, 2002; Maurel <i>et al.</i> , 2002
„Rezeptor-like“-Kinasen	Shiu und Bleecker, 2001; Becraft, 2002
Histidin-Kinasen	Urao <i>et al.</i> , 2001; Hwang <i>et al.</i> , 2002
Ethylen-Rezeptoren	Bleecker <i>et al.</i> , 1998; Theologis, 1998
Cytokinin-Rezeptoren	Kakimoto, 2003 ; Heyl <i>et al.</i> , 2003
Brassinosteroid-Rezeptoren	Nam und Li, 2002; Bishop und Koncz, 2002
Glutamat-Rezeptoren	Davenport, 2001

Eine weitere große Familie von Membranproteinen bilden die „Multidrug and Toxic Extrusion“- (MATE-) Proteine. Sie gehören zur „Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide“- (MOP-) Überfamilie (Hvorup *et al.*, 2003), welche mit den „ATP-binding cassette“- (ABC-) Transportern, den „Resistance Nodulation Division“- (RND-) Transportern, den „Drug Metabolite Transportern“- (DMT-) und den „Major Facilitator“- (MF-) Proteinen die fünf Überfamilien der „Drug-Efflux“-Membranproteine bildet (Saier, 2000; Jack *et al.*, 2001). In Bezug auf die Transportmechanismen der toxischen Substanzen lassen sich dabei zwei Grundprinzipien unterscheiden (Putman *et al.*, 2000). Die Energie für den Transport der

toxischen Substanz stammt entweder aus der Hydrolyse von ATP (wie z.B. bei den ABC-Transportern) oder es erfolgt ein Antiport, bei dem anorganische Kationen oder Protonen entgegengesetzt zur toxischen Substanz wandern (wie z.B. bei den MATE-Proteinen). Im Folgenden soll die MATE-Familie, aus der einige Gene im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert und funktionell charakterisiert wurden, näher vorgestellt werden.

I.2.3. Die MATE (Multidrug And Toxic Extrusion)-Familie von Membranproteinen

Schon die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) zeigte, dass mindestens 56 Gene, die für MATE-Proteine kodieren, in dieser Pflanze vorhanden sind. Zu diesem Zeitpunkt (Anfang 2001) war allerdings für keines der Proteine eine Funktion beschrieben. Lediglich zu homologen Sequenzen aus Bakterien und Hefen gab es erste Studien. So konnten Morita *et al.* (1998 und 2000) zeigen, dass NorM aus dem halophilen marinen Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* als „Natrium/Multidrug“-Antiporter arbeitet. Die Energie aus dem Einstrom von Natrium entlang seines Konzentrationsgradienten wird dabei genutzt, um toxische Substanzen zu exportieren. Da *V. parahaemolyticus* auch respiratorische Natriumpumpen, Natrium-gekoppelte Symporter (Tsuchiya und Shinoda, 1985) und einen durch Natriumfluss betriebenen Bewegungsapparat besitzt (Atsumi *et al.*, 1992), erscheint die Kopplung von Natriuminflux und „Multidrug-Efflux“ nicht verwunderlich. Als ein weiteres funktionell charakterisiertes MATE-Protein war ERC1 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Shiomi *et al.*, 1991). Die Überexpression des *ERC1*-Gens führte in Hefe zu einer verstärkten S-Adenosylmethionin-Produktion (Shiomi *et al.*, 1995). Ob ERC1 auch als Antiporter arbeitet oder andere Transporteigenschaften besitzt, wurde bisher nicht untersucht.

Aus der Vielzahl von MATE-Proteinen in Archeae, Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen wurden in den letzten Jahren (seit 2001) einige weitere Mitglieder funktionell charakterisiert. Aus *V. parahaemolyticus* wurde mit VmrA ein zweites MATE-Protein identifiziert und als „Natrium/Multidrug“-Antiporter beschrieben (Chen *et al.*, 2002). Auch aus *Bacteroides thetaiotaomicron* (Miyamae *et al.*, 2001), *Burkholderia vietnamensis* (Fehlner-Gardiner und Valvano, 2002), *Brucella melitensis* (Braibant *et al.*, 2002), *Escherichia coli* (Yang *et al.*, 2003), *Vibrio cholerae* (Huda *et al.*, 2003), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* (Rouquette-Loughlin *et al.*, 2003), *Haemophilus influenzae* (Xu *et al.*, 2003) und *Pseudomonas aeruginosa* (He *et al.*, 2004) wurden MATE-Gene kloniert und charakterisiert. Während dieser Doktorarbeit konnten für fünf der mindestens 56 MATE-Proteine aus *A. thaliana* erste Funktionen beschrieben werden (Debeaujon *et al.*, 2001; ; Diener *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002; Rogers und Guerinot, 2002).

I.2.4. Zielsetzung

Dieser Teil der Doktorarbeit begann mit der Klonierung eines EF-spezifischen cDNA-Fragments eines *MATE*-Gens. Da für diese Genfamilie nur die funktionellen Studien aus *S. cerevisiae* (ETR1; Shiomi *et al.*, 1991 und 1995) und *V. parahaemolyticus* (NorM; Morita *et al.*, 1998 und 2000) bekannt waren, war ein Ziel dieser Arbeit, mit NIC1 ein MATE-Protein aus einem vielzelligen eukaryotischen Organismus zu charakterisieren. Die Studien zu NorM hatten gezeigt, dass dieses Protein als Natrium/Toxin-Antiporter arbeitet. Die Daten zu NorM und ETR1 zeigten außerdem, dass diese MATE-Proteine strukturell sehr variable organische Substrate detoxifizieren können. Aus diesem Grund wurde nach Expressionssystemen gesucht, die eine funktionelle Charakterisierung von NIC1 anhand des Transports von anorganischen Kationen zulassen. Die für NIC1 etablierten Expressionssysteme wurden anschließend auch zur Charakterisierung weiterer pflanzlicher MATE-Proteine genutzt.

Zur Untersuchung der Funktion *in planta* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Lokalisation und Modulation der *NIC1*-Genaktivität in transgenen Pflanzen. Diese Experimente wurden auch für andere ausgewählte *MATE*-Gene aus *A. thaliana* durchgeführt. Wie schon im PP-Teil dieser Arbeit stellte sich auch für die *MATE*-Gene aus *A. thaliana* die Frage, warum eine große Anzahl homologer Sequenzen vorhanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob NIC1 und weiteren MATE-Proteinen Isoform-spezifische Funktionen zugewiesen werden können.

II. Material und Methoden

II.1. Chemikalien

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien findet sich in der Diplomarbeit von Kursawe (Universität Potsdam, 2002).

II.2. Reaktionskits

TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
pYES2-Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
HF-Polymerase PCR-Kit	Clontech, Heidelberg
Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Gel Purification Kit	Qiagen, Hilden
Mini Elute Purification Kit	Qiagen, Hilden
Ambion T7 mMessage Machine Kit	Ambion, Austin, USA
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren
Random Prime Labelling System (rediprime)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

II.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Kollagenase	Roche, Mannheim
RNAse A (DNAse-frei)	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon Roth
T4 DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	MBI Fermentas, St. Leon Roth
	NEB, Schwalbach

II.4. Pflanzen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp C24

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ökotyp Columbia

II.5. *Xenopus laevis*

Weibchen des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden von der Firma Köhler (Hamburg) bezogen.

II.6. Bakterien- und Hefestämme***Escherichia coli***

XI1-Blue	F ⁺ ::Tn10 <i>proA</i> +B+ <i>lac</i> ^q (<i>lacZ</i>)M15 <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)
DH5 α	F ⁻ 80d <i>lacZ</i> M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 -gyrA96</i> (Nal ^r) <i>relA1 D(lacZYA-argF)</i> U169 (Hanahan, 1983)

Agrobacterium tumefaciens

GV3101::pMP90	(Deblaere <i>et al.</i> , 1985)
---------------	---------------------------------

Saccharomyces cerevisiae

Y00000 (BY4741)	MAT α ; <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET5</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0 (bezogen von Euroscarf, Frankfurt)
Y10000 (BY4742)	MAT α ; <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET5</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0 (bezogen von Euroscarf, Frankfurt)
Y04177	MAT α ; <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET5</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>ydr338C</i> ::KANMX4 (bezogen von Euroscarf, Frankfurt)
Y14177	MAT α ; <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET5</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0 ; <i>ydr338C</i> ::KANMX4 (bezogen von Euroscarf, Frankfurt)

II.7. Oligonucleotide**Primer zur Klonierung der Promotorfragmente von *TOPP1-TOPP7*:**

1prom-for	5'- GAATTCAGAGCTGTCCTCTTC
1prom-rev	5'- CCATGGCTCCGATCTAAACGAGGTAG
2small-for	5'- CGAATTCCTGACAATGAATTGGCAAAG
2big-for	5'- CGAATTCGTCGTACCATCTTTGATGGG
2prom-rev	5'- CCCATGGGAAAGAAGACCCACCTCC
3prom-for	5'- AAGCTTGGTTGTGTAAGCGTGGTTTAG
3prom-rev	5'- CCATGGCAAATCAATCAATCACTACG

4prom-for	5'- GAATTCCATTGGGTTATGGGTACCCAC
4prom-rev	5'- CCATGGCAACAGAATCCCCAAAAAAAACCC
5prom-for	5'- CTGCAGCGCCTGTTTTGAGCCTTCTTG
5prom-rev	5'- AGATCTTCACTCACTTACCCACCTC
6prom-for	5'- CTGCAGGATCGGATTCTAGAGGTTGCTG
6prom-rev	5'- ACTAGTCAGATCTACCATTTATAAAACCTCAAGAAACAGAGC
7prom-for	5'- AAGCTTCAAAGGAACGACCAGAGG
7prom-rev	5'- CCATGGCGTAGCAACAACCCTAAT TTCTC

Primer zur Klonierung von PP-cDNAs aus Epidermalen Fragmenten:

RACE-PP0	5'- GGAGACTATGTTGACAGTGGTATGGCTTCTACGATGAGTG - (T) ₁₁ - V
RACE-PPI	5'- GGNGAYTAYGTNGAYMGNGG
RACE-PPII	5'- TAYGGNTTYTAYGAYGARTG

(M = A/C; N = A/C/G/T; R = A/G; V = A/C/G und Y = C/T)

Primer zur Klonierung von *STH*-Promotorfragmenten:

2-12prom-for	5'- CTGAGAATTCGTCCAGTGAACCATTGCTG
2-12prom-rev	5'- CTGACCATGGCGGCCTTTTATTATCC
1-4prom-for	5'- GAATTCCTCATCTATGCAGATATGGAGCC
1-4prom-rev	5'- CCATGGGATCCAAATCCATAACTCTCTCTC

Primer zur Klonierung des *TOPP2* RNAi-Konstruktes:

2-Bam/Nco-for	5'- GGATCCATGGCTTAAGCCTGCTGATCGA
2-Hpa-rev	5'- GTTAACGTCTCTCCCGCTTTCGTATCG
2-Pml-for	5'- CACGTGCTTAAGCCTGCTGATCGAAAGC

Primer zur Klonierung der *NIC1*-cDNA und von *NIC1*-Promotorfragmenten:

018-for	5'- AGCTGAATTCTCATGGCAGCTCCTTTGTTG
018-rev	5'- AGCTAAGCTTCTAGAAGACAAGATTTTCTTC
018-HpaI-for	5'- GTCGGGAATGAGTTAACTGCGAATCAGCC
018-HpaI-rev	5'- GGCTGATTCGCAGTTAACTCATTCCCGAC
018prom-A	5'- GAATTCGGTTATAGACAGTGTGATGAG
018prom-B	5'- GAATTCGCATCAACATCGTCCCAAG
018prom-C	5'- CCATGGATTACAGGTTTGAGAGAG
018-gen-D	5'- CCATGGGGAAGACAAGATTTTCTTC
018-gen-E	5'- CCATGGCAGCTCCTTTGTTGATG

Primer zur Klonierung von *NIC1*-Homologen aus *A. thaliana*:

1635-for-Eco	5'- GAATTCATGTCAGAAACATCAAAGTCAGAG
1635-rev-Xba	5'- TCTAGACTATGAGTGGCTATCTTGTCTG
1665-for-Eco	5'- GAATTCATGGAAGACAAAATCCAGTCAGAT
1665-rev-Xba	5'- TCTAGATTACAAAACATCACCCAACTTCTC
3028-for-Eco	5'- GAATTCATGGTGGTTCGAAGAAGATTCACG
3028-rev-Xba	5'- TCTAGATTAGTGTAGGCCTTCTTCGCA
7296-for-Eco	5'- GAATTCATGGGTTCGGAAGCGACCACCGCC
7296-rev-Xba	5'- TCTAGATTATTGCTTAAGAAGCGGAGATGT
7519-for-Eco	5'- GAATTCATGGGAAAGGATAAGACTTTGCCG
7519-rev-Xba	5'- TCTAGATCACTCCTGCGCCGTTCTCCCC
7591a-for-Eco	5'- GAATTCATGGGAGACGCAGAGAGCACTAAG
7591a-rev-Xba	5'- TCTAGACTAGTCATGAAGAAGAAAAGAACG
7591b-for-Eco	5'- GAATTCATGGGAGACGCAGAGAGCACCTCC
7591b-rev-Xba	5'- TCTAGACTAGTCATGAAGAAGAAAAGAACG
7591c-for-Eco	5'- GAATTCATGGAAGACGCAGAGAGCACACC
7591c-rev-Xba	5'- TCTAGATCACAATAGAAACATGTCATGAAG
7591d-for-Eco	5'- GAATTCATGCAAGACGCGGAGAGAACCACC
7591d-rev-Xba	5'- TCTAGATCATGAAAGACAAAAGCAAAGG
8470-for-Eco	5'- GAATTCATGTGTAACCCATCAACAACAAC
8470-rev-Xba	5'- TCTAGATTAATAAAGCACCGTGATGCG
6193-for-Eco	5'- GAATTCATGGAACGGATTTCTCGTTGGTG
6193-rev-Xba	5'- TCTAGATTACACAGTTTCTGCAATATGATT
5499-for-Eco	5'- GAATTCATGCAGGTGGGAGAGGAGATGGCG
5499-rev-Xba	5'- TCTAGATCAATTCGTATTTTGTAGTAAACC
0400-for-Eco	5'- GAATTCATGGATCCGACGGCGCCGTTGC
0400-rev-Xba	5'- TCTAGATCATTCCAGACCAAAGTCCCTG

Primer zur Klonierung von *NIC1*-Homologen aus Hefe und Mensch:

1136-for	5'- GGATCCATGGCTGGAATTTTGTCAAAGAC
1136-rev	5'- AAGCTTTTAAGCCCCTAAGAGGGCTG
1709-for	5'- CCCGGGATGGAAGCTCCTGAGGAGCC
1709-rev	5'- AAGCTTCCACGTCACCTGAATTCTGAC

II.8. Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Verwendung</u>
pCR2.1 (Invitrogen)	zur TA-Klonierung von PCR-Produkten
pYES2 (Invitrogen)	zur induzierbaren Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pDR196	zur konstitutiven Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pGEMHE (Liman <i>et al.</i> , 1992)	zur Herstellung von cRNA für die Oozyteninjektion
pCAMBIA1302	zur <i>A. tumefaciens</i> vermittelten Pflanzentransformation
pCAMBIA1303	zur <i>A. tumefaciens</i> vermittelten Pflanzentransformation
pCAMBIA1304	zur <i>A. tumefaciens</i> vermittelten Pflanzentransformation

Detaillierte Beschreibungen der Vektoren finden sich bei Kursawe (2002).

II.9. Puffer, Lösungen und Medien

Puffer und Lösungen für DNA und RNA

Puffer und Lösungen zur Extraktion, Aufreinigung und Auftrennung von DNA und RNA wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

Medien für *E. coli*, *A. tumefaciens* und *S. cerevisiae*

E. coli wurde in YT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), *A. tumefaciens* in YEB-Medium (Vervliet *et al.*, 1975) und *S. cerevisiae* in YPD- oder SC-Ura-Medium kultiviert.

Wenn erforderlich, enthielten die Medien zur Selektion folgende Zusätze:

Kanamycin	50 µg / ml
Ampicillin	50 µg / ml
Hygromycin	10 µg / ml
Rifampicin	50 µg / ml
IPTG	23 µg / ml
X-Gal	40 µg / ml

Medien und Puffer für *Arabidopsis thaliana* und für *Xenopus laevis* Oozyten

Medien und Puffer zur Kultivierung, Infiltration und GUS-Färbung von *A. thaliana* wurden hergestellt, wie bei Kursawe (2002) beschrieben. Dort finden sich auch Details zur Herstellung der Puffer zur Gewinnung, Lagerung und Untersuchung von *X. laevis* Oozyten.

II.10. Programme und Datenbanken zur *in silico* Analyse

Zum Vergleich von Sequenzen, zur Planung von Klonierungsstrategien, zur Bestimmung von offenen Leserahmen, zur Ableitung der Proteinsequenzen und für weitere Sequenzanalysen wurde das Programmpaket DNASTar (Lasergene, Version 5.1; Madison, USA) genutzt. Wichtige über das Internet genutzte Datenbanken sind in der folgenden Auflistung aufgeführt.

Suche nach homologen Sequenzen	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Proteinanalyse	www.bioscience.org/urllists/protanal.htm
Phylogenetische Analyse	www.cbr.nrc.ca/cgi-bin/WebPhylip/index.html
Expert Protein Analysis System	www.expasy.org
Vergleich von Sequenzen	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
Restriktionsenzyme	www.neb.com
Identifikation bekannter Motive	http://us.expasy.org/prosite http://www.blocks.fhcrc.org
Vorhersage der intrazell. Lokalisation	www.psort.nibb.ac.jp
Promotoranalyse	www.dna.affre.go.jp/htdocs/PLACE http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE
Vorhersage von Transmembranspannen	www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html www.enzim.hu/hmmtop
<i>Arabidopsis</i> Membranproteine	www.cbs.umn.edu/arabidopsis http://plantst.sdsc.edu http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de
Klassifikation von Membranproteinen	http://tcdb.ucsd.edu
<i>Arabidopsis</i> -Ressourcen Datenbank	http://arabidopsis.org
T-DNA Kollektionen	www.mpiz.koeln.mpg.de/GABI-Kat http://genoplante-info.infobiogen.fr http://atidb.cshl.org/ http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis/ http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress http://www.tmri.org/index.html
MIPS-Datenbank	http://mips.gsf.de
TIGR-Datenbank	http://www.tigr.org/tdb/tdb.html
<i>Saccharomyces</i> Membranproteine	www.cbs.umn.edu/yeast
<i>Saccharomyces</i> Datenbanken	www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces

II.11. Auftrennung, Modifikation und Klonierung von DNA

Die Auftrennung und Analyse von DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Zur Dokumentation der Bandenmuster in den Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente nach Anfärbung mit Ethidiumbromid (dem Agarosegel in einer Konzentration von 0,3 µg/ml zugesetzt) mit Hilfe des GelDoc2000-Systems (Biorad, München) fotografiert. Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Qiaquick Gel-Purification Kit (Qiagen, Hilden) genutzt. Restriktionen, Dephosphorylierungen, Ligationen und andere DNA-Modifikationen erfolgten, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

II.12. Präparation von DNA und RNA aus pflanzlichen Geweben

Die Isolation genomischer DNA erfolgte, wie von Doyle und Doyle (1987) beschrieben, durch Zusatz von CTAB (Cetylhexatrimethylammoniumbromid), einem starken Detergens, welches die zellulären Strukturen auflöst und Proteine zum großen Teil denaturiert. Polysaccharide wurden durch CTAB komplexiert und fielen nach Zusatz von Chloroform / Isoamylalkohol an der Interphase aus.

Die Gesamt-RNA wurde aus dem pflanzlichen Gewebe mit Hilfe von Trizol nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) isoliert. Zur Aufreinigung von mRNA wurden oligo-dT-Säulen verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

II.13. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation mit dem Nucleobond-AX Kit durchgeführt (Macherey-Nagel, Düren). Die Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens* wurden nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt, erforderte aber zu Beginn einige Modifikationen: Die im YEB-Selektionsmedium gewachsenen Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, anschließend dreimal mit 1 M NaCl gewaschen und anschließend in einer modifizierten Lösung I resuspendiert. (neben 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL (pH 8,0) enthielt die Lösung 50 µg/ml Lysozym).

II.14. Präparation von RNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolation von RNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Rivas *et al.* (2001).

II.15. PCR

Die PCR wurde zur Amplifizierung von genomischer DNA und cDNA verwendet. Fehlten die passenden Restriktionsschnittstellen für eine Klonierung, so wurden diese durch entsprechende Primer den amplifizierten DNA-Fragmenten angefügt. Mittels Kolonie-PCR wurden außerdem Bakterienkolonien auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids hin untersucht. Auch zum Nachweis des transgenen Status von *A. thaliana* wurde die PCR eingesetzt. Bei Einsatz neuer Primerkombinationen wurde in einer ersten Gradienten-PCR die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Als Näherung diente dabei die „2 + 4 Regel“ (jedes annealende A oder T wurde mit zwei, jedes annealende G oder C mit vier multipliziert; die Summe dieser Werte gab einen ersten Hinweis auf die Annealingtemperatur).

II.16. *In vitro* Transkription

Für die Expression von *N/C*-Genen in Oozyten wurde die entsprechende cDNA in den Vektor pGEMHE (Liman *et al.*, 1992) kloniert und mittels der T7-RNA-Polymerase in cRNA transkribiert. Die Qualität der cRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehydgel bestimmt und die Quantität photometrisch ermittelt. Anschließend wurde die cRNA auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

II.17. cDNA – Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit nach den Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurde mit einem oligo-dT₁₈-Primer oder modifizierten Primern, die neben dem dT-Teil noch Adaptorsequenzen besaßen, gearbeitet.

II.18. RNA-Blot Analyse

Die Bestimmung des Transkriptgehalts eines Gens in verschiedenen Zellen, Geweben oder Pflanzen erfolgte, wie bei Kursawe (2002) beschrieben.

II.19. Transformation von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *S. cerevisiae*

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* und die anschließende Hitzeschock-Transformation erfolgte, wie bei Hanahan (1983) beschrieben. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf Antibiotika-haltigem Medium selektiert. *A. tumefaciens* wurde mittels Elektroporation im Gene-Pulser (Biorad, München) transformiert. Auch hier wurde als

Marker für eine erfolgreiche Transformation das Wachstum auf Antibiotika-haltigem Medium genutzt. Zum Gentransfer in *S. cerevisiae* wurde die Lithiumacetatmethode angewandt (Gietz *et al.*, 1992). Zur Selektion wurden die Zellen auf SC-Medium ohne Uracil ausplattiert. Bei erfolgreicher Transformation konnte das *URA3*-Gen des Vektors die Uracil-Auxotrophie des Hefestamms komplementieren.

II.20. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation von *A. thaliana* beruht auf der Übertragung der T-DNA des bakteriellen Ti-Plasmids in die Pflanzenzelle und die anschließende stabile Integration der T-DNA in das Kerngenom. Das verwendete Protokoll wurde ursprünglich von Bechthold *et al.* (1993) beschrieben und leicht modifiziert angewandt (siehe Kursawe, 2002).

II.21. Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Von *A. tumefaciens*-transformierten Pflanzen wurden die Samen gewonnen und diese nach Oberflächensterilisation (mittels Natriumhypochlorid) auf Hygromycin-haltigem AM-Saccharose-Medium ausplattiert. Die Pflanzen wurden anschließend in Sterilkultur selektiert und nach 14 bis 21 Tagen in Erde (GS90-Erde + Vermiculite; Mischungsverhältnis 1:1) überführt. Anschließend wurden die Pflanzen entweder im Phytotron (12 Stunden Tag, 180 $\mu\text{mol E/m}^2 \times \text{sec}$ oder im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht bei 20°C, Luftfeuchtigkeit 80 %; 8 h Dunkelheit bei 18°C, Luftfeuchtigkeit 50 %) weiter kultiviert.

II.22. GUS-Färbung

Das β -Glucuronidase Gen (*gusA*) aus *E. coli* kann als Reporter gen zur Lokalisierung der gewebespezifischen Aktivität von Promotoren eingesetzt werden (Jefferson *et al.*, 1987). Der Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen Pflanzen erfolgt dabei durch eine Farbreaktion bei der Umsetzung des farblosen Glucuronides X-Gluc zu Glucuronsäure und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl. Am Ort der Reaktion bildet sich ein wasserunlöslicher Dichloro-Dibromo-Indigo Niederschlag. Zur Infiltration von ganzen Pflanzen (Keimlingen) oder Pflanzenteilen wurden diese in eine X-Gluc-Lösung gegeben und anschließend für einige Minuten Vakuum angelegt. Anschließend wurden die Proben für 12 bis 48 h in der X-Gluc-Lösung bei 37°C inkubiert. Zur besseren Lokalisation der Blaufärbung wurden die Gewebe nach der X-Gluc-Färbung durch mehrmaliges Inkubieren in Ethanol (70 %) entfärbt. Die Lokalisierung des angefärbten Gewebes erfolgte mit Hilfe eines Binokular-Mikroskops und die Dokumentation mittels eingebauter Digitalkamera.

II.23. Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten

Einen Tag vor der Injektion wurden die Oozyten einem Frosch operativ entnommen. Die Ovarien wurden grob mittels zweier spitzer Pinzetten in kleine Pakete zerteilt und einer Kollagenase-Behandlung unterzogen (0,1 g Kollagenase in 20 ml Barth-Lösung, 75 Minuten bei Raumtemperatur auf einem langsamen Schüttler), bei der die Oozyten-umgebende Follikel-Zellschicht enzymatisch verdaut wurde. Nach dem Verdau wurden die Oozyten mit Barth-Lösung (+ 0,2 g BSA/200 ml) gewaschen. Eine anschließende Inkubation in K_2HPO_4 -Lösung (+ 0,05 g BSA/50 ml; 60 Minuten bei RT auf langsamen Schüttler) führte zur Freisetzung der Oozyten, wenn diese vorsichtig durch eine Plastik-Pasteurpipette mit weiter Öffnung gesaugt wurden (Cao *et al.*, 1992). Die Oozyten wurden nach dieser Behandlung für mindestens 2 Stunden in Barth-Lösung bei 18°C im Dunkeln inkubiert, bevor intakte Oozyten des Stadiums V-VI für Injektion und Experimente ausgewählt werden konnten. Die Injektion erfolgte einen Tag später.

II.24. Injektion von cRNA in die *Xenopus laevis* Oozyten

Die in der *in vitro* Transkription (siehe III.6.) hergestellte cRNA (0,5 µg/µl) konnte nun mittels eines Mikroinjektors (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) in den entsprechenden Mengen in einem Volumina von 30 bis 50 nl in die Oozyten injiziert werden. Nach der Injektion mussten die Oozyten zur Expression in Barth-Lösung inkubiert werden (18°C) bevor sie nach 2 bis 5 Tagen mittels Zwei-Elektroden Spannungsklemm-Technik vermessen werden konnten (detaillierte Beschreibung der elektrophysiologischen Experimente bei Kursawe, 2002).

III. Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit ist, wie auch die Einleitung und die Diskussion, in zwei Abschnitte gegliedert. Auf die Ergebnisse zu ausgewählten Protein-Phosphatasen (III.1.) folgen die Daten zu NIC1 und weiteren MATE-Membranproteinen (III.2.).

III.1. Charakterisierung ausgewählter Protein-Phosphatasen aus *Arabidopsis thaliana*

Der Analyse von TOPP2 (III.1.1.) schloss sich die Auswahl und Charakterisierung weiterer Protein-Phosphatasen an (III.1.2.).

III.1.1. TOPP2

In der Arbeitsgruppe Müller-Röber am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie wurde durch Ulrich Menke (1999) eine Kollektion an **Expressed Sequence Tags** (ESTs) von Protein-Kinasen (PK) und Protein-Phosphatasen (PP) der Modellpflanze *A. thaliana* etabliert. Diese Sammlung umfasst ca. 300 Klone und wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen genutzt, um mittels Expressionsprofilierung ein besseres Verständnis über Signaltransduktionsprozesse innerhalb der Pflanze zu bekommen. Die Sequenzen der ESTs wurden durch PCR amplifiziert, die PCR-Produkte auf Nylonmembranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Kollektionen von Gesamtblatt oder von „Epidermalen Fragmenten“ (EF; eine Anreicherung von Schließzellen) hybridisiert. Das Ziel dieser Versuche war die Identifikation von PK und PP, die präferenziell in Schließzellen exprimiert werden und eine potenzielle Rolle bei der Signaltransduktion dieser Zellen spielen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren die Hybridisierungen mit den zwei cDNA-Kollektionen bereits abgeschlossen und mehrfach repliziert (Menke, 1999; Zähndler, 2000). Die ESTs mit den Nummern 74 und J30 waren dabei als präferenziell in EF von *A. thaliana* exprimierte Gene identifiziert worden (Zähndler, 2000). EST 74 kodiert für eine PK der Shaggy-Unterfamilie (Isoform Gamma) und EST J30 kodiert für die Isoform 2 der „Type One Protein Phosphatases“ (TOPP2).

III.1.1.1. RNA-Blot Analyse der Expression von *EST 74* und *TOPP2*

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den vorherigen Expressionsprofilierungs-Experimenten wurde die Expression der zwei vorselektierten ESTs in RNA-Blot Analysen getestet. Dabei dienten die ESTs J30 und 74 als Sonde zur Untersuchung des Transkriptgehalts beider Gene in RNA-Präparationen von Gesamtblatt und EF. Um eine Abhängigkeit der Expression von der Tageszeit zu untersuchen, wurde vor, während und nach einer Lichtperiode von zwölf Stunden RNA extrahiert und mittels RNA-Blots untersucht. Da sowohl EST J30, als auch EST 74 Gene repräsentieren, welche zu größeren Genfamilien gehören, wurden für

beide ESTs auch RNA-Blot Analysen mit Isoform-spezifischen Sonden durchgeführt. Zur Gewinnung dieser Sonden wurden durch Restriktionen der ESTs (J30 mit *Nci* und EST 74 mit *Nsp*) DNA-Fragmente gewonnen, die fast ausschließlich aus den variablen 3'-untranslatierten Bereichen der Gene bestanden. Während sich für EST 74 die Ergebnisse der Expressionsprofilierungs-Experimente in den RNA-Blot Analysen nicht bestätigen lassen konnten (Abb.III.1.a und b), stimmten die Ergebnisse für EST J30 qualitativ mit den vorherigen Experimenten überein. Die RNA-Blot Experimente, in denen entweder der gesamte EST als Sonde eingesetzt wurde (Abb.III.1.d) oder nur der 3'-spezifische Bereich der cDNA als Sonde diente (Abb.III.1.e), zeigten beide für *TOPP2* einen höheren Transkriptgehalt in EF-RNA als in Gesamtblatt-RNA. Die Ergebnisse der RNA-Blot Experimente sind in Abbildung III.1. zusammengefasst.

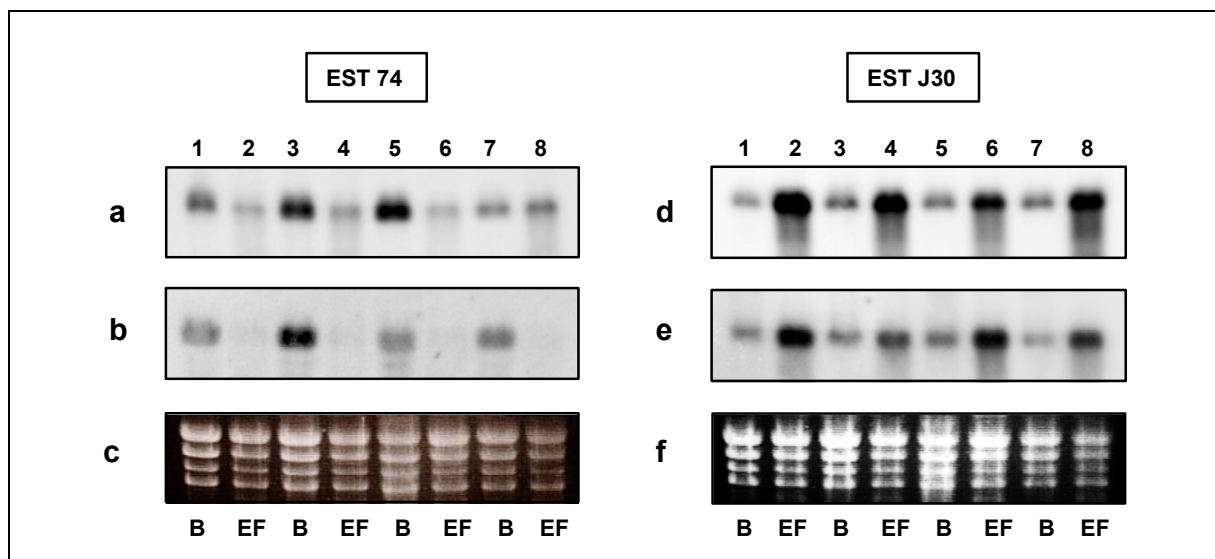


Abb. III.1. RNA-Blot Analyse von *EST74* und *TOPP2* in EF und Gesamtblatt

Die Abbildungen a, b, d und e zeigen RNA-Blots nach Hybridisierung mit den gesamten (a und d) oder den 3'-Bereichen der beiden ESTs. Die Abbildungen c und f zeigen als Ladungskontrolle die ribosomale RNA nach ihrer Auftrennung im RNA-Gel. Die Spuren 1, 3, 5 und 7 repräsentieren jeweils RNA von Gesamtblatt (B) und die Spuren 2, 4, 6 und 8 enthielten die RNA von EF. Die jeweiligen RNA-Proben wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten isoliert (Spur 1 und 2: RNA eine Stunde vor Beginn einer zwölfstündigen Lichtphase; Spur 3 und 4: RNA zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase; Spur 5 und 6: RNA zwei Stunden vor Ende der Lichtphase; Spur 7 und 8: RNA eine Stunde nach Ende der Lichtphase).

Die RNA-Blots a (ganze cDNA als Sonde) und b (3'-UTR der cDNA als Sonde) zeigen, dass für EST 74 keine EF-spezifische Expression bestätigt werden konnte. Der Transkriptgehalt in den Gesamtblatt-Proben war deutlich höher als in EF. Eine Ausnahme bilden die in den Spuren 7 und 8 von Blot a aufgetragenen RNA-Proben. Hier waren die mit EST 74 als Sonde detektierten Signale in den RNA-Präparationen von Gesamtblatt und EF gleich stark. Die RNA-Blots d (ganzer EST als Sonde) und e (3'-UTR als Sonde) wurden mit Sonden, die von EST J30 abgeleitet waren, hybridisiert. Es zeigte sich in allen Fällen eine erhöhter Transkriptgehalt in den RNA-Präparationen von EF.

III.1.1.2. Expressionsanalyse von *TOPP2* mittels Promotor-*gusA* Fusionen

Zur gewebespezifischen Lokalisation der *TOPP2*-Genexpression wurden nach Bestätigung der präferenziellen EF-Expression in den RNA-Blot Experimenten zwei Promotorfragmente mit einer Größe von 537 bp und 1197 bp in den binären Vektor pCAMBIA1303 kloniert. Nach *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation von *A. thaliana* (Ökotyp C24) wurde die vom Promotorfragment gesteuerte *gusA*-Expression untersucht. Die Abbildung III.2. zeigt die hergestellten Promotor-Reportergen Konstrukte.

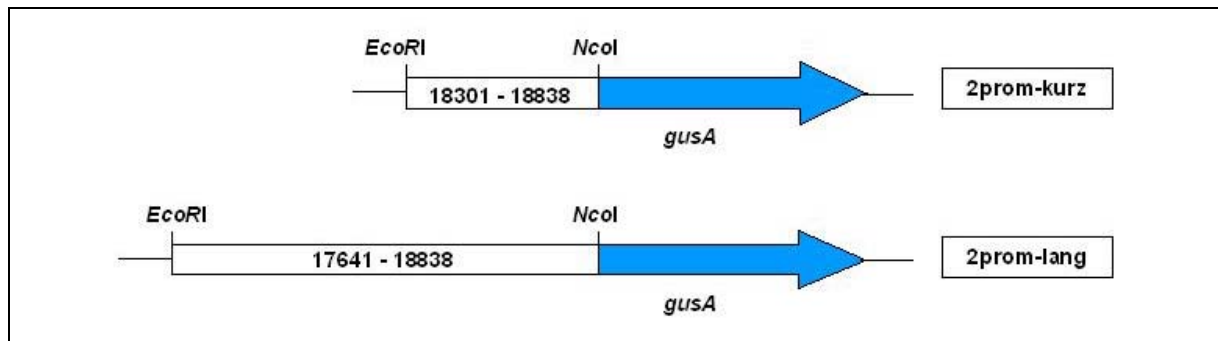


Abb. III.2. Klonierung von *TOPP2*-Promotorfragmenten in pCAMBIA1303

Zwei Fragmente aus dem DNA-Bereich direkt vor dem *TOPP2*-Startcodon (Nukleotide 18839 bis 18841 in Sequenz AB016890) wurden vor das *gusA*-Gen im Vektor pCAMBIA1303 kloniert. Die Nummerierung der beiden Fragmente zeigt den klonierten Bereich der Sequenz AB016890, welche diesen Bereich des Chromosoms 5 abdeckt, an. Das Konstrukt „2prom-kurz“ enthielt ein DNA-Fragment mit einer Länge von 537 bp (18301 bis 18838) und das Promotorfragment in „2prom-lang“ war 1197 bp lang (17641 bis 18838).

Nach ihrer Hygromycin-Selektion in der Gewebekultur wurden jeweils zehn Primärtransformatanten der Transformationen mit den Konstrukten 2prom-kurz und 2prom-lang auf Erde bis zur Samenreife kultiviert. Nach der Wiederholung dieser Selektion für die F1- und F2-Pflanzen wurden insgesamt zwanzig F2-Pflanzen (jeweils zehn Pflanzen pro Konstrukt) auf *TOPP2*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität hin untersucht. Die spezifischen GUS-Färbungen waren in insgesamt sechzehn der untersuchten Pflanzen zu beobachten. Sie variierten in ihrer Intensität, traten aber immer in den gleichen Geweben auf. Es waren hauptsächlich die vaskulären Wurzel-, Stengel- und Blattgewebe junger Pflanzen, die Filamente älterer Blüten und die Schotenhüllen angefärbt (Abb. III.3.). Die Aktivität im vaskulären Blattgewebe zeigte sich in Blättern aller Altersstufen. Zusätzlich waren in älteren Blättern auch die Hydathoden angefärbt. Verglich man in jungen Pflanzen die Signalintensitäten in den vaskulären Geweben von Wurzeln, Stengeln und Blättern miteinander, so zeigte sich die stärkste Blaufärbung in den Blättern. Im Gegensatz zu den Blättern, in denen zu jedem Zeitpunkt GUS-Aktivität detektierbar war, war in älteren Stengeln keine Blaufärbung mehr detektierbar. Auch die Färbung des vaskulären Wurzelgewebes war besonders bei jungen Pflanzen zu erkennen. In ihnen nahm die Signalintensität zur Wurzelspitze hin ab. In den Blüten der Pflanzen war GUS-Färbung im Blütenansatz, in den Filamenten der Staubblätter und in

einem Bereich unterhalb der Narbe zu erkennen. Die Aktivität in diesen Blütengeweben war in sehr jungen Blüten nicht zu beobachten und nahm mit dem Alter zu. Die Abbildung III.3. zeigt die Analyse der *TOPP2*-Promotor gesteuerten Expression des *gusA*-Gens im Detail.

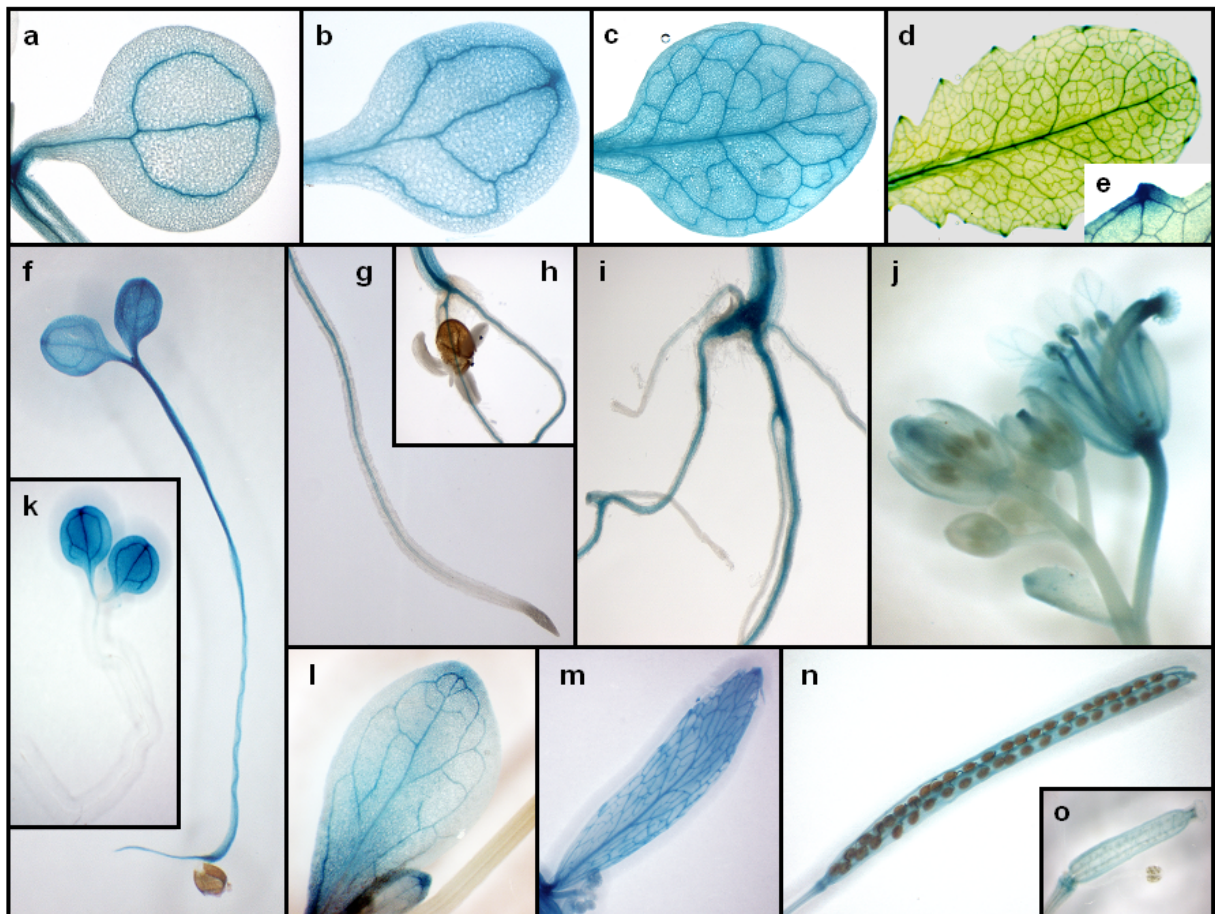


Abb. III.3. *TOPP2*-Promotor vermittelte Expression von GUS in transgenen Pflanzen

Die β -Glucuronidase induzierte Blaufärbung war hauptsächlich in den vaskulären Geweben der transgenen Pflanzen zu beobachten. Sowohl in den Blattadern von Blättern aller Altersstufen (a, b, c und d), als auch im Leitgewebe von Wurzeln und Stengeln junger Pflanzen (g, h und i) und in Blattadern von Stengelblättern (l und m) war GUS-Aktivität detektierbar. Außer im vaskulären Gewebe war diese auch in den Hydathoden älterer Blätter (e) und in den Hüllen von Schoten unterschiedlichen Alters (n und o) nachweisbar. Bei jungen Keimlingen war GUS-Aktivität in der gesamten Pflanze zu erkennen (f). Eine Halbierung der Inkubationszeit mit dem Farbstoff X-Gluc auf sechs Stunden zeigte allerdings, dass bei jungen Keimlingen die Blaufärbung im Bereich der Kotyledonen beginnt (k). Auch in Teilen älterer Blüten (j) konnte GUS-Aktivität beobachtet werden. Im Gegensatz zu jungen Blüten, die nicht angefärbt wurden, zeigte sich mit zunehmendem Alter der Blüten zuerst im oberen Bereich der Narbe, später auch im Bereich der Blütenbasis und in den Filamenten der Staubblätter GUS-Aktivität. Keine Färbung war in älteren Stengeln (l) und in den Samen der Pflanzen (n) detektierbar. Die beiden Konstrukte 2prom-lang und 2prom-kurz wurden parallel untersucht und führten zu den gleichen *gusA*-Expressionsmustern.

Bei der Analyse der *TOPP2*-Genexpression mittels der Promotor-*gusA* Fusionen zeigte sich in keinem Altersstadium der Pflanzen eine Färbung von Schließzellen. Die deutliche GUS-Aktivität im vaskulären Gewebe der Blätter war ein Hinweis, dass auch dieses stabile

Gewebe während der EF-Präparation angereichert wurde. Dieses Ergebnis verdeutlichte die Notwendigkeit einer zellulären Expressionsanalyse mittels Promotor-Reportergen Fusionen.

III.1.1.3. Reduktion der *TOPP2*-Genaktivität in *Arabidopsis thaliana*

Parallel zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression wurde die *TOPP2*-Genaktivität in transgenen Pflanzen reduziert. Die cDNA-Sequenzen der acht beschriebenen *TOPP*-Gene aus *A. thaliana* (Smith und Walker, 1998) wurden verglichen und die *TOPP2*-spezifischen Bereiche ermittelt. Der größte Isoform-spezifische Bereich bestand aus dem 3'-UTR des Gens. Er hatte eine Länge von 485 bp und wurde genutzt, um in pCAMBIA1300 ein RNAi-Konstrukt herzustellen, in dem dieser sowohl in „sense“- als auch in „antisense“-Orientierung vorkam. Die verfolgte Klonierungsstrategie ist in Abbildung III.4. dargestellt.

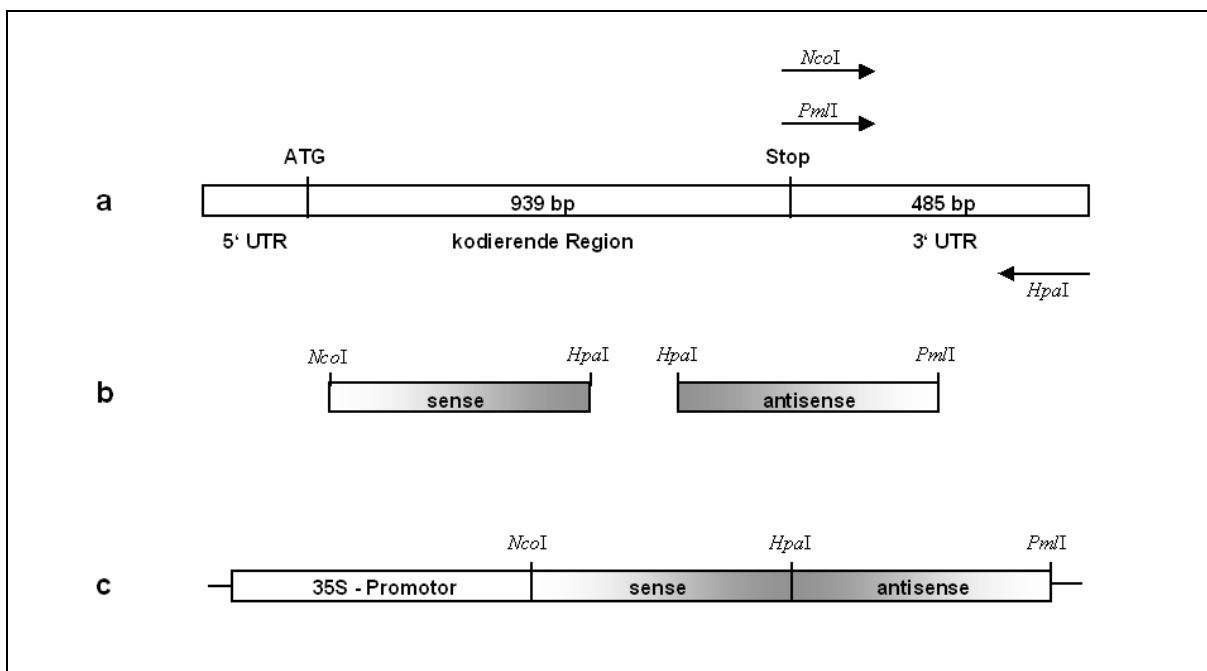


Abb. III.4. Herstellung eines *TOPP2*-spezifischen RNAi-Konstruktes

Die mRNA-Sequenz von *TOPP2* gliedert sich in einen variablen 5'-UTR, einen hoch konservierten translatierten Bereich (> 80% Sequenzidentität zu den anderen *TOPP*-Isoformen aus *A. thaliana*) und einen variablen 3'-UTR von 485 bp Länge (a). Mit Hilfe der Primer *Nco*I-for / *Hpa*I-rev bzw. *Pml*-for / *Hpa*I-rev wurde der 3'-UTR in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert (a, b) und unter Nutzung der angefügten Schnittstellen in den Vektor pCAMBIA1300 in „sense“- und „antisense“- Orientierung kloniert (c).

Das „*TOPP2*-RNAi“ Konstrukt wurde mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* (Ökotyp C24) transformiert. Nach Selektion der transgenen Pflanzen aufgrund ihrer Hygromycin-Resistenz wurden diese bis zur Samenreife hinsichtlich Morphologie und Entwicklungsgeschwindigkeit mit parallel kultivierten Wildtyppflanzen verglichen. In sieben der dreißig transgenen Linien war eine veränderte Blattentwicklung zu beobachten. Zum Teil waren die Blätter eingerollt,

entwickelten sich asymmetrisch oder besaßen eine Kombination beider Phänotypen. Die Abbildung III.5. zeigt einen Überblick der beobachteten Blattphänotypen.

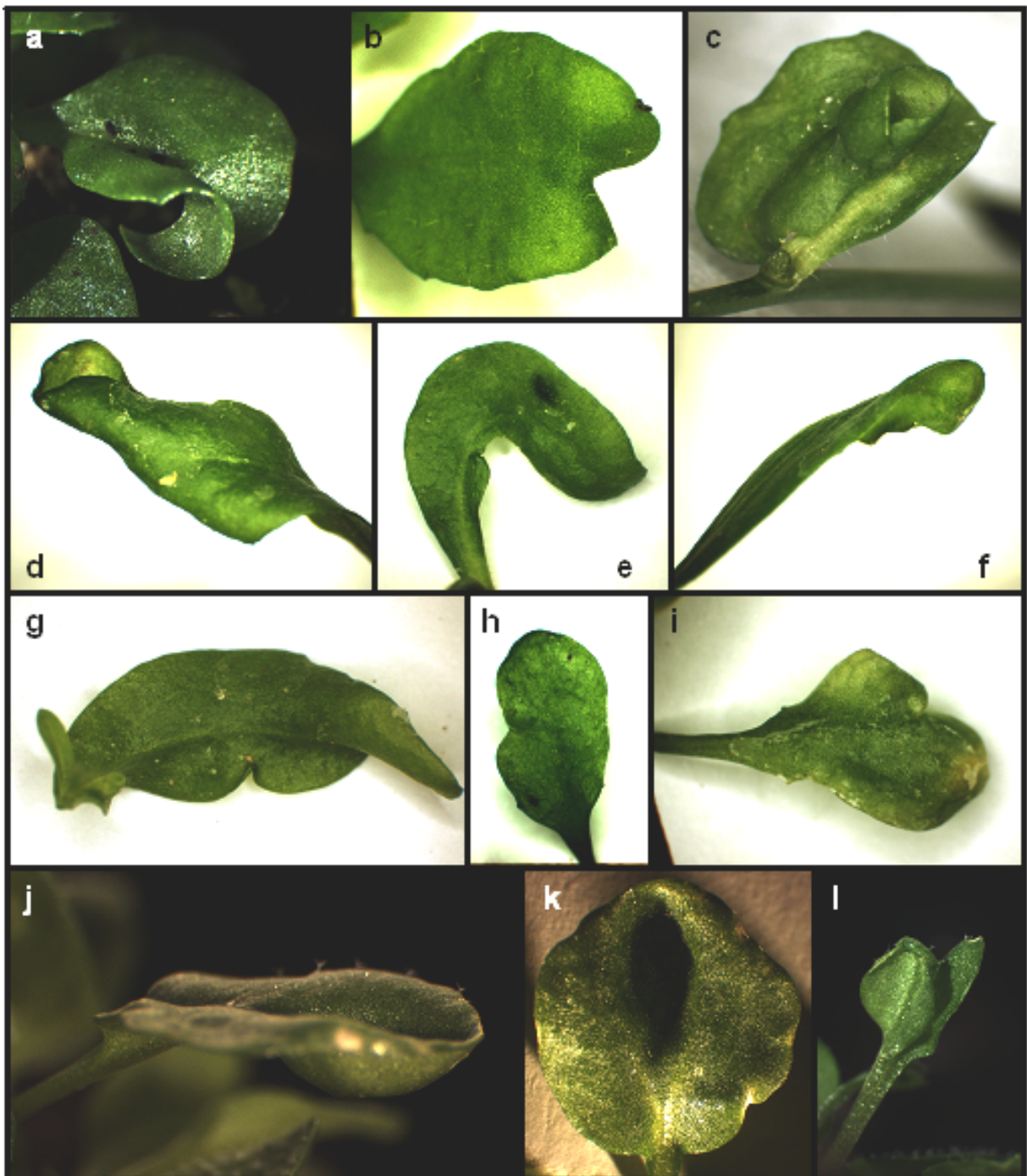


Abb. III.5. Blattphänotypen von *TOPP2*-RNAi Pflanzen

Die in ihrem Wuchs veränderten Blätter ließen sich in mehrere Kategorien einteilen: Die Blätter waren eingerollt (a, b und c), zeigten eine asymmetrische Entwicklung (g, h, i) oder eine Kombination beider Phänotypen (d, e und f). Auch Blätter mit einer zentralen Vertiefung (j in Seitenansicht, k in Aufsicht) oder einer Wuchsform, die möglicherweise aus der Fusion von zwei Einzelblättern entstand (l), konnten beobachtet werden.

Das Auftreten veränderter Blätter wurde als Kriterium genutzt, um einzelne Linien zur detaillierteren Analyse auszuwählen und von ihnen die Blatt-RNA zu isolieren. In RNA-Blot Experimenten wurde anschließend der *TOPP2*-Transkriptgehalt dieser Pflanzen mit dem des Wildtyps (C24) verglichen. Es zeigte sich, dass in allen sieben getesteten Linien die *TOPP2*-Transkriptgehalte deutlich reduziert waren. Die untersuchten Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp von kleinerem Wuchs und besaßen weniger sekundäre Seitensprosse. Die Abbildung III.6. zeigt die Phänotypen der getesteten Linien und fasst die Ergebnisse der RNA-Blot Analysen zusammen.

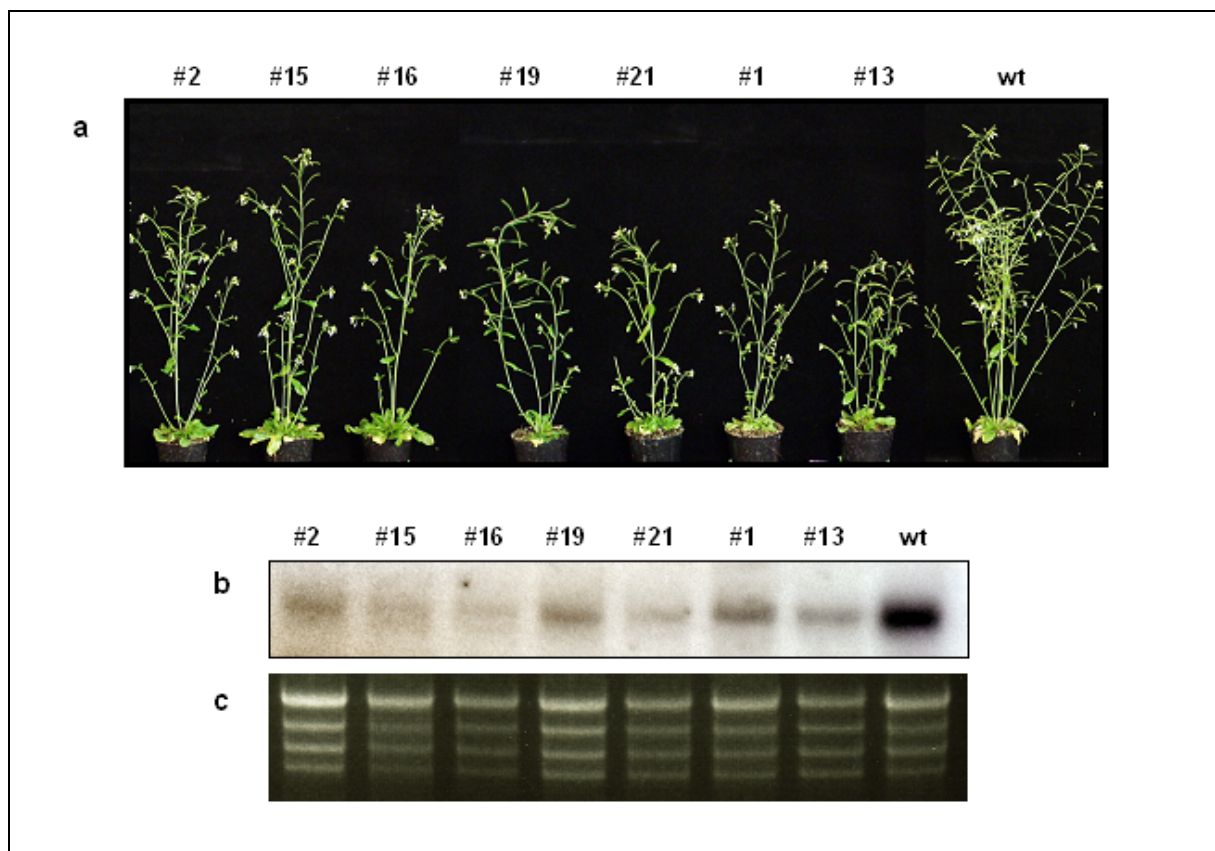


Abb. III.6. RNA-Blot Analyse und Phänotyp von Pflanzen mit verminderter *TOPP2*-Genaktivität

Von Pflanzen, die aufgrund ihrer Blattphänotypen ausgewählt worden waren (a), wurde die *TOPP2*-Expression in Gesamtblatt-RNA untersucht (b). Im Vergleich zum Wildtyp (C24) wurden für alle untersuchten Pflanzen deutlich reduzierte *TOPP2*-Transkriptgehalte gefunden (b). Teil c der Abbildung zeigt als Ladungskontrolle die ribosomalen RNAs nach Auftrennung im RNA-Gel.

III.1.2. Identifikation und Charakterisierung weiterer Protein-Phosphatasen aus EF

Nachdem für *TOPP2* eine präferenzielle Expression in EF, aber keine Genaktivität in Schließzellen gefunden werden konnte, wurde in einem neuen Screeningansatz untersucht, welche PP-Gene mit Sequenzhomologie zu PP1/PP2A überhaupt in EF exprimiert werden.

III.1.2.1. Screeningstrategie

Ausgehend von EF-mRNA wurde mit Hilfe des Primers RACE-PP0 cDNA synthetisiert. Aus dieser cDNA-Kollektion konnte mittels der degenerierten Primer RACE-PP1 und RACE-PP2, welche von den konservierten PP1-/PP2A-Aminosäuremotiven GDYVDRG und YGFYDEC abgeleitet waren, cDNAs isoliert und analysiert werden. Der verwendete Screeningansatz ist in Abbildung III.7. skizziert.

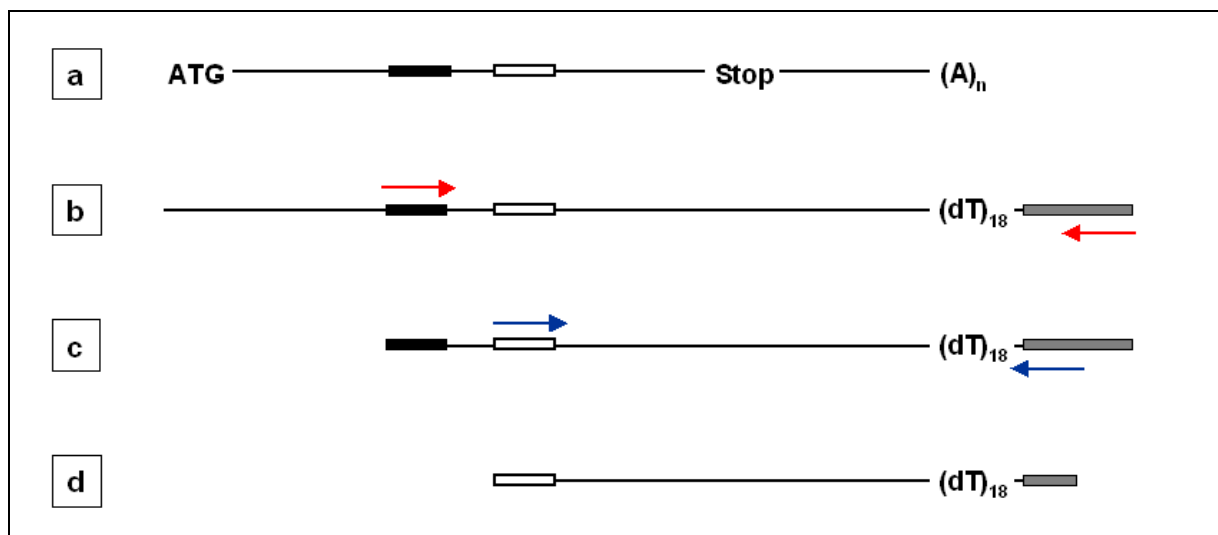


Abb. III.7. Screeningansatz zur Isolation von PP-cDNAs aus EF

Aus EF wurde mRNA gewonnen (a) und mit Hilfe des Primers RACE-PP0 in cDNA revers transkribiert (b). Der Primer RACE-PP0 enthielt neben einem oligo-dT-Bereich von 18 Nucleotiden auch einen Adapter (grau markierter Bereich), der die spätere Bindung von RACE-PP1 (b, roter Pfeil) und RACE-PP2 (c, blauer Pfeil) ermöglichte. Die synthetisierte cDNA wurde in einer ersten PCR mit dem degenerierten Primer RACE-PP1 amplifiziert. RACE-PP1 konnte dabei sowohl an die vom Aminosäuremotiv GDYVDRG (konserviert in allen PP1 und PP2A) abgeleitete DNA-Sequenz (schwarz markierter Bereich) als auch an eine Sequenz auf dem Adapter binden. Um sicher zu stellen, dass die Amplifikate von PP-cDNAs stammten, wurden die erhaltenen PCR-Produkte (c) in einer „nested“ PCR mit dem Primer RACE-PP2 selektiert. RACE-PP2 erkannte die von der konservierten PP-Domäne YGFYDEC abgeleiteten DNA-Sequenzen (weißes Rechteck) und eine Adaptersequenz. Die entstandenen PCR-Produkte (d) enthielten neben Bereichen der kodierenden Regionen die kompletten 3'-UTRs der amplifizierten PP-cDNAs. Dies ermöglichte die eindeutige Identifizierung von nahezu identischen PP-Isoformen.

III.1.2.2. Isolierung neuer PP-Transkripte aus EF

Die nach der zweiten PCR des Screeningansatzes (mit RACE-PP2) erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und 56 Klone mittels Restriktionsanalyse auf Redundanz untersucht. Nicht redundante Sequenzen wurden anschließend sequenziert und durch Datenbankrecherchen die entsprechenden Gene identifiziert. Mit dieser Vorgehensweise konnten 52 Klone eindeutig zugeordnet werden. Im Folgenden wurden die isolierten cDNAs allen in *A. thaliana* vorkommenden PP1-/PP2A-verwandten Sequenzen gegenübergestellt. Zur Identifikation der im Genom vorhandenen PP-Gene wurden in Datenbanken alle zu *TOPP2* verwandten Sequenzen aus *A. thaliana* identifiziert, in Aminosäuresequenzen translatiert und aufgrund ihrer Sequenzübereinstimmungen gruppiert. Die Abbildung III.8. fasst die Ergebnisse zu gefundenen und vorhandenen PP-Sequenzen zusammen.

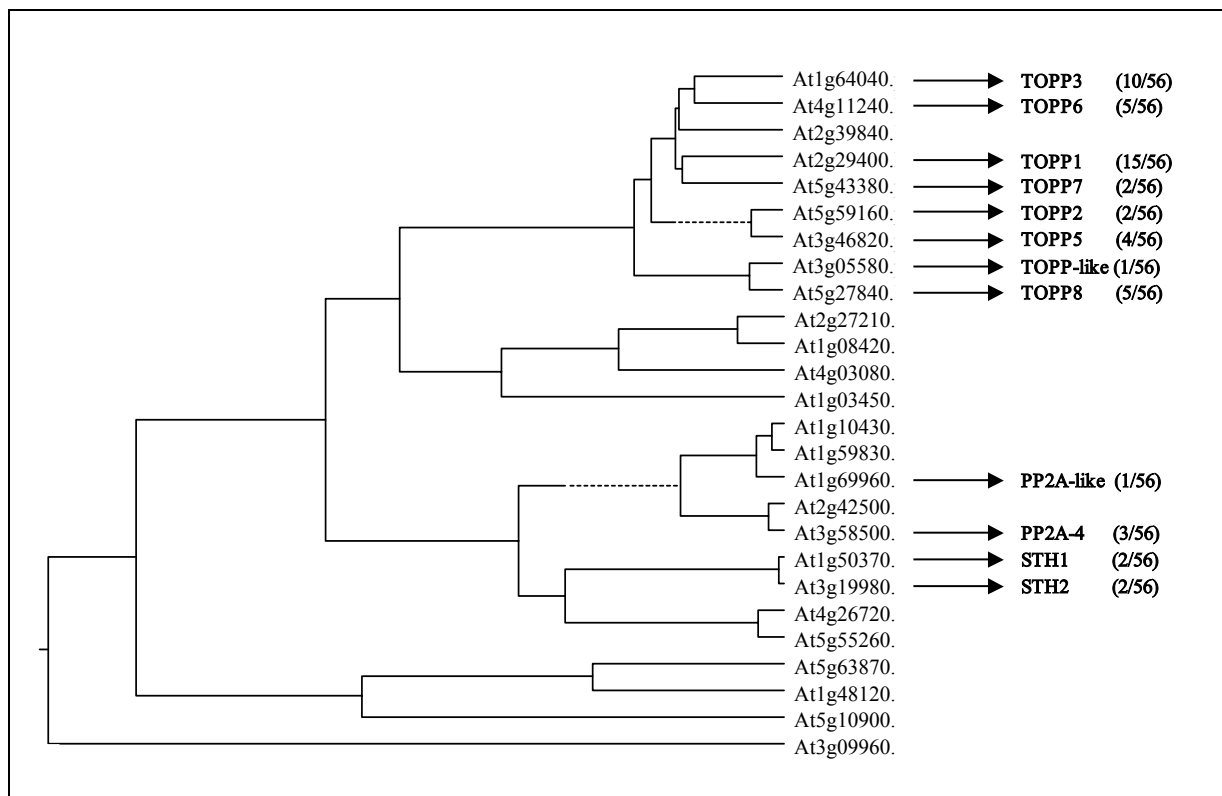


Abb. III.8. Im Screeningansatz mit degenerierten PP-Primern isolierte cDNAs aus EF

Die Gruppierung der Sequenzen im linken Teil der Abbildung zeigt die Homologie aller abgeleiteten PP1- und PP2A-verwandten Sequenzen von *A. thaliana*. Der Baum wurde mit dem Programm ClustalX (im DNA-STAR Programmpaket enthalten) erstellt und spiegelt die Identität der Sequenzen (nicht aber ihre phylogenetische Verwandtschaft) wieder. Auf der rechten Seite der Abbildung werden den vorhandenen Sequenzen alle im Screeningansatz aus EF isolierten cDNAs gegenübergestellt. Die Zahlen in Klammern zeigen den Anteil der jeweils gefundenen cDNAs an der Gesamtheit aller 56 untersuchten cDNAs.

Es zeigte sich, dass zwölf der insgesamt 26 PP1/PP2A-verwandten Gene aus *A. thaliana* als cDNAs in der cDNA-Kollektion von EF identifiziert werden konnten. Es handelte sich dabei

um schon beschriebene *TOPP*- und *PP2A*-Isoformen, aber auch um neue cDNAs, die zum Zeitpunkt dieser Experimente noch nicht beschrieben waren (und zum Teil immer noch nicht sind). Diese neu identifizierten cDNAs gehörten sowohl zum PP1-Typ (At3g05580, am nächsten verwandt zu *TOPP8*), zum PP2A-Typ (At1g69960), als auch zu einer neuen Untergruppe von zwei Genen, für die erst während des Verfassens dieser Arbeit erste Funktionen beschrieben wurden (Kim *et al.*, 2002). Die identifizierten cDNAs dieser neuen PP-Untergruppe (At1g50370 und At3g19980) hatten große Sequenzübereinstimmung zu *sit4*, der einzigen essenziellen PP aus *Saccharomyces cerevisiae*. Aus diesem Grund wurden die beiden Gene *STH1* (*sit4* homolog 1) und *STH2* (*sit4* homolog 2) genannt. Die von *STH1* und *STH2* abgeleiteten Proteinfragmente zeigten große Identität und waren näher zu Proteinen aus Mensch, Ratte und Hefen verwandt, als zu weiteren Proteinen aus *A. thaliana* (PP-X1 und PP-X2). Die Abbildung III.9. zeigt die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der klonierten cDNA-Fragmente von *STH1* und *STH2* und ihre Homologie zu Proteinen aus anderen Organismen und *A. thaliana*.

STH1	<u>YGFYDEC</u> QRK	YGNANAWRYC	TDVFDYLTLS	AIIDGT	<u>A</u> L	LCV
STH2	<u>YGFYDEC</u> QRK	YGNANAWRYC	TDVFDYLTLS	AIIDGT	<u>V</u> L	LCV
HGGLSPDVRT		IDQIRLIERN	CEIPHEGPFC	DLMWSDPEDI	ETWAVSPRGA		
HGGLSPDVRT		IDQIRLIERN	CEIPHEGPFC	DLMWSDPEDI	ETWAVSPRGA		
GWLFGRVTT		EFNHIN <u>K</u> LDL	VCRAHQVLVQE	GLKYMFDQDKG	LVTVWSAPNY		
GWLFGRVTT		EFNHIN <u>N</u> LDL	VCRAHQVLVQE	GLKYMFDQDKG	LVTVWSAPNY		
CYRCGNVASI		LSFNDNMERE	VKFFTET EEN	NQMRGPRTGV	PYFL*		
CYRCGNVASI		LSFNDNMERE	VKFFTET EEN	NQMRGPRTGV	PYFL*		

Name	Accession	Organismus	Identität (Aminosäuren)
STH1	At1g50370	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 % (184/184)
STH2	At3g19980	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98,9 % (182/184)
PP-6	000743	<i>Homo sapiens</i>	69,0 % (127/184)
PP-6	Q64620	<i>Rattus norvegicus</i>	68,4 % (126/184)
PP-E1	P36614	<i>S. pombe</i>	66,3 % (122/184)
PP-V	Q27884	<i>Drosophila</i>	62,5 % (115/184)
SIT4	P20604	<i>S.cerevisiae</i>	60,6 % (103/170)
PP-X1	P48529	<i>Arabidopsis thaliana</i>	59,8 % (110/184)
PP-X2	P48528	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58,1 % (107/184)

Abb. III.9. Aminosäuresequenzen der klonierten *STH*-Fragmente und Homologie zu anderen Proteinen

Die gefundenen cDNA-Fragmente von *STH1* und *STH2* wurden ausgehend von den RACE-PP2 Primersequenzen, welche vom PP-Motiv YGFYDEC abgeleitet worden waren, in Aminosäuresequenzen translatiert. Wie im oberen Teil der Abbildung ersichtlich, wiesen die beiden abgeleiteten Sequenzen STH1 (obere der paarweise angeordneten Sequenzen) und STH2 nur zwei unterschiedliche Aminosäuren auf. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen dienten als Referenz zur Datenbankrecherche. Es wurden zu STH1 und STH2 homologe Proteine aus Mensch, Ratte, *S. pombe*, *Drosophila* und *S. cerevisiae* gefunden. Erst danach folgten mit Aminosäureidentitäten von 59,8% bzw. 58,1% die Protein-Phosphatasen PP-X1 und PP-X2 aus *A. thaliana*

III.1.2.3. Untersuchung der zellulären Expression von *TOPP1*, *TOPP5*, *STH1* und *STH2*

Die gefundenen PP-Gene waren in der EF cDNA-Kollektion sehr unterschiedlich repräsentiert. So lag der Anteil der klonierten *TOPP1*-cDNAs bei 26 Prozent (15 von 56 untersuchten cDNAs). Dieses Ergebnis führte zur Auswahl von *TOPP1* für eine detailliertere Analyse. Wegen seiner nahen Verwandtschaft zu *TOPP2* wurde außerdem *TOPP5* genauer auf seine zelluläre Expression hin untersucht. Da die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *STH1* und *STH2* Sequenz-homologien zu PP anderer Spezies, u. a. zum essenziellen Protein Sit4 aus *S. cerevisiae*, aufwiesen und die Funktionen der beiden Gene zum Zeitpunkt der Isolation gänzlich unbekannt waren, wurden auch sie für eine weitere Analyse ausgewählt. Die Untersuchung von Promotor-*gusA* Fusionen in transgenen Pflanzen diente dabei zur Lokalisation der zellulären Expressionsmuster aller vier Gene. Von ihnen wurde jeweils ein Promotorfragment ausgewählt, durch PCR amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Nach der Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte wurden diese in den Vektor pCAMBIA1303 umkloniert. Die zur Pflanzentransformation eingesetzten Promotor-Reporterfusionen werden in Abbildung III.10. dargestellt.

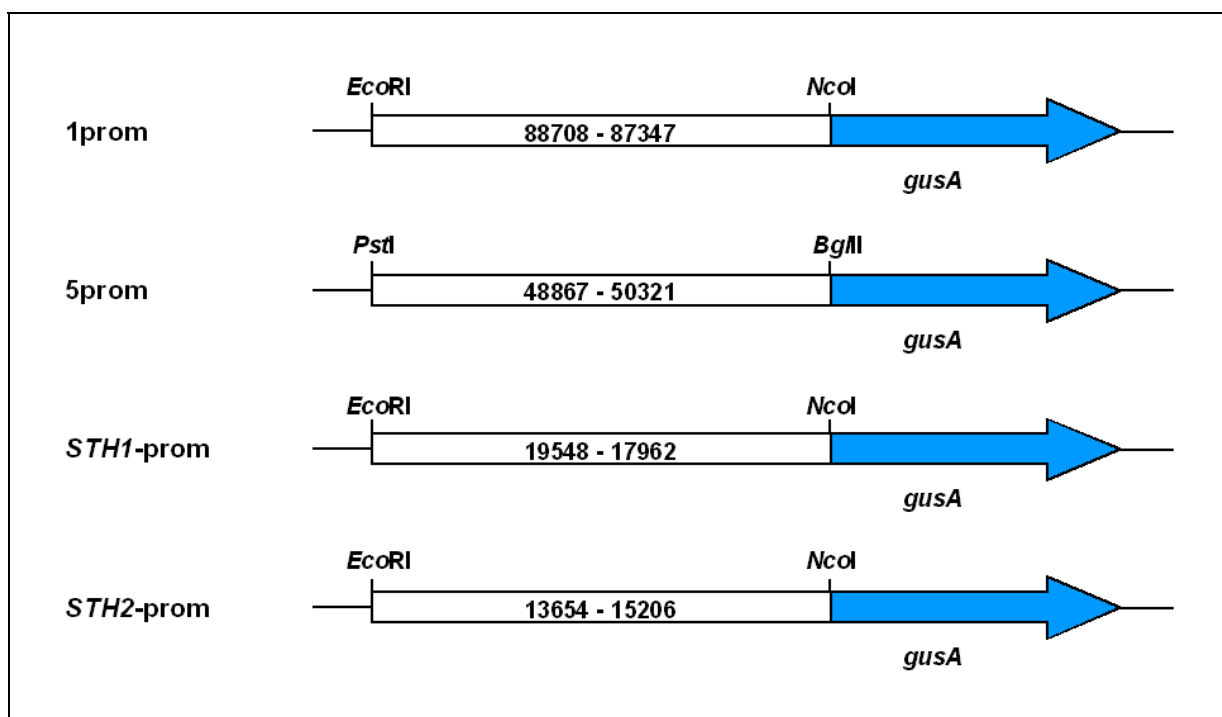


Abb. III.10. Promotor-*gusA* Fusionen von *TOPP1*, *TOPP5*, *STH1* und *STH2*

Durch Anfügen der Restriktionsschnittstellen *EcoRI/NcoI* (*TOPP1*, *STH1* und *STH2*) oder *PstI/BglII* (*TOPP5*) während der PCR-Amplifikation der Promotorfragmente wurden die gerichteten Klonierungen der PCR-Produkte vor das *gusA*-Gen in pCAMBIA1303 ermöglicht. Die vier klonierten Promotorfragmente hatten eine Länge von 1454 bp (*TOPP5*; Seq. AL096859 von 48867 bis 50321), 1361 bp (*TOPP1*; Seq. AC004561 von 88708 bis 87347), 1586 bp (*STH1*; Seq. AC007980 von 19548 bis 17962) und 1552 bp (*STH2*; Seq. AP002050 von 13654 bis 15206).

Die vier Promotor-*gusA* Konstrukte wurden anschließend mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* (Ökotyp C24) transformiert und die Primärtransformanten aufgrund ihrer Hygromycin-Resistenz selektiert. Nach einer weiteren Hygromycin-Selektion wurden für jedes Konstrukt mindestens zwanzig F1-Pflanzen auf gewebespezifische GUS-Färbungen hin untersucht. Die Promotorfragment-gesteuerten GUS-Aktivitäten waren jeweils im Großteil der untersuchten Pflanzen detektierbar (für jedes Konstrukt mindestens in fünfzehn Pflanzen). In den einzelnen Pflanzen eines Konstrukts zeigten sich zum Teil unterschiedliche Intensitäten der GUS-Färbungen, sie traten aber immer in den gleichen Geweben auf.

III.1.2.3.1. Analyse der *TOPP1*- und *TOPP5*-Promotor vermittelten *gusA*-Expression

Der Vergleich der *TOPP1*-, *TOPP2*- oder *TOPP5*-Promotor vermittelten GUS-Aktivitäten zeigte, dass die drei entsprechenden Gene individuelle Expressionsmuster besitzen. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede sind in Tabelle III.1. zusammengefasst und werden anschließend im Detail dargestellt (Abb.III.11. und Abb.III.12.).

Tab. III.1. *TOPP1*-, *TOPP2*- und *TOPP5*-Promotor vermittelte GUS-Aktivitäten

Gewebe	<i>TOPP1</i>	<i>TOPP2</i>	<i>TOPP5</i>
Schließzellen der Blätter	+	-	-
vaskuläres Gewebe der Blätter	-	+	+
vaskuläres Gewebe des Stengels	-	+	+
vaskuläres Gewebe junger Wurzeln	+	+	-
Ansatzpunkte junger Seitenwurzeln	+	-	-
Hydathoden der Blätter	-	+	-
Blütenbasis	-	+	-
Blütenblätter	+	-	+
Filamente der Staubblätter	-	+	-
Antheren der Staubblätter	+	-	-
Schotenhülle	+	+	-
oberer Bereich der Narbe	+	+	-

Die *TOPP1*-Promotor gesteuerte *gusA*-Expression war in Schließzellen von Pflanzen aller Altersstufen detektierbar. Es zeigte sich aber, dass die Blaufärbungen der Stomata nicht gleichmäßig verteilt waren. Die deutlichste GUS-Aktivität war in Spaltöffnungen der Blattränder und der Blattspitze vorhanden. Weitere GUS-Aktivität fand sich in den Wurzeln junger Pflanzen, in Bereichen der Blüte (Pollen und Narbe) und in den Schotenhüllen. Im Gegensatz zur *TOPP2*-Expression war keine Blaufärbung des vaskulären Gewebes von Blättern oder Stengeln zu erkennen. In den Wurzeln junger Pflanzen zeigte sich die stärkste

Promotor vermittelte *gusA*-Aktivität aller untersuchten PP-Gene. Abweichend von der normalen zwölfstündigen Inkubationszeit konnte bei Keimlingen eine erste Blaufärbung im Wurzelbereich schon nach zehnmütiger Inkubationszeit in der Färbelösung beobachtet werden. Die Abbildung III.11. zeigt die Ergebnisse der *TOPP1*-Promotor gesteuerten Expression von *gusA* im Detail.

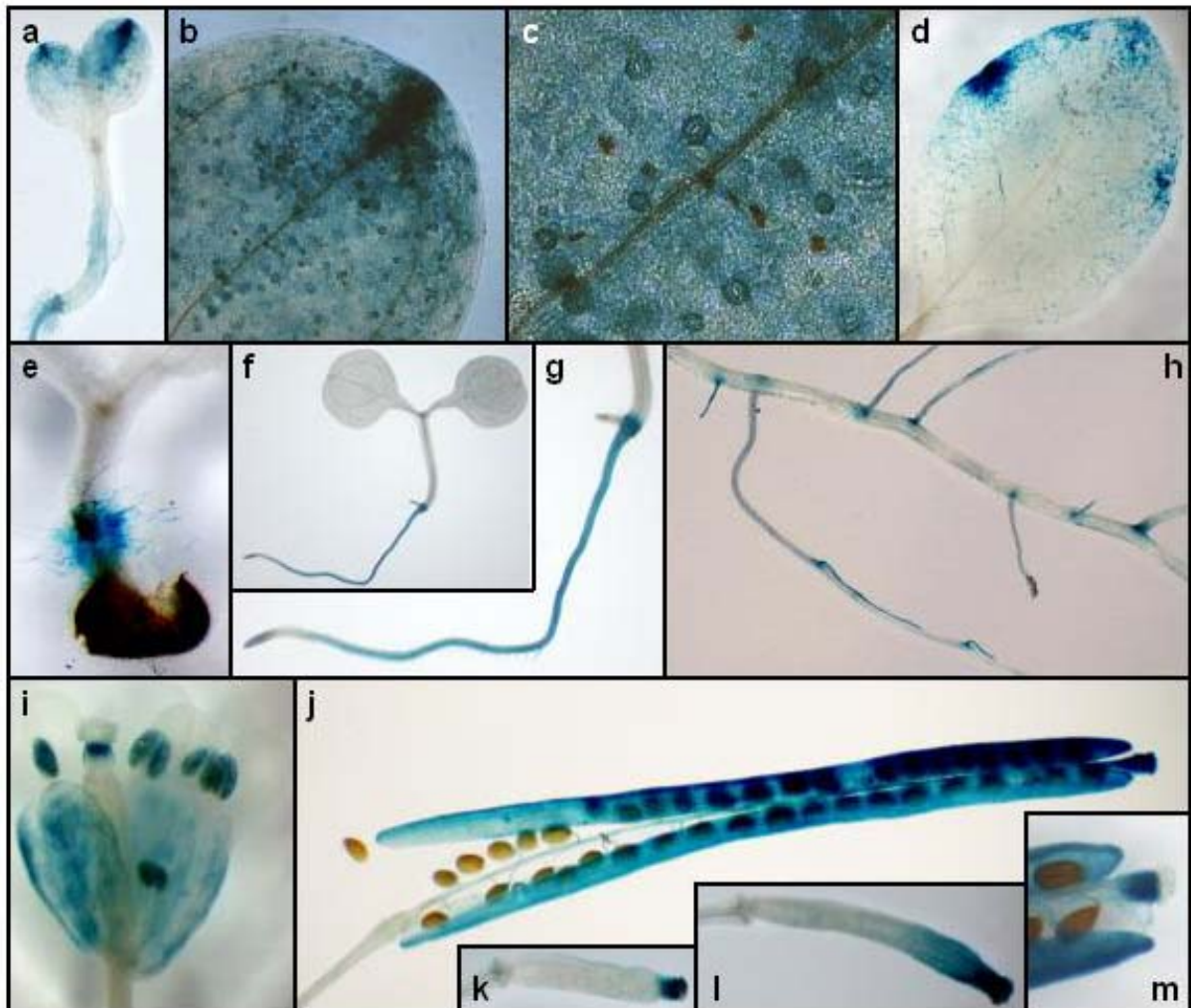


Abb. III.11. *TOPP1*-Promotor gesteuerte Expression von *gusA* in transgenen Pflanzen

Die *TOPP1*-Promotorfragment vermittelte GUS-Aktivität konnte sowohl in den Schließzellen von Keimblättern (a, b und c zeigen ein Keimblatt bei zunehmender Vergrößerung) als auch in anderen Blätter (d) detektiert werden. Außerdem waren Bereiche der Blattspitze (a) und des Blattrands (d) blau angefärbt. Schon kurze Zeit nach der Keimung (e) zeigte sich im Wurzelbereich GUS-Aktivität. Abweichend von der Standard-Inkubationszeit (12 h) konnte diese Färbung schon nach 10 Minuten detektiert werden. Auch in älteren Keimlingen beschränkte sich bei kurzer Inkubation (bis zu einer Stunde) die Blaufärbung auf den Wurzelbereich (f, g). Stengel wurden selbst bei langer Inkubation (24 h) in der X-Gluc Lösung nicht angefärbt und die Aktivität im Blatt (a, b und c) zeigte sich erst nach Inkubation der Gewebe für mehr als drei Stunden. In den Wurzeln älterer Pflanzen beschränkte sich die GUS-Aktivität auf Bereiche, an denen jüngere Seitenwurzeln von einer Hauptwurzel abzweigten (h). Auch die Blüten und Schoten der transgenen Pflanzen zeigten *TOPP1*-Promotor vermittelte *gusA*-Expression. In der Blüte war sie hauptsächlich auf die Antheren der Staubblätter und auf einen Bereich unterhalb der Narbe beschränkt (i). Die Schoten zeigten eine mit dem Alter zunehmende Färbung der Schotenhülle (j, k, l, m).

Bei der Analyse von Pflanzen mit *TOPP5*-Promotor vermittelter *gusA*-Expression zeigte sich ein von *TOPP1* und *TOPP2* unterschiedliches Expressionsmuster. So konnten in den Blättern und Stengeln von Pflanzen aller Altersstufen Blaufärbungen detektiert werden. In den Wurzeln der Pflanzen war dagegen zu keinem Zeitpunkt GUS-Aktivität zu erkennen. Die Abbildung III.12. zeigt die *TOPP5*-Promotor gesteuerte *gusA*-Expression im Detail.

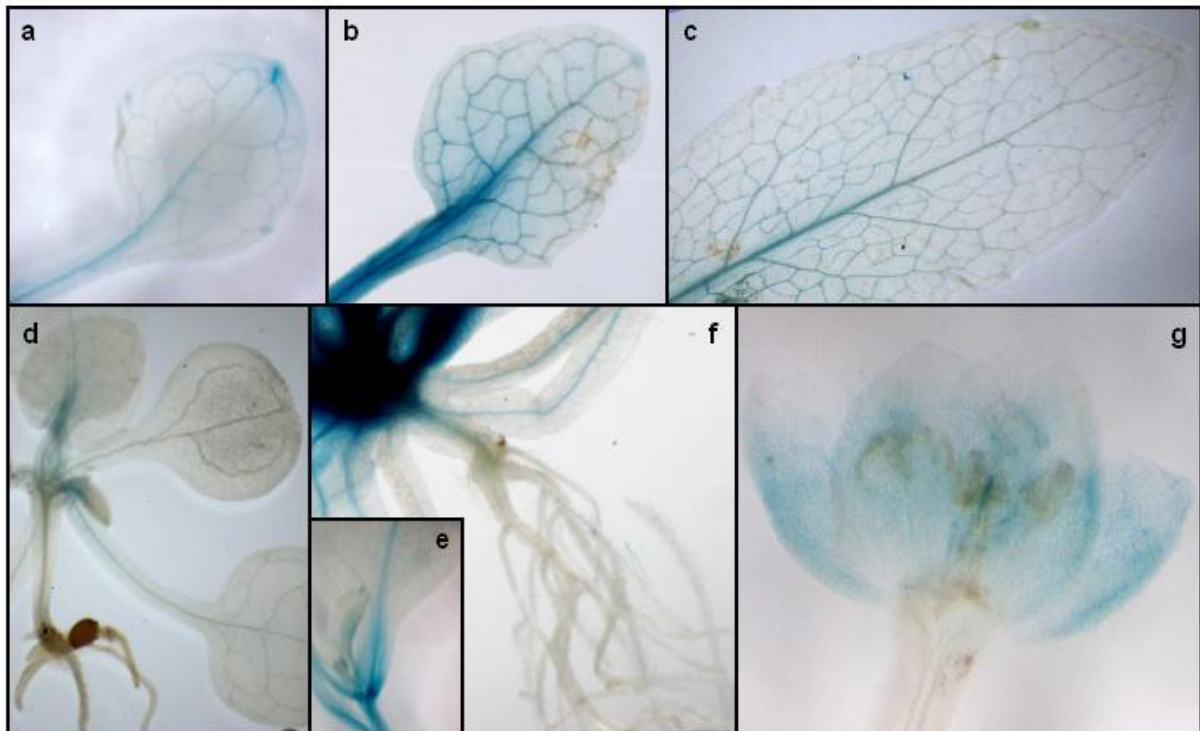


Abb. III.12. *TOPP5*-Promotor gesteuerte *gusA* Expression in transgenen Pflanzen

Die *TOPP5*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität in Blättern aller Altersstufen war hauptsächlich im vaskulären Gewebe des Blattstiels und den Blattadern der Blattbasis zu beobachten (a, b, c). Außerdem war bei Keimlingsblättern auch eine Blaufärbung in der Blattspitze detektierbar (a). Als besonders stark zeigte sich in älteren Pflanzen die GUS-Aktivität im zentralen Teil der Blattrosette (f). Von dort erstreckte sie sich bis in die Blätter (e). Im Bereich der Wurzeln war sowohl bei jungen (d) als auch bei älteren Pflanzen (f) keine Promotoraktivität vorhanden. In Blüten (g) konnte eine schwache Aktivität in den Blütenblättern beobachtet werden.

III.1.2.3.2. Analyse von *STH1*- und *STH2*-Promotor vermittelter *gusA*-Expression

Die Untersuchung der zellulären Expression der *STH*-Gene zeigte, dass diese nahezu identischen PP-Isoformen individuelle Expressionsmuster besitzen. Während die *STH1*-Promotor gesteuerte GUS-Aktivität in verschiedenen Bereichen junger und älterer Blätter detekrierbar war, konnte die *STH2*-Expression nur an den Enden einzelner Blattadern in älteren Blättern gefunden werden. Die Promotor-*gusA* Fusionen beider *STH*-Gene führten zu deutlichen Blaufärbungen im Bereich der Blüten und der Pollen. Im Gegensatz zum *STH1*-Promotor war die *STH2*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität auch in Stempeln und Samen detekrierbar. Die Tabelle III.2. zeigt eine Übersicht der Expressionsmuster beider Gene.

Tab. III.2. *STH1*- und *STH2*-Promotor vermittelte GUS-Aktivitäten

Gewebe	<i>STH1</i>	<i>STH2</i>
Ansatzpunkte neuer Blattknospen	-	+
Ende von Blattadern	-	+
jungen Seitenwurzeln	+	+
Narbe	-	+
Pollen	+	+
Samen	-	+

In den folgenden zwei Abbildungen (Abb.III.13 und Abb.III.14.) werden die gefundenen Expressionsmuster von *STH1* und *STH2* im Detail dargestellt. Die Abbildung III.13. zeigt die Ergebnisse für die *STH1*-Promotor gesteuerte Expression von *gusA*.

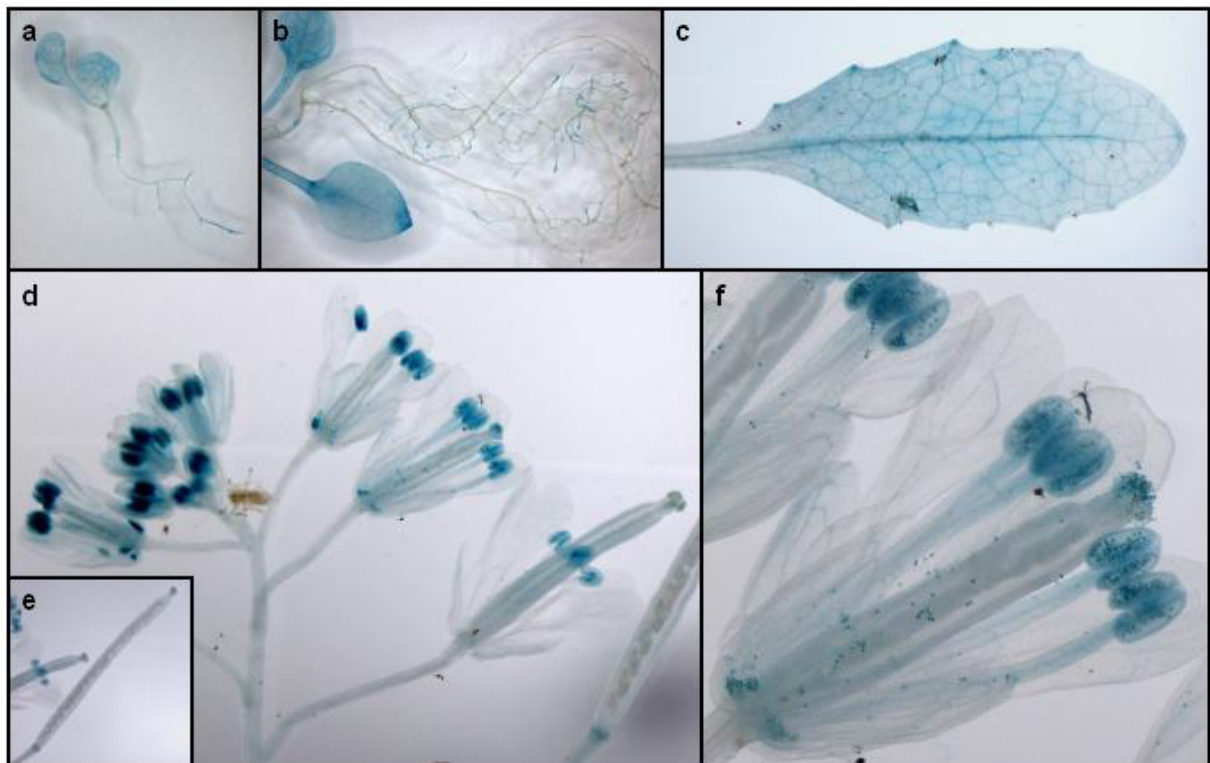


Abb. III.13. *STH1*-Promotor vermittelte Expression von *gusA* in transgenen Pflanzen

Die *STH1*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität konnte in Blättern von Keimlingen (a), jungen (b) und älteren Pflanzen (c) detektiert werden. In jüngeren Pflanzen waren zusätzlich blaugefärbte Bereiche an der Blattspitze (b) und in den jungen Seitenwurzeln zu erkennen. Die stärkste GUS-Aktivität der getesteten Linien wurde in den Pollen detektiert (d, f). Sie konnte schon in ganz jungen Blüten beobachtet werden und war bis zum Austreten der Pollen aus den Pollensäcken zu beobachten (f). Die blaugefärbten Pollen waren anschließend auf der Narbe und am Boden des Blütentrichters zu finden. In Schoten war zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung GUS-Aktivität vorhanden (d, e).

Die Abbildung III.14. zeigt die Ergebnisse der *STH2*-Promotor gesteuerten Expression von *gusA*.

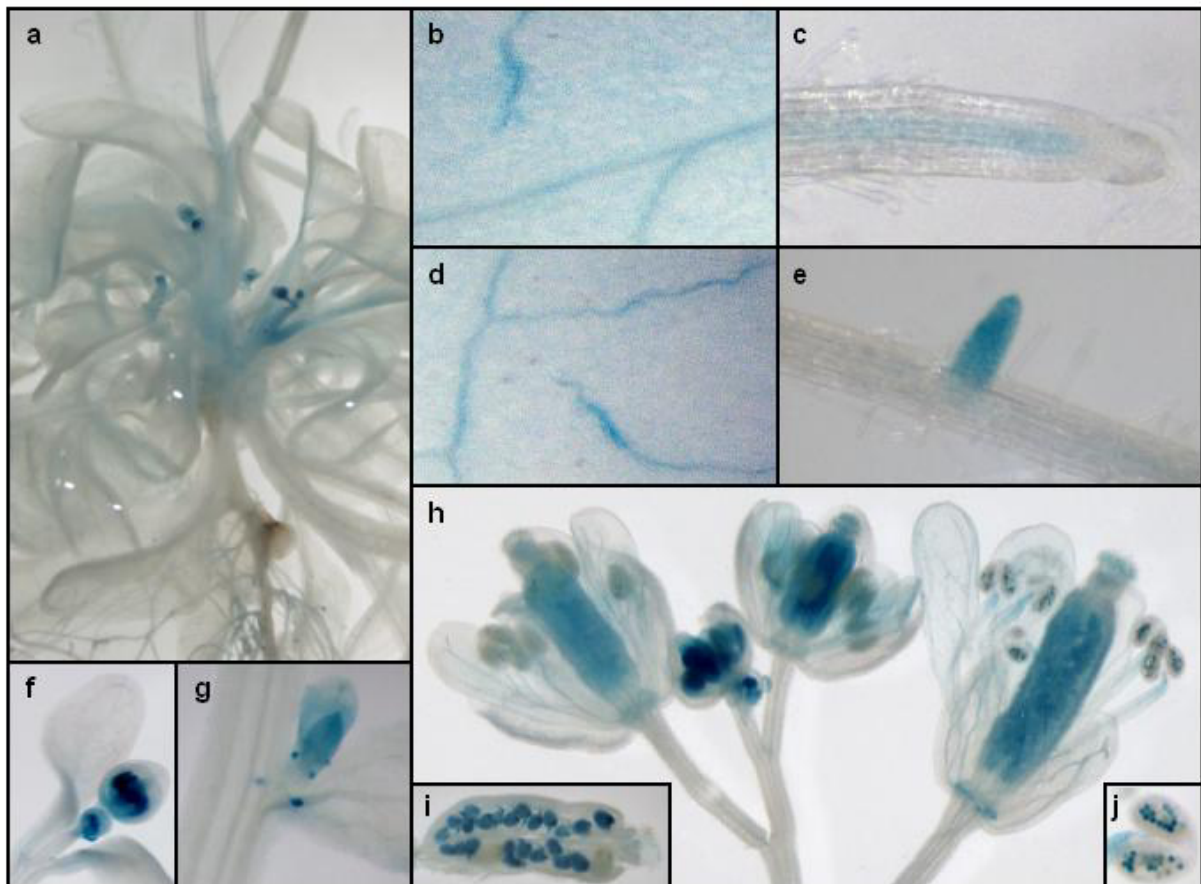


Abb. III.14. *STH2*-Promotor vermittelte Expression von *gusA* in transgenen Pflanzen

Die *STH2*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität war in älteren Blättern an den Enden einzelner Blattadern detektierbar (b, d). Starke Blaufärbung erkannte man an den Ansatzpunkten von Blattknospen (a, g) und in jungen Seitenwurzeln (e). Auch im Zentralzylinder an der Wurzelspitze von Keimlingen konnte Blaufärbung detektiert werden. Sie begann direkt nach der Differenzierungszone der jungen Wurzel (c). Man erkannte außerdem GUS-Aktivität in Blüten aller Altersstufen (h, j). Schon sehr junge Blüten (f, h) waren intensiv blau gefärbt. Mit zunehmendem Alter der Blüten konzentrierte sich die *gusA*-Expression in den Pollen und im Stempel (h, j). In Schoten waren die Samenkörner blau markiert (i).

III.1.3. Identifikation und Analyse von *STH1*-Insertionsmutanten

Parallel zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression der *STH*-Isoformen wurde in Datenbanken nach Insertionsmutanten für diese beiden Gene gesucht. Für *STH1* konnte im GABI-KAT Ressourcenzentrum eine T-DNA Insertionsmutante gefunden werden. Nach Erhalt der Samen wurden zwanzig F1-Pflanzen angezogen und von der Keimung bis zur Samenreife auf morphologische Unterschiede zum parallel kultivierten Wildtyp (Ökotyp Columbia) hin untersucht. Es zeigte sich schon zu einem frühen Entwicklungsstadium, dass drei Pflanzen (#17, #18 und #19) einen Phänotyp besaßen, der sich deutlich von den übrigen siebzehn F1-Pflanzen und dem Wildtyp unterschied (Abb.III.15.). So waren die Blätter der

Linien #17, #18 und #19 sehr stark gezahnt und in sich gedreht. Die drei Pflanzen entwickelten sich deutlich gedrungener und blühten ca. 5 bis 7 Tage früher als parallel kultivierte Wildtyppflanzen. Die siebzehn weiteren F1-Pflanzen unterschieden sich dagegen nicht vom Wildtyp. Die Abbildung III.15. zeigt die morphologischen Unterschiede zwischen #17, #18 und #19 und zwei parallel kultivierten Wildtyppflanzen.

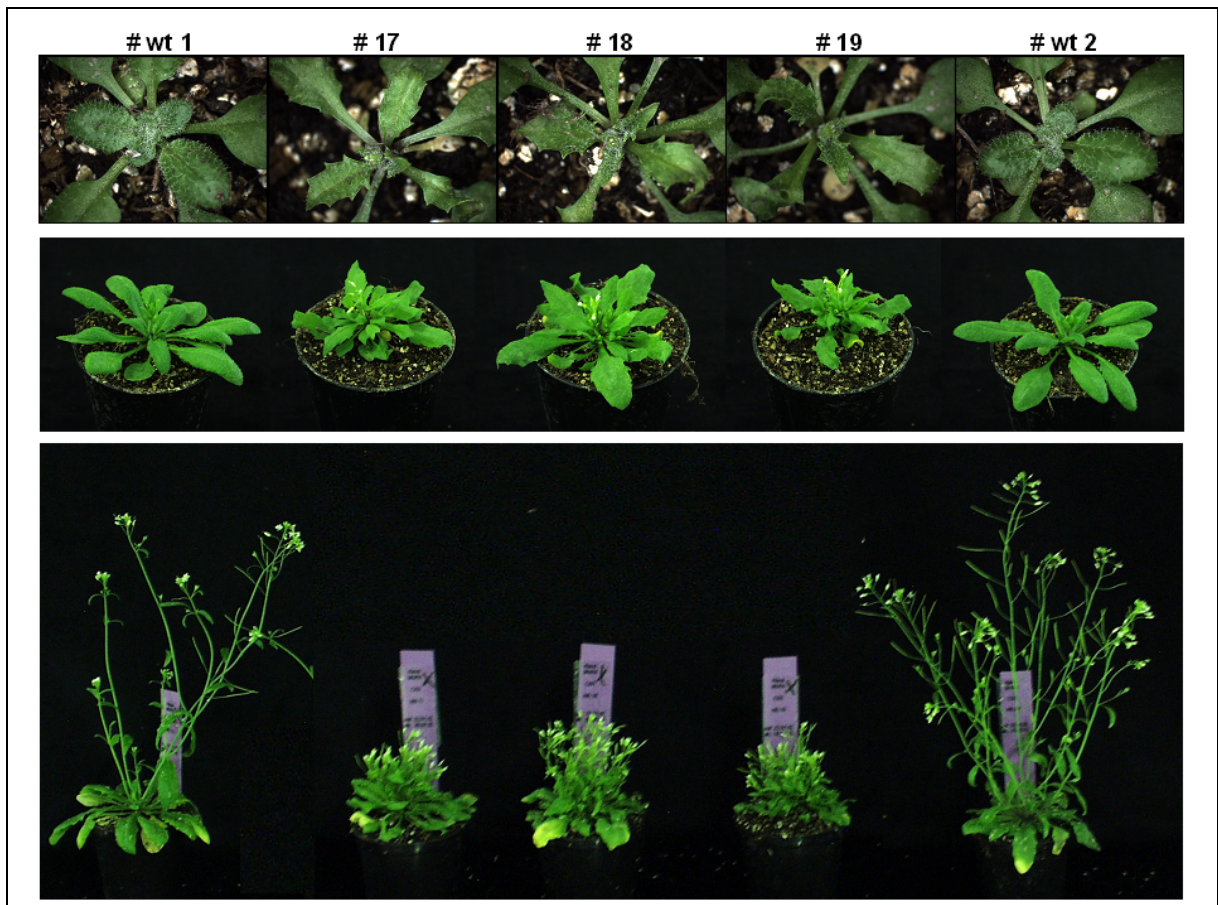


Abb. III.15. Phänotyp von drei F1-Pflanzen einer T-DNA Insertionsmutante von *STH1*

Bei der Kultivierung von zwanzig potenziellen T-DNA Insertionsmutanten von At1g50370 (*STH1*) konnten schon in der vegetativen Phase der Entwicklung drei Pflanzen (#17, #18, #19) identifiziert werden, die sich deutlich in ihrer Morphologie von den siebzehn anderen F1-Pflanzen und dem parallel kultivierten Wildtyp (wt; Ökotyp Columbia) unterschieden (oberer Teil der Abbildung). Die morphologischen Unterschiede zwischen diesen drei Pflanzen und allen anderen parallel kultivierten Pflanzen nahmen mit zunehmendem Alter noch zu (mittlerer und unterer Teil der Abbildung).

Die genomische DNA der zwanzig F1-Pflanzen der T-DNA Insertionsmutante von *STH1* wurde isoliert und mittels PCR-Analysen auf T-DNA Insertionen in den beiden *STH1*-Allelen untersucht. Folgende PCR-Produkte wurden erwartet:

- In Pflanzen mit T-DNA Insertionen in beiden *STH1*-Allelen war nur bei Einsatz der Primerkombination C03-for/T-DNA-rev ein PCR-Produkt zu erwarten (siehe Abb.III.16.). Für die Primerkombination C03-for/C03-rev war kein PCR-Produkt zu erwarten, da die

einminütige Elongationszeit während der PCR für eine Amplifikation der gesamten T-DNA Kasette zu kurz war.

- In Pflanzen mit T-DNA Insertion in einem der beiden *STH1*-Allele konnten sowohl mit C03-for/T-DNA-rev als auch mit C03-for/C03-rev PCR-Produkte gebildet werden.
- In Pflanzen ohne T-DNA Insertionen in den beiden *STH1*-Allelen sollten nur mit den Primern C03-for/C03-rev ein PCR-Produkt gebildet werden.
- In einer Kontroll-PCR wurden die Primer 1-4prom-for und 1-4prom-rev, die zur Amplifikation des *STH1*-Promotorfragmentes genutzt worden waren, eingesetzt. In drei Fällen (#2, #4, #14) konnte kein PCR-Produkt detektiert werden. Die DNA dieser Pflanzen wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Die PCR-Analyse mit den Primern C03-for, C03-rev und T-DNA-rev zeigte, dass nur die drei Linien #17, #18 und #19 in Bezug auf die T-DNA Insertion im *STH1*-Gen homozygot waren. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen für alle untersuchten Pflanzen und die Orientierung der eingesetzten Primer sind in Abbildung III.16. zusammengefasst.

Pflanze (#)	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16	17	18	19	20	wt1	wt2
C03-for / C03-rev	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
C03-for / T-DNA-rev	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
1-4prom-for / 1-4prom-rev	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abb. III.16. PCR-Analyse zur Identifikation von T-DNA Insertionen in *STH1*-Allelen

Der untere Teil der Abbildung zeigt schematisch die Lage der Primer, die zur PCR-Analyse der zwanzig F1-Pflanzen der T-DNA Insertionsmutante von *STH1* eingesetzt wurden. Als Kontrolle wurde ein *STH1*-Promotorfragment mit den Primern 1-4prom-for/1-4prom-rev amplifiziert. Zur weiteren Analyse mit den Primern C03-for, C03-rev und T-DNA-rev wurden alle DNA-Präparationen eingesetzt, in denen mit 1-4prom-for / 1-4prom-rev das erwartete PCR-Produkt gebildet wurde. Die Tabelle im oberen Teil der Abbildung fasst alle PCR-Ergebnisse zusammen. Es zeigte sich, dass die DNA von fünf Pflanzen (#1, #6, #11, #16 und #20) die gleichen PCR-Ergebnisse wie Wildtyp-DNA (wt1 und wt2) lieferte. Neun Pflanzen waren bezüglich der T-DNA Insertionen in die beiden *STH1*-Allele heterozygot (#3, #5, #7, #8, #9, #10, #12, #13, #15) und nur die drei Pflanzen #17, #18 und #19 besaßen T-DNA Insertionen in beiden Allelen des *STH1*-Gens.

III.2. Identifikation und Charakterisierung von Membranproteinen der NIC-Familie

In Kapitel III.2. wird die Identifikation und Charakterisierung von NIC1, dem Prototypen einer neuen Familie von Membranproteinen in *A. thaliana*, beschrieben. Die Eigenschaften von NIC1 werden mit NIC2 und NIC4, zwei weiteren Proteinen dieser Familie, verglichen.

III.2.1. Identifikation von *NIC1*

Dieser Teil der Arbeit hatte seinen Ursprung im Screening nach PP-Genen, die in EF exprimiert werden (siehe III.1.2). Bei der Suche nach optimalen Primerkombinationen für diesen Ansatz kam es anfangs zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte. Ein solches DNA-Fragment führte zur Identifikation von *NIC1*, dem zu diesem Zeitpunkt ersten Mitglied einer großen Gruppe von mindestens 56 homologen Genen, welche für Membranproteine in *A. thaliana* kodieren. Die einzelnen Schritte auf dem Weg zur Klonierung von *NIC1* werden im Folgenden beschrieben.

III.2.1.1. Klonierung eines EF-spezifischen PCR-Produkts

Bei der Optimierung des Screeningansatzes zur Identifikation von PP-Genen, die in EF exprimiert werden (III.1.2.), wurden verschiedene Primerkombinationen in den PCR-Reaktionen getestet. In einem ersten Ansatz wurden die Primer RACE-N, RACE-A und RACE-B, welche als Standardprimer für ähnliche Anwendungen im Labor vorhanden waren, in Kombination mit den PP-spezifischen degenerierten Primern RACE-PPI und RACE-PPII eingesetzt (Strategie in Abb. III.7. skizziert). Der Primer RACE-N, der zur reversen Transkription genutzt wurde, enthielt einen Bereich von 18 dT-Nukleotiden und eine GC-reiche Adaptersequenz. Auf diese Adaptersequenz waren die Primer RACE-A und RACE-B abgelegt. Sie dienten in den folgenden zwei PCR-Reaktionen als Gegenprimer zu RACE-PPI und RACE-PPII. Nach der ersten PCR mit der Primerkombination RACE-PPI / RACE-A wurden in der anschließenden „nested PCR“ die Primer RACE-PPII / RACE-B verwendet. In Kontrollen zeigte sich, dass PCR-Reaktionen mit RACE-A oder RACE-B alleine die gleichen PCR-Produkte lieferten, die auch in den Ansätzen mit den Primern RACE-PPI / RACE-A in der ersten PCR und RACE-PPII / RACE-B in der zweiten PCR zu beobachten waren. Die Ursache hierfür lag vermutlich in der GC-reichen Adaptersequenz von RACE-N und dem daraus resultierenden hohen GC-Gehalt von RACE-A und RACE-B. Bei den niedrigen Annealingtemperaturen in den PCR-Reaktionen (48°C; notwendig bei Einsatz der PP-spezifischen degenerierten Primer RACE-PPI und RACE-PPII) führte der hohe GC-Gehalt der beiden Primer zu Bindungen von RACE-A oder RACE-B an unspezifische Sequenzen innerhalb von cDNAs und zu „PCR-Artefakten“.

Interessanterweise zeigte sich in Parallelansätzen mit cDNA, die entweder aus Gesamtblatt-mRNA oder aus EF-mRNA gewonnen worden war, ein unterschiedliches Bandenmuster. Wie in Abb. III.17. zu erkennen, enthielt der Screeningansatz, in dem EF-cDNA eingesetzt wurde, ein ca. 1200 bp großes PCR-Produkt, das im Ansatz mit Gesamtblatt-cDNA fehlte. Obwohl wahrscheinlich war, dass die erhaltenen PCR-Produkte keine amplifizierten PP-cDNAs waren, sollte getestet werden, um was es sich beim EF-spezifischen „PCR-Artefakt“ handelte. Aus diesem Grund wurde das DNA-Fragment aus dem Agarose-Gel eluiert, in den Vektor pCR2.1. kloniert und anschließend sequenziert. Es wurde im Folgenden Fragment 9-4 genannt.

III.2.1.2. *In silico* Analyse von Fragment 9-4

In Datenbankrecherchen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Fragment 9-4 zeigte sich, dass es sich bei der klonierten Nukleinsäure vermutlich um eine partielle cDNA handelte, die für ein Polypeptid mit sechs bis sieben Transmembranbereichen kodierte und Homologie zu Sequenzen aus einer Vielzahl von Organismen aufwies. Die Tabelle in Abbildung III.17. listet die Sequenzen mit der größten Identität auf.

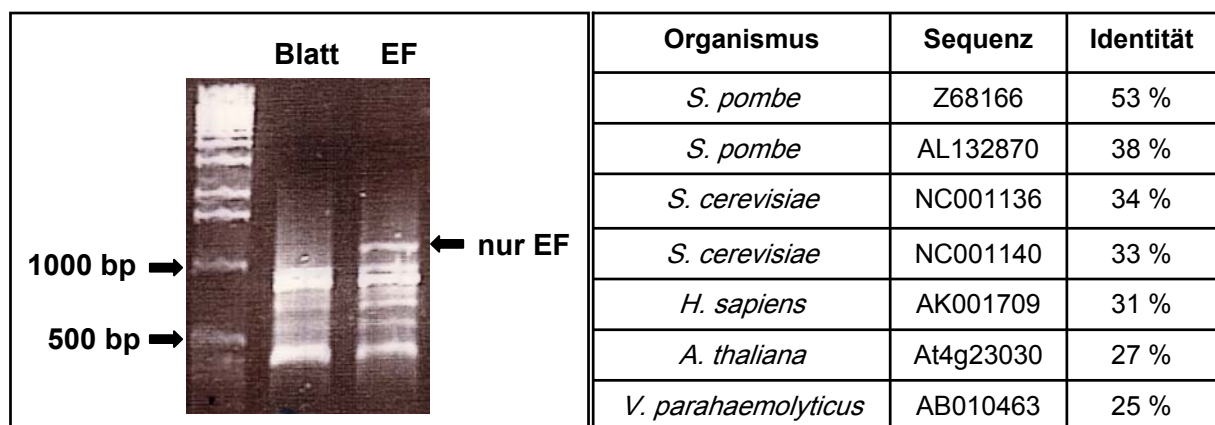


Abb. III.17. Identifikation eines EF-spezifischen Transkripts

Eine erste Suche nach EF-exprimierten PP-cDNAs mit den Primern RACE-PPI / RACE-A (erste PCR-Runde) und RACE-PPII / RACE-B (zweite, „nested“ PCR) führte zu den im Agarosegel aufgetrennten Produkten (linker Teil der Abbildung). Da in Kontrollexperimenten mit nur einem Primer (RACE-A in der ersten PCR-Runde und RACE-B in der „nested“ PCR) identische Endprodukte erhalten wurden, war davon auszugehen, dass es sich um „PCR-Artefakte“ handelte. Im Ansatz mit EF-cDNA zeigte sich aber auch, dass eine Bande bei circa 1200 bp auftrat, die der Ansatz mit Gesamtblatt-cDNA nicht enthielt. Nach Klonierung und Sequenzierung dieses DNA-Fragments (Fragment 9-4) konnten für die abgeleitete Aminosäuresequenz homologe Sequenzen aus *S. pombe*, *S. cerevisiae*, Mensch, *Vibrio parahaemolyticus* und *A. thaliana* gefunden werden (Tabelle im rechten Teil der Abbildung).

Die am nächsten verwandten Sequenzen zu Fragment 9-4 kamen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae*. Es wurden aber auch homologe Sequenzen aus Organismen wie dem Menschen, *A. thaliana* und dem marinen Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* gefunden.

Auch nach der Beendigung des *A. thaliana* Sequenzierprojektes (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) konnte keine Sequenz mit kompletter Übereinstimmung zu Fragment 9-4 gefunden werden. Es war außerdem nicht möglich, in RNA-Blot Experimenten mit Fragment 9-4 als Sonde ein spezifisches Transkript in Gesamtblatt- oder EF-RNA zu detektieren. Ergänzend zu der Beobachtung, dass die Sequenzen mit der größten Identität zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von Fragment 9-4 aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* stammten, legten diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass durch die zahlreichen PCR-Zyklen des Screeningansatzes (siehe III.1.2) das Transkript eines Organismus amplifiziert wurde, der auf den Blättern, die zur EF-Präparation genutzt wurden, lokalisiert war. Obwohl Fragment 9-4 vermutlich nicht aus *A. thaliana* stammte, führte es doch zur großen uncharakterisierten Gruppe von mindestens 56 homologen Sequenzen aus dieser Pflanze. Von allen homologen Sequenzen aus anderen Organismen waren zu diesem Zeitpunkt nur NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* und ERC1 aus *S. cerevisiae* beschrieben. NorM wurde als Transportprotein, welches im Antiport zu Natrium toxische Substanzen aus der Zelle schleust, charakterisiert (Morita *et al.*, 1998 und 2000). Auch die Funktion von ERC1 aus *S. cerevisiae* steht im Zusammenhang mit Detoxifizierung. Das Protein scheint über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Resistenz gegenüber dem Toxin Ethionin zu erhöhen (Diener *et al.*, 2001).

Weitere Datenbankrecherchen (Pfam; **P**rotein **f**amilies Datenbank unter www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam) zeigten, dass sowohl die abgeleitete Aminosäuresequenz von Fragment 9-4 als auch die Proteine NorM, ERC1 und die 56 vorhergesagten Proteine aus *A. thaliana* zur großen Familie der MATE-Proteine (**M**ultidrug **A**nd **T**oxic **E**xtrusion) gehören. Diese Familie umfasst bisher (Oktober 2004) mindestens 521 homologe Sequenzen, von denen nur wenige funktionell charakterisiert sind. Die MATE-Proteine scheinen dabei über alle Reiche des Lebens verbreitet zu sein: sowohl bei den Archaea (36 Sequenzen), den Bakterien (345 Sequenzen) als auch bei den Eukaryota (140 Sequenzen) sind sie zu finden. Erstaunlich ist, dass es bisher keinen Organismus gibt, für den eine so große Anzahl von MATE-Proteinen vorhergesagt wird, wie für *A. thaliana* (mindestens 56). Eine hohe Anzahl von Isoformen kommt auch in *Oryza sativa* vor (mindestens 34 Proteine).

III.2.1.3. Homologie von NIC1 zu Proteinen aus *A. thaliana* und anderen Organismen

Die in Kapitel III.2.1.2. zusammengefassten Daten und der Umstand, dass für keines der zu Fragment 9-4 homologen Gene aus Höheren Organismen eine Funktion bekannt war, führten zu dem Entschluss, die cDNA von At4g23030, welches von den 56 Sequenzen aus *A. thaliana* die größte Sequenzidentität zu Fragment 9-4 besaß, zu klonieren und zu charakterisieren. Bei heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten (III.2.2.) und *S. cerevisiae* (III.2.3.) zeigte sich, dass At4g23030 neue, bisher unbeschriebene Transport-

eigenschaften besitzt. Aus diesem Grund wurde es NIC1 (**N**ovel **I**on **C**arrier **1**) genannt. Die Untersuchung von NIC1 begann mit einer *in silico* Analyse zu homologen MATE-Proteinen und zur Proteinstruktur. Die Abbildung III.18. zeigt die Verwandtschaft von NIC1 zu den Proteinen DTX1, TT12, EDS5, ALF5 und FRD3 (MATE-Proteine aus *A. thaliana*, die in den letzten Jahren beschrieben wurden) und zu MATE-Sequenzen aus Bakterien, Hefen, Pilzen, Wirbeltieren und weiteren Pflanzen.

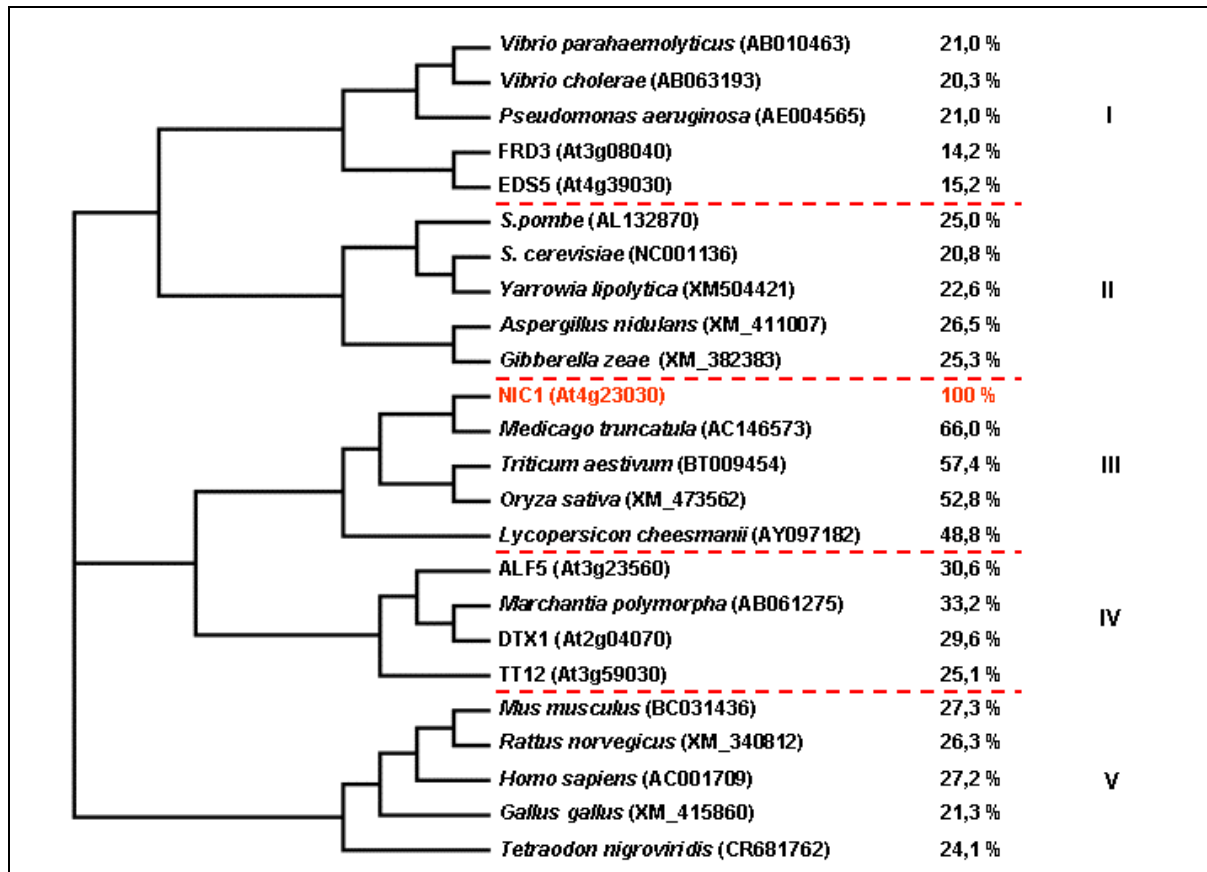


Abb. III.18. Verwandtschaft von NIC1 zu MATE-Proteinen aus *A. thaliana* und anderen Organismen

Die Sequenzen von sechs MATE-Proteinen aus *A. thaliana* (NIC1, TT12, ALF5, DTX1, EDS5 und FRD3) wurden mit Polypeptidsequenzen aus anderen Organismen verglichen. In der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) wurden alle DNA-Sequenzen, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologie zu NIC1 zeigten, identifiziert. Außer für *A. thaliana* wurde pro Organismus jeweils die Sequenz mit der größten Identität zu NIC1 ausgewählt. Mit Ausnahme der Proteine FRD3 und EDS5 wurden nur Sequenzen berücksichtigt, die mindestens zwanzig Prozent Identität mit NIC1 aufwiesen. Die Sequenzen wurden mittels ClustalW (www.ch.embnet.org/software) verglichen und bildeten nach ihrer Anordnung in einem phylogenetischen Baum fünf Gruppen (I bis V). Die zu NIC1 am nächsten verwandten Sequenzen stammten aus *Medicago truncatula*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* und *Lycopersicon cheesmanii* (Gruppe III). Eine weitere Gruppe mit ausschließlich pflanzlichen Sequenzen bestand aus den Proteinen ALF5, DTX1, TT12 und einem Polypeptid aus *Marchantia polymorpha* (Gruppe IV). Zwei weitere Gruppen enthielten nur MATE-Sequenzen von Wirbeltieren (Gruppe V) oder aus Hefen und Pilzen (Gruppe II). Die letzte Untergruppe war heterogener und enthielt neben FRD3 und EDS5 die Sequenzen der Bakterien (Gruppe I). Hinter den Sequenznamen ist jeweils die Identität zu NIC1 angegeben.

Im nächsten Ansatz wurde die Verwandtschaft von NIC1 zu 55 weiteren MATE-Sequenzen aus *A. thaliana* untersucht (Abbildung III.19.). Für keines dieser Proteine war zum Zeitpunkt der Identifikation von Fragment 9-4 eine Funktion beschrieben.

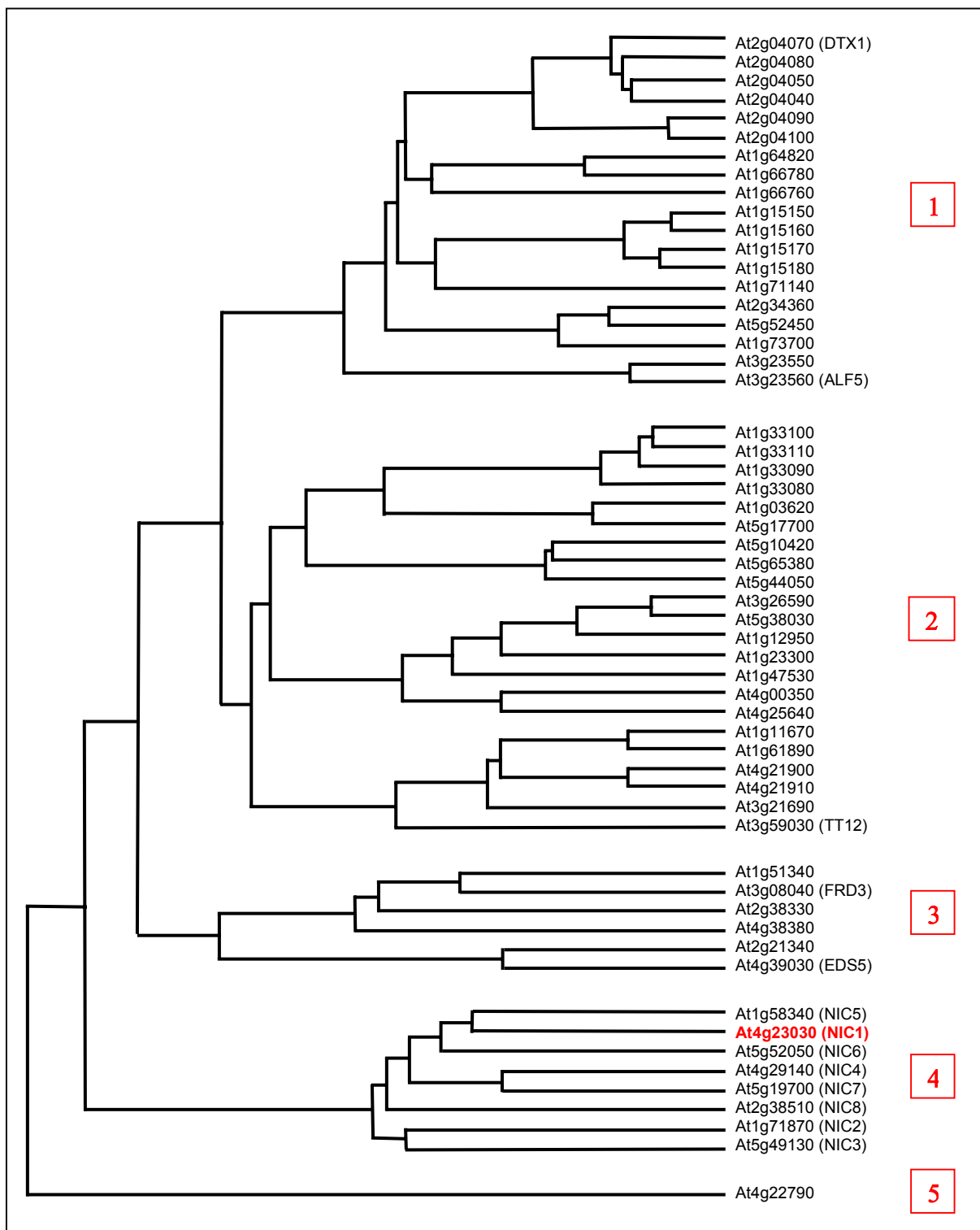
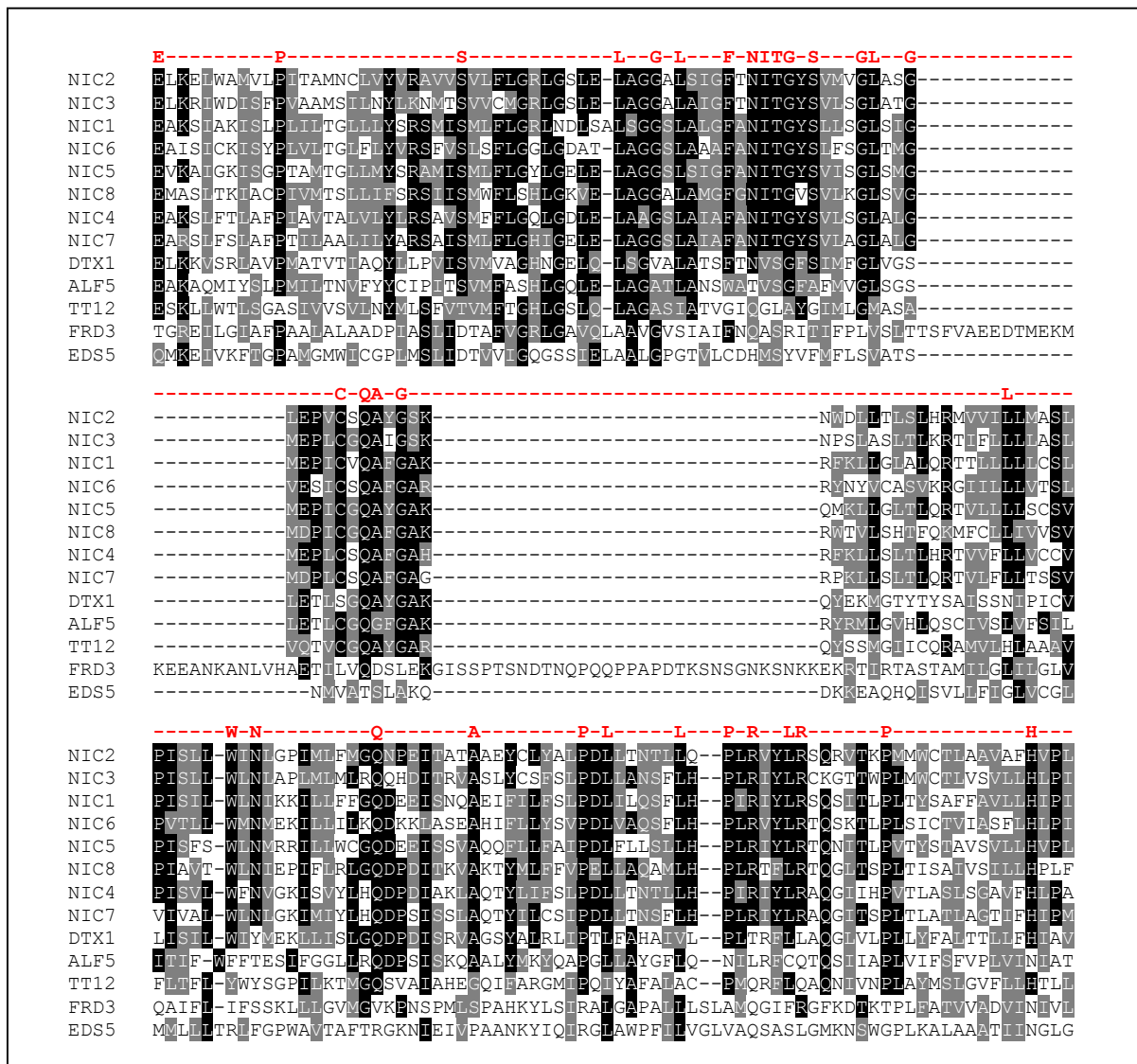


Abb. III.19. Homologie von NIC1 zu 55 weiteren MATE-Sequenzen aus *A. thaliana*

Der Gruppierung von 56 MATE-Sequenzen aus *A. thaliana* in einem phylogenetischen Baum (nach ClustalW-Analyse) zeigte, dass sie sich in fünf Untergruppen (rote Zahlen) unterteilen lassen. Keines der in den letzten Jahren beschriebenen Proteine (TT12, ALF5, DTX1, FRD3 oder EDS5) stammt aus der Untergruppe 4, zu der NIC1 gehört. Die weiteren Proteine aus dieser Gruppe wurden NIC2 bis NIC8 genannt.

Während der Charakterisierung von NIC1 wurden für die fünf MATE-Proteine TT12 (Debeaujon *et al.*, 2001), ALF5 (Diener *et al.*, 2001), DTX1 (Li *et al.*; 2002), EDS5 (Nawrath *et al.*, 2002) und FRD3 (Rogers *et al.*, 2002) aus *A. thaliana* erste Funktionen publiziert. Das Polypeptid TT12 ist an der Flavonoid-Einlagerung in die Vakuolen in Zellen der Samenhülle beteiligt, ALF5 beeinflusst die laterale Wurzelbildung, DTX1 kann Norfloxacin detoxifizieren, EDS5 spielt eine Rolle in der Salicylsäure-abhängigen Signaltransduktion bei Pathogenbefall der Pflanze und FRD3 beeinflusst die Eisenaufnahme in die Pflanze, ist aber nicht direkt am Transport dieser Ionen beteiligt. Wie in Abbildung III.19. zu erkennen ist, gehört keines dieser fünf Proteine zur Untergruppe der acht NIC-Isoformen. Im Sequenzvergleich lassen sich zahlreiche Bereiche der NIC-Polypeptide erkennen, die für diese Untergruppe charakteristisch sind und eine eindeutige Abgrenzung von anderen MATE-Proteinen ermöglichen. Die Abbildung III.20. zeigt einen Vergleich der Sequenzen von TT12, ALF5, DTX1, EDS5, FRD3 und NIC1 bis NIC8.



(Fortsetzung und Beschreibung von Abbildung III.20. auf der folgenden Seite)

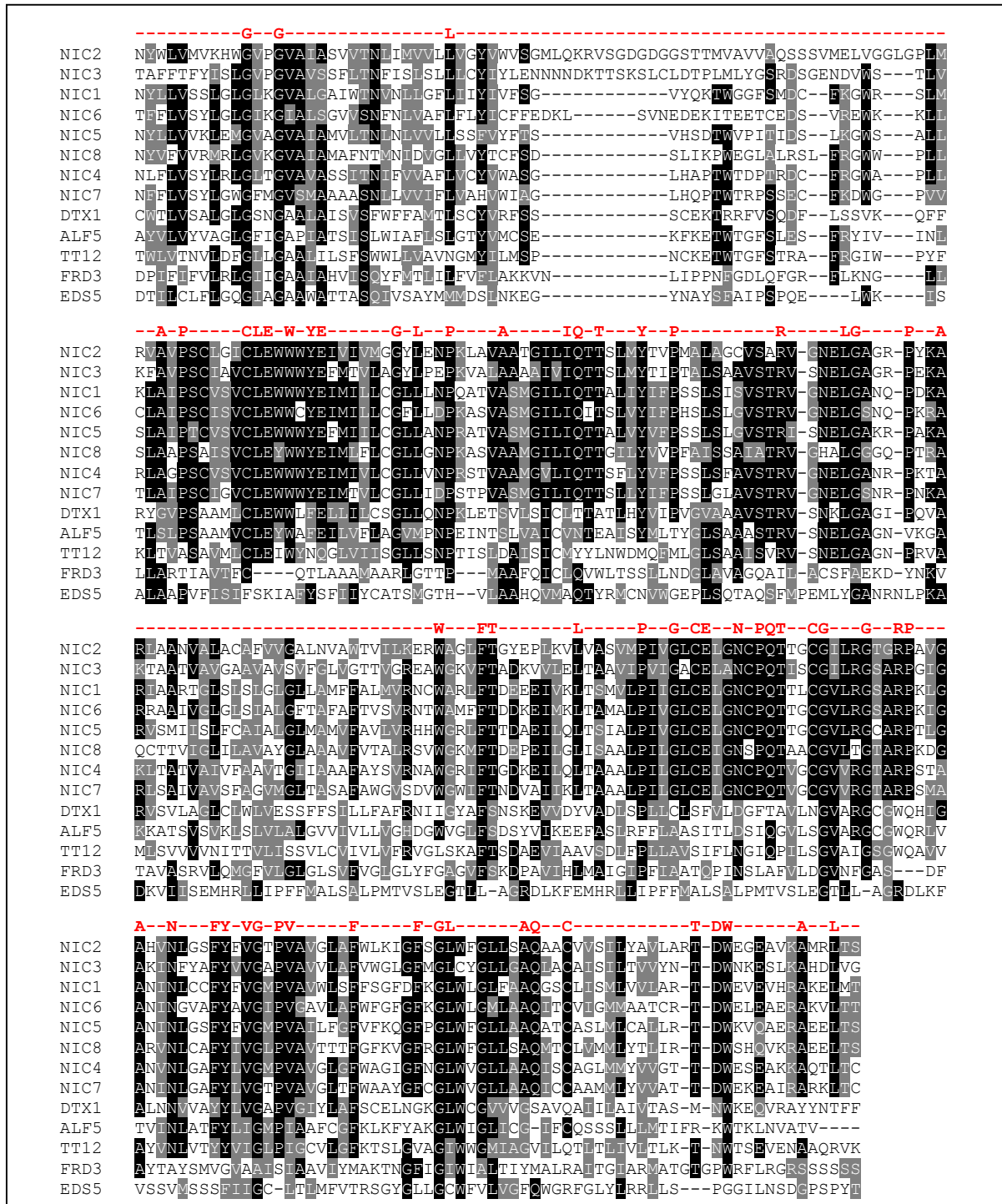


Abb. III.20. Sequenzvergleich der acht NIC-Proteine mit TT12, ALF5, DTX1, EDS5 und FRD3

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von NIC1 bis NIC8, TT12, ALF5, DTX1, EDS5 und FRD3 mittels der Programme ClustalW und Boxshade (www.ch.embnet.org/software) zeigte, dass einige hoch konservierte Aminosäuren in allen Sequenzen vorkommen. Der dargestellte Sequenzvergleich erstreckt sich von Aminosäure E32 bis T475 (Nummerierung leitet sich von NIC1 ab). Die Proteine FRD3 und EDS5 besaßen die geringste Übereinstimmung mit den acht NIC-Sequenzen. Man erkennt z.B. im N-Terminale Bereich von FRD3 zwei Polypeptidabschnitte von 24 bzw. 32 Aminosäuren, die in keiner anderen untersuchten Sequenzen auftraten. Vergleicht man alle in den NIC-Proteinen konservierten Aminosäuren (als rote Konsensussequenz dargestellt) mit TT12, ALF5, DTX1, EDS5 und FRD3, so lassen sich zahlreiche NIC-spezifische Positionen und Motive identifizieren.

Die Homologie der acht NIC-Proteine konnte auch beim Vergleich der Hydrophilizitätsprofile gezeigt werden. Wie in Abbildung III.21. zu erkennen ist, lässt sich bei einer Ausrichtung der einzelnen Profile anhand des konservierten Motivs R(I/V)(G/S)(N/H)(A/E)LG (Bereich 320 bis 326 bei NIC1) eine sehr ähnliche Abfolge hydrophiler und hydrophober Bereiche innerhalb der Proteinsequenzen erkennen.

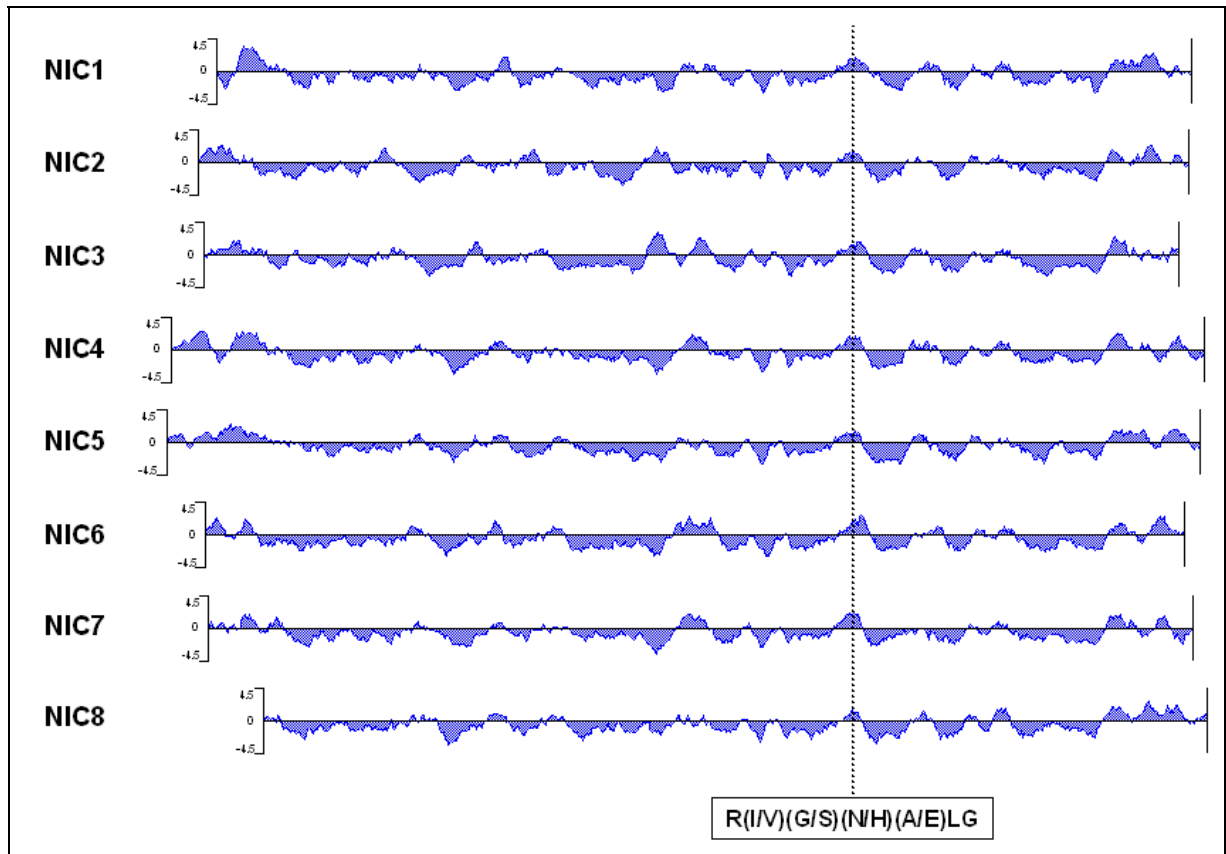


Abb. III.21. Vergleich der Hydrophilizitätsprofile der acht NIC-Proteine

Von den Polypeptidsequenzen der acht NIC-Proteine wurden mit Hilfe des Programms DNA-Star Hydrophilizitätsprofile nach Kyte-Doolittle (1982) erstellt. Proteinbereiche mit einem großen Anteil hydrophober Aminosäuren haben bei dieser Darstellung negative Werte und liegen unterhalb der waagerechten Nulllinie. Sie kennzeichnen die Bereiche, in denen voraussichtlich die Transmembranbereiche lokalisiert sind. Die Proteinbereiche mit einem hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren liegen oberhalb der Nulllinie. Um einen solchen Abschnitt des Polypeptids handelt es sich auch beim konservierten Motiv R(I/V)(G/S)(N/H)(A/E)LG, welches zur Ausrichtung der einzelnen Profile genutzt wurde. Die Länge der Proteine lag im Bereich von 487 (NIC8) bis 533 Aminosäuren (NIC4 und NIC5).

Bei der *in silico* Analyse der MATE-Proteine von *A. thaliana* mit dem Programm TMHMM (www.cbs.dtu.dk) zeigte sich, dass alle Mitglieder dieser Membranproteinfamilie aus *A. thaliana* voraussichtlich elf oder zwölf Transmembranbereiche besitzen. Für NIC1 wurden zwölf dieser hydrophoben Peptidbereiche und eine Lokalisation der N- und C-Termini auf der gleichen Seite der Membran vorhergesagt. Mit den *in silico* Daten wurde ein Strukturmodell zur Orientierung von NIC1 in der Membran erstellt (Abb. III.22.).

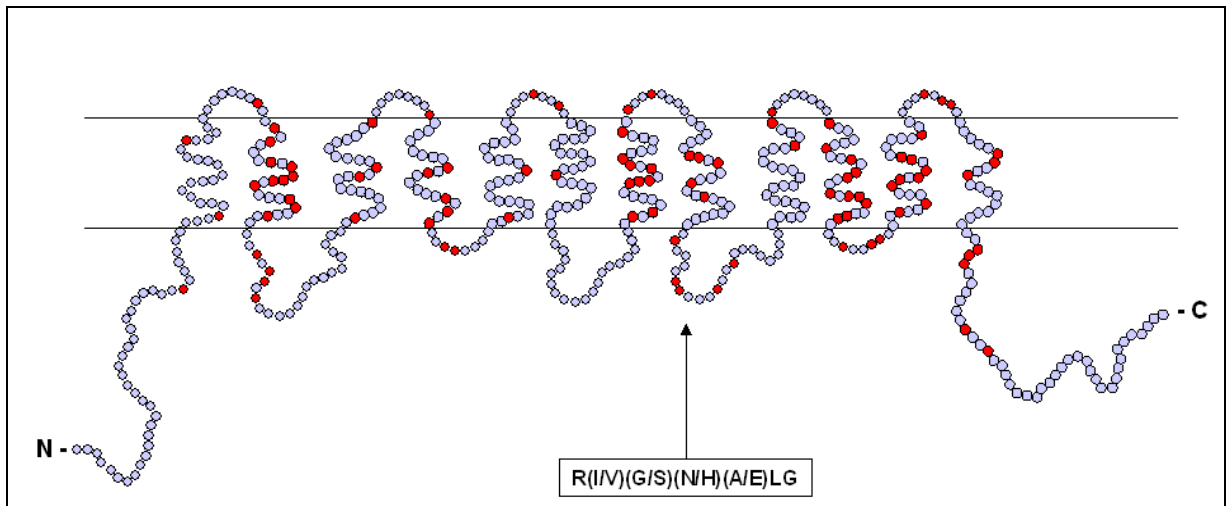


Abb. III.22. Modell zur Orientierung von NIC1 in der Membran

Nach Vorhersage des Programms TMHMM (www.cbs.dtu.dk) besitzt NIC1 zwölf Transmembranspannen und sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins sind auf der gleichen Seite der Membran lokalisiert. Rot markiert sind die Aminosäuren, die bei den acht NIC-Proteinen identisch sind. Wie schon im Sequenzvergleich (Abbildung III.20.) zu erkennen, sind sie relativ gleichmäßig über das ganze Protein verteilt und fehlen nur an den Enden des Polypeptids. Die Sequenzbereiche, welche vermutlich außerhalb der Lipiddoppelschicht liegen, sind auf den beiden Seiten der Membran unterschiedlich strukturiert. Nur auf der Seite der C- und N-Termini finden sich zwischen den Transmembranspannen drei Bereiche, die länger als zehn Aminosäuren sind. Sie haben jeweils eine Länge von 20 bis 25 Aminosäuren. Der dritte dieser Bereiche (vom N-Terminus des Proteins aus gesehen) enthält das MATE-Motiv R(I/V)(G/S)(N/H)(A/E)LG (in NIC1 RVGNELG von Position 320 bis 326).

Eine weitere Analyse der Aminosäuresequenz von NIC1 mit dem Programm PROSITE (<http://us.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>) zeigte, dass das Protein viele Leucin-reiche Regionen (LRR) enthält. Im Bereich der Aminosäuren 41 bis 230 ist, statistisch gesehen, etwa jede vierte Aminosäure ein Leucin (49 von 190 Aminosäuren).

II.2.1.4. Klonierung von *NIC1*

In einem PCR-Ansatz mit den Primern 018-for und 018-rev war es möglich, aus einer cDNA-Kollektion, die aus Wurzel-mRNA hergestellt worden war, die cDNA von *NIC1* zu isolieren. Die Sequenzierung der klonierten Nukleinsäure bestätigte die Vorhersage eines 1506 bp langen Exons und keiner Introns (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Auch in späteren RNA-Blot Analysen (III.2.4.) fand sich das erwartete Transkript dieser Größe.

In den letzten Jahren installierte, öffentlich zugängliche Datenbanken (z.B. Genevestigator, www.genevestigator.ethz.ch) ermöglichten es, *NIC1-Expressionsdaten* aus zahlreichen Genchip-Experimenten zu analysieren. Es zeigte sich, dass *NIC1*-Transkripte nicht nur in den Wurzeln, sondern auch in vielen anderen Geweben von *A. thaliana* detektiert werden konnten. Von allen getesteten Geweben war dabei der höchste Transkriptgehalt im Embryo vorhanden. Außerdem war *NIC1*-Expression während fast aller Wachstumsphasen der Pflanzen detektierbar.

Zur Expression wurde die klonierte *NIC1*-cDNA in die Vektoren pGEMHE, pYES2 und pDR196 umkloniert und in *Xenopus laevis* Oozyten (III.2.2.) und Hefen (III.2.3.) heterolog exprimiert. Die Subklonierung der cDNA in die Vektoren pCAMBIA1302 und pCAMBIA1303 diente zur Modulation und Lokalisation der *NIC1*-Genexpression *in planta* (III.2.4.).

III.2.2. Heterologe Expression von NIC1 in *Xenopus laevis* Oozyten

Zur funktionellen Charakterisierung von NIC1 wurde das Protein in einem ersten Ansatz in *X. laevis* Oozyten heterolog exprimiert. In Voltage-Clamp Experimenten konnten NIC1-induzierte Ströme gemessen werden (III.2.2.1.), welche von der Chloridkonzentration im Messpuffer abhängig waren (III.2.2.2.) und durch trivalente Kationen inhibiert werden konnten (III.2.2.3.). Ein Vergleich der Ergebnisse für NIC1, NIC2 und NIC4 zeigte deutliche Unterschiede bei der Expression dieser drei Proteine in *X. laevis* Oozyten (III.2.2.4.).

III.2.2.1. NIC1 induziert spannungsabhängige Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten

Nach Klonierung und *in silico* Analyse wurde die cDNA von *NIC1* in den Vektor pGEMHE umkloniert. Die gerichtete Klonierung erfolgte unter Nutzung der *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen, welche durch die PCR mit den Primern 018-for und 018-rev der cDNA angefügt worden waren. Im entstandenen Plasmid pGEMHE::*NIC1* waren vor und nach der pflanzlichen cDNA die mRNA-stabilisierenden 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globulins aus *X. laevis* lokalisiert. Studien von Liman *et al.* (1992) hatten gezeigt, dass durch das Anfügen dieser Bereiche die Stabilität von *in vitro* hergestellter und anschließend in Oozyten injizierter RNA deutlich verbessert werden kann. Nach *in vitro* Transkription des *NIC1*-Konstrukts von pGEMHE::*NIC1*, Injektion der *NIC1*-cRNA in die Oozyten und anschließender Inkubation für 2 bis 5 Tage zeigten sich in Voltage-Clamp Experimenten deutliche Stromantworten bei hyperpolarisierenden Spannungen. Die gemessenen Stromantworten hatten maximale Stromstärken zwischen eins und fünf Mikroampere und traten in Kontrolloozyten, in die Wasser injiziert worden war, nicht auf. Die maximalen Ströme in den Kontrolloozyten erreichten 100 bis 250 nA und waren somit mindestens eine Größenordnung kleiner als die NIC1-induzierten Stromantworten. Ausgehend von einer Ruhespannung (0 mV) wurden in den Experimenten variable Spannungspulse von +40 mV bis -180 mV getestet. Nach 1800 ms endete der variable Spannungspuls und die Spannung wurde bei +40 mV konstant gehalten (siehe Spannungsprotokoll in Abb. III.23.C.). Nach weiteren 1800 ms bei +40 mV folgte wieder die Ruhespannung von 0 mV. Es zeigte sich, dass ab einem variablen Spannungspuls von ca. -80 mV Ströme detektierbar waren, die bei Pulsen von -120, -140, -160 und -180 mV zunahmten (siehe Abb. III.23.A.). Diese Stromantworten waren sowohl in NaCl-, Natriumgluconat-, KCl-, Kaliumgluconat- als auch Kalziumgluconat-Puffern zu beobachten. Abbildung III.23.A. zeigt exemplarisch das

verwendete Spannungsprotokoll und die Stromantworten auf Spannungspulse von +40 bis -180 mV im Messpuffer mit 108 mM KCl. In dieser Lösung waren nach Beendigung des variablen Spannungspulses bei der konstanten Spannung von +40 mV deutliche „Tail“-Ströme zu beobachten. Tail-Ströme können auftreten, wenn Kanalproteine aktiviert werden (in den hier geschilderten Voltage-Clamp Experimenten durch hyperpolarisierende Spannungspulse) und anschließend, trotz Beendigung des aktivierenden Reizes, noch einige Zeit geöffnet sind. In den NIC1-exprimierenden Oozyten waren Tail-Ströme zu beobachten, die einem Ausstrom von Kationen oder einem Einstrom von Anionen entsprachen. Für jeden getesteten Messpuffer wurden mindestens drei Oozyten ($n = 3$) aus zwei Präparationen ($N = 2$) untersucht. Aus den gemessenen Strom- und Spannungswerten am Ende des variablen Spannungspulses (T_1 in Abb. III.23.A.) wurden entsprechende Strom-Spannungskurven abgeleitet (Abb. III.23.D.).

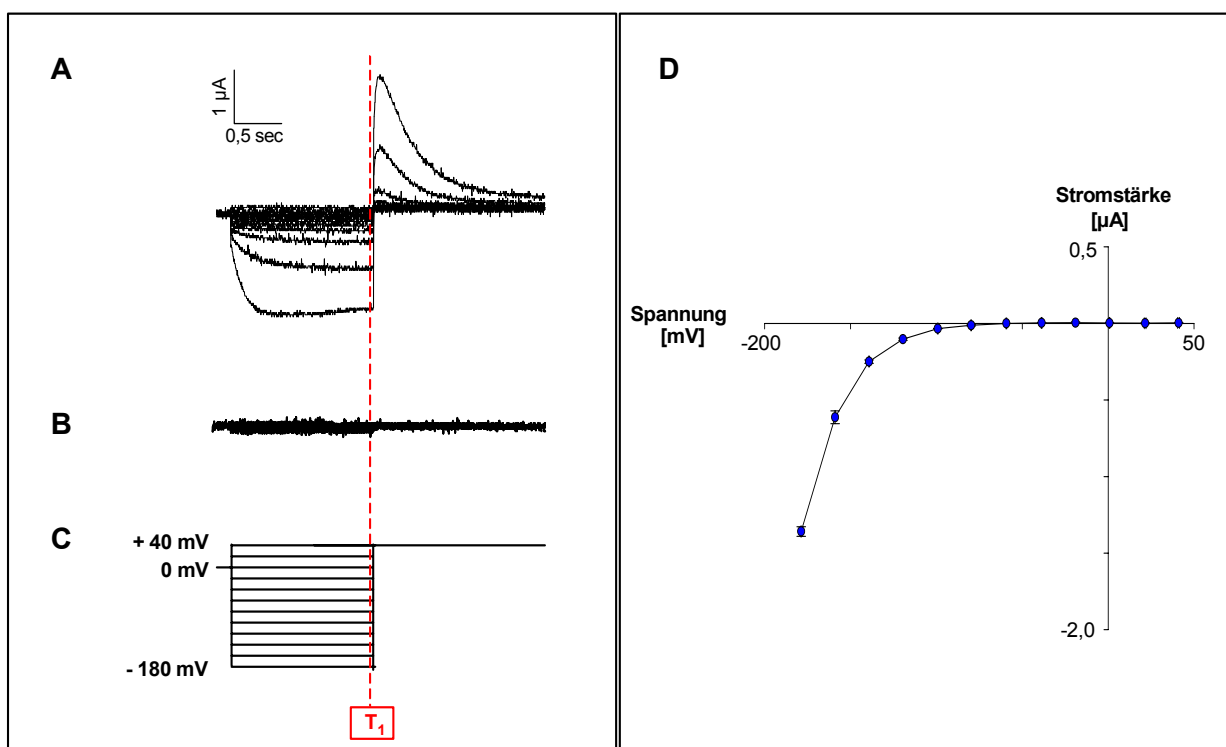


Abb. III.23. NIC1-Aktivität bei heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Ausgehend von einer Ruhespannung (0 mV) wurden in Voltage-Clamp Experimenten Spannungspulse von +40 bis -180 mV angelegt (C). Bei der Untersuchung von NIC1-exprimierenden Oozyten konnten charakteristische Stromantworten gemessen werden (exemplarisch für eine Oocyte in A dargestellt). Im Bereich von ca. -80 mV bis -180 mV waren bei Zunahme der hyperpolarisierenden Spannungspulse zunehmende Stromantworten zu beobachten. Es zeigte sich außerdem, dass nach der Beendigung der variablen Spannungspulse Tail-Ströme auftraten (bei einer konstanten Spannung von +40 mV). In Kontrolloozyten konnten bei Anwendung des gleichen Spannungsprotokolls keine spannungsabhängigen Stromantworten oder Tail-Ströme beobachtet werden (B). Die Ströme der NIC1-exprimierenden Oozyten am Ende des variablen Spannungspulses (Zeitpunkt T_1) wurden in einem Strom-Spannungs-Diagramm gegen die gleichzeitig gemessene Spannung aufgetragen (D). Dargestellt sind die Mittelwerte der Stromantworten von fünf Oozyten ($n = 3$, $N = 2$), die in Messpuffer mit 108 mM KCl getestet wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung (SD).

III.2.2.2. Chlorid-Abhängigkeit der NIC1-induzierten Ströme in *X. laevis* Oozyten

Es konnte eine Abhängigkeit der Tail-Ströme von variierenden Chloridkonzentrationen im Messpuffer festgestellt werden. Hielt man die Kaliumkonzentration konstant, verringerte aber schrittweise die Chloridkonzentration in den Messpuffern (durch verschiedene Verhältnisse von Kaliumchlorid zu Kaliumgluconat), so konnte eine Abnahme der Tail-Ströme gemessen werden. Die Stromantworten auf die variablen Spannungspulse blieben bei allen Chloridkonzentrationen unverändert. Diese Resultate deuten auf einen unabhängigen Mechanismus für beide Stromrichtungen hin. In Abb. III.24. sind exemplarisch die beobachteten Stromantworten einer Oozyte in Messpuffern mit vier verschiedenen Chloridkonzentrationen dargestellt.

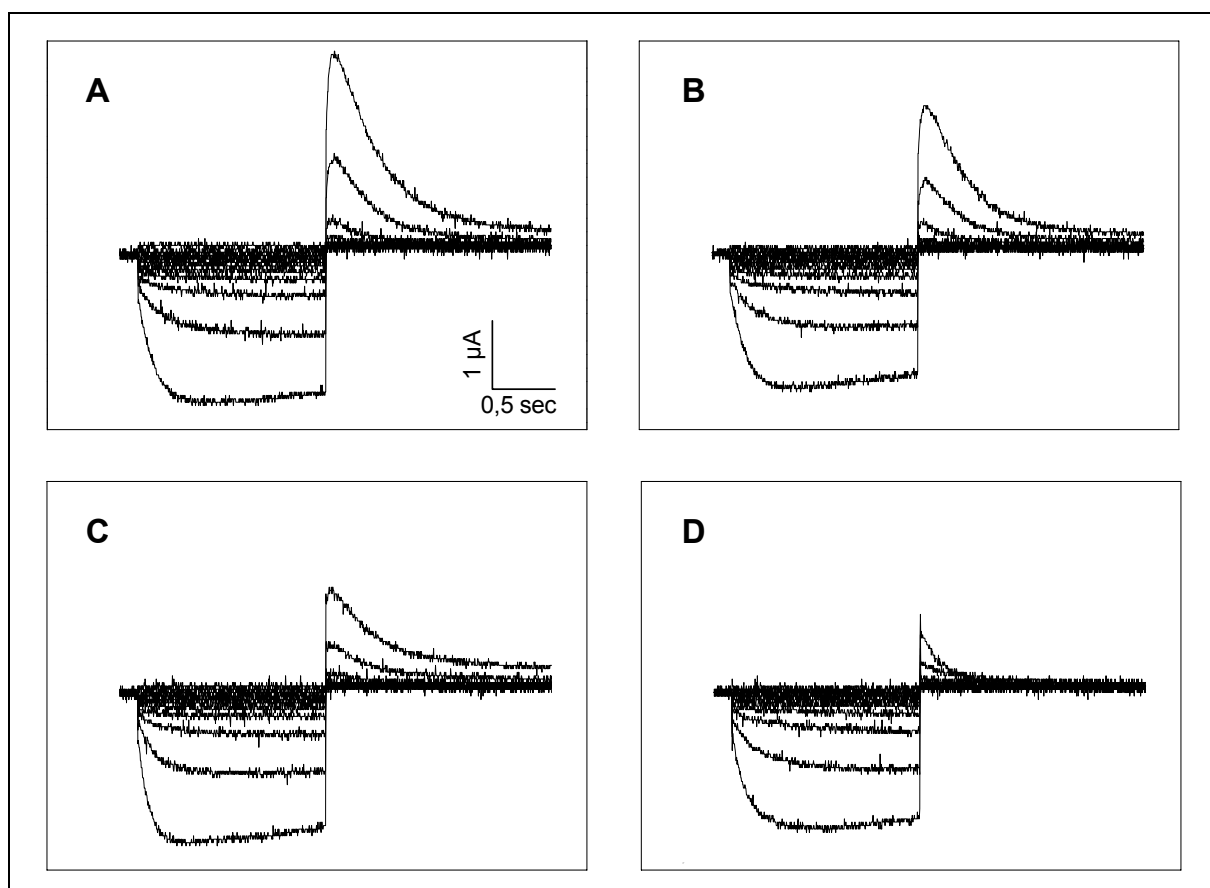


Abb. III.24. Chloridabhängige Stromantworten von NIC1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten

Die Stromantworten auf Spannungspulse von +40 bis -180 mV (nach dem in Abb. III.23. skizzierten Protokoll) wurden in Messpuffern mit 108 mM (A), 54 mM (B), 29 mM (C) und 14 mM (D) Chlorid gemessen. Die Konzentration an Kaliumionen wurde in allen vier Ansätzen konstant bei 108 mM gehalten. Es ist die Abnahme der Tail-Ströme in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration zu erkennen. Die bei den hyperpolarisierenden Spannungspulsen auftretenden Ströme zeigten dagegen in allen vier Messpuffern vergleichbare Verläufe und Intensitäten. Die in A, B, C und D dargestellten Stromantworten stammten von einer Oozyte. Vier weitere Oozyten ($n = 4$; $N = 2$) wurden untersucht und zeigten die gleiche Chloridabhängigkeit der Tail-Ströme.

Da in Experimenten mit Kontrolloozyten (mit Wasser injiziert) weder die spannungsabhängigen Stromantworten noch die Tail-Ströme beobachtet werden konnten, war davon

auszugehen, dass beide Stromkomponenten von NIC1 induziert wurden. Der Zusammenhang zwischen den auftretenden Tail-Strömen und den Chloridkonzentrationen der Messpuffer wurde im Folgenden detaillierter analysiert. Die Abbildung III.25. zeigt Strom-Spannungs Diagramme, in denen die variablen Spannungspulse (Zeitpunkt T_1) gegen die gemessenen Tail-Ströme (Zeitpunkt T_2) aufgetragen wurden.

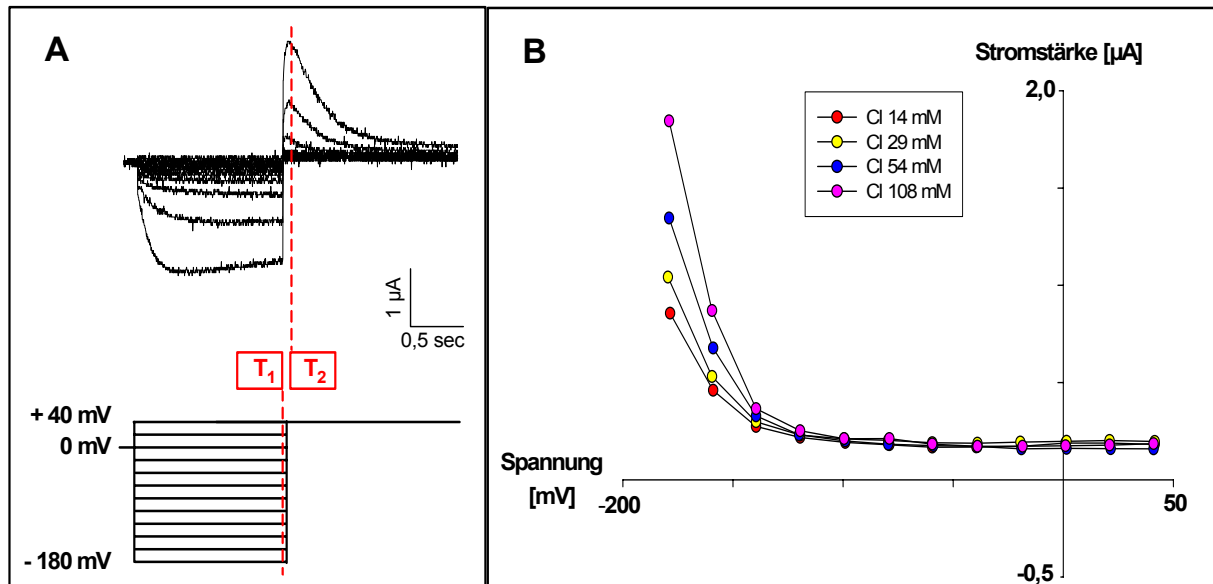


Abb. III.25. Chlorid-Abhängigkeit der NIC1-induzierten Tail-Ströme in *X. laevis* Oozyten

Zur Quantifizierung der Tail-Ströme wurden die applizierten Spannungspulse (zum Zeitpunkt T_1) mit den gemessenen Tail-Strömen (zum Zeitpunkt T_2) verglichen (A). Exemplarisch sind die beobachteten Tail-Ströme, das verwendete Spannungsprotokoll und die Zeitpunkte T_1 und T_2 für ein Voltage-clamp Experiment in Messpuffer mit 108 mM Chlorid dargestellt. Die eingesetzten Messpuffer hatten Chloridkonzentrationen von 108 mM, 54 mM, 29 mM und 14 mM und jeweils konstante Kaliumkonzentrationen von 108 mM. Aus den Messwerten an T_1 (applizierte Spannung am Ende des variablen Spannungspulses) und T_2 (Tail-Ströme direkt nach Beendigung des variablen Spannungspulses) wurden die dargestellten Strom-Spannungs-Kurven ermittelt (B). Ihr Verlauf war von den Chloridkonzentrationen im Messpuffer abhängig.

Wie in Abbildung III.26. zu erkennen, zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der maximalen Amplitude der Tail-Ströme und dem Logarithmus der jeweils eingesetzten Chloridkonzentration im Messpuffer.

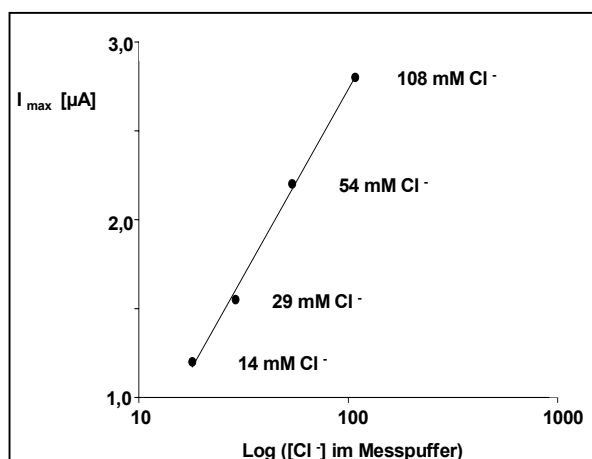


Abb. III.26. Linearer Zusammenhang zwischen der maximalen Amplitude der NIC1-induzierten Tail-Ströme und dem Logarithmus der Chloridkonzentration im Messpuffer

Die maximalen NIC1-induzierten Tail-Ströme in Messpuffern mit 14, 29, 54 oder 108 mM Chlorid wurden ermittelt. Der Zusammenhang zwischen der maximalen Stromstärke und dem Logarithmus der Chloridkonzentration im Messpuffer ist hier exemplarisch für eine Oozyte dargestellt. Insgesamt wurden fünf Oozyten getestet ($n = 5$; $N = 2$).

Die Untersuchung der Tail-Ströme zeigte, dass die NIC1-induzierten Ströme durch den Flux von Chloridionen durch die Membran der Oozyten hervorgerufen wurden. Es handelte sich dabei um auswärts gerichtete Ströme (also einen Einstrom von Chlorid in die Zelle), die durch Hyperpolarisation aktiviert werden konnten. Sie wurden im Folgenden durch Inhibitorstudien näher charakterisiert.

III.2.2.3. Inhibition NIC1-induzierter Ströme durch Lanthan- und Gadolinium-Ionen

Zur Charakterisierung der NIC1-induzierten Ströme in *X. laevis* Oozyten wurden im Folgenden aus der Literatur bekannte Inhibitoren getestet. Für Oozyten sind endogene Chloridströme, die durch Kalzium aktivierbar sind, beschrieben (Weber, 1999). Aus diesem Grund wurden Bepridil, Verapamil und Nifedipin (Inhibitoren von Kalziumkanälen) und die trivalenten Ionen La^{3+} und Ga^{3+} (Inhibitoren von Kalziumkanälen) untersucht. Als Inhibitor von Chloridkanälen ist Nifluminsäure beschrieben und wurde ebenfalls getestet. Während der Einsatz von Bepridil, Verapamil, Nifedipin und Nifluminsäure keinen inhibitorischen Effekt auf die NIC1-induzierten Ströme in *X. laevis* Oozyten hatte, führten schon mikromolare Konzentrationen an La^{3+} oder Ga^{3+} zu einer starken Inhibition. Die Abhängigkeit der Ströme von den eingesetzten Konzentrationen dieser trivalenten Kationen ist in Abbildung III.27. dargestellt.

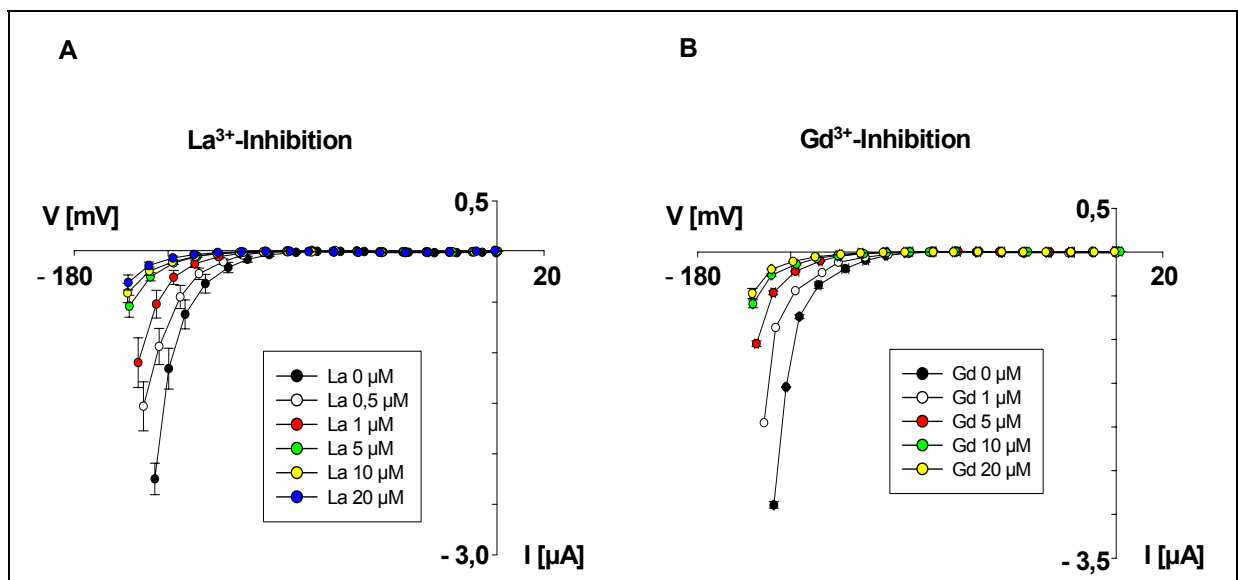


Abb. III.27. Inhibition der NIC1-induzierten Ströme durch mikromolare Konzentrationen an La^{3+} oder Ga^{3+}

Die NIC1-induzierten Ströme in *X. laevis* Oozyten wurden durch La^{3+} (A) oder Ga^{3+} (B) inhibiert. Teil A der Abbildung zeigt den Einfluss von 0 bis 20 µM La^{3+} im Messpuffer (108 mM KCl). Schon bei 0,5 µM La^{3+} war eine deutliche Hemmung der Stromantwort zu beobachten (Spannungsprotokoll und Erstellung der Strom-Spannungskurven wie in Abb. III.22. beschrieben). Mit zunehmenden Konzentrationen des trivalenten Ions nahmen die Ströme kontinuierlich ab und wurden durch 20 µM La^{3+} fast vollständig gehemmt (n = 4, N = 2; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). In parallelen Experimenten (B) wurde nachgewiesen, dass Ga^{3+} die Stromantworten von NIC1-exprimierenden Oozyten im gleichen Konzentrationsbereich wie La^{3+} inhibiert (n = 4; N = 2).

III.2.2.4. NIC4-induzierte Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten

Für NIC2, welches im Rahmen der Diplomarbeit von Blazej Dolniak (2001) untersucht wurde, zeigte sich keine Aktivität in *X. laevis* Oozyten. Dagegen ergab die heterologe Expression von NIC4 im Rahmen der Diplomarbeit von Mandy Kursawe (2002) eine Induktion von Strömen in diesem heterologen Expressionssystem. Die NIC4-induzierten Ströme waren unabhängig von hyperpolarisierenden Spannungspulsen und Kalium-spezifisch. Sie ließen sich nicht durch die trivalenten Kationen La^{3+} oder Gd^{3+} hemmen. Die Ergebnisse der NIC1-, NIC2- und NIC4-Expression in *X. laevis* Oozyten legten den Schluss nahe, dass diese drei Proteine trotz ihrer Homologie unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen. Diese Annahme konnte bei Expression der drei cDNAs in *S. cerevisiae* bestätigt werden (III.2.3.5.).

III.2.3. Heterologe Expression von NIC1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur weiteren Charakterisierung von NIC1 wurde das Protein in *S. cerevisiae* exprimiert. In einem ersten Ansatz wurde ein geeigneter Hefestamm ausgesucht (III.2.3.1), *NIC1* in diesen Stamm transformiert und die Expression getestet (III.2.3.2). Anschließend wurde bei zunehmenden Kationenkonzentrationen der Einfluss der *NIC1*-Expression auf das Wachstumsverhalten der Hefen untersucht (III.2.3.3.). Die veränderte Salztoleranz von *NIC1*-exprimierenden Hefen wurde für eine erste Struktur-Funktionsstudie mit punktmutiertem *NIC1*-Gen genutzt (III.2.3.4.). Der beobachtete Phänotyp bei *NIC1*-Expression in *S. cerevisiae* unterschied sich von den Ergebnissen der *NIC2*- und der *NIC4*-Expression im gleichen System (III.2.3.5.).

III.2.3.1. Untersuchung der Salztoleranz des Hefestamms Y04177

Neben *ETR1* gibt es ein zweites Gen (*ydr338c*), welches für ein MATE-Proteine in *S. cerevisiae* kodiert. In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob dem uncharakterisierten Gen *ydr338c* eine Funktion zugewiesen werden kann. Aus dem Ressourcenzentrum Euroscarf (Oberursel) wurde der Stamm Y04177 bezogen. *Ydr338c* ist in diesem haploiden Stamm durch die Insertion einer Kanamycinresistenzkassette in das Gen inaktiviert. Für eine erste Charakterisierung von Ydr338C wurde die Salztoleranz des Stamms Y04177 getestet, da der Transport von monovalenten Kationen schon für das homologe prokaryotische MATE-Protein NorM gezeigt werden konnte (Morita *et al.*, 1998 und 2000). In Wachstumsexperimenten wurde der Stamm Y04177 parallel mit dem entsprechenden Referenzstamm Y00000 auf YPD-Medium bei ansteigenden Konzentrationen von NaCl, LiCl oder CaCl_2 untersucht.

Nach zwei Tagen Wachstum bei 30°C fanden sich zwischen den beiden Stämmen Y04177 und Y00000 keine detektierbaren Wachstumsunterschiede. Beide zeigten gleiches Wachstumsverhalten oder wurden bei hohen Salzkonzentrationen (NaCl: 1600 mM; LiCl: 750 mM; CaCl₂: 700 mM) komplett in ihrem Wachstum gehemmt. Erst nach dreitägiger Inkubation erkannte man auf YPD-Medium mit 400, 500 oder 600 mM CaCl₂ morphologische Unterschiede zwischen den Makrokolonien beider Stämme. Die Kolonien des *ydr338C* „Knock-out“ Stammes Y04177 besaßen im Gegensatz zum Referenzstamm eine rauhe, zerfurchte Oberfläche (Abb. III.28.A), was auf gestörtes Wachstum der Zellen schließen ließ (Wolff *et al.*, 1999).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Makrokolonie-Phänotyp von Y04177 sich durch die Expression von NIC1 komplementieren ließ. Für diese Experimente war der Einsatz von SC-Selektivmedium notwendig, da für die spätere Selektion und Kultivierung von Transformanten das *URA3*-Gen als Selektionsmarker genutzt werden sollte (die Stämme Y00000 und Y04177 sind Uracil-auxotroph). Zur Expression in *S. cerevisiae* sollte die cDNA von *NIC1* in die beiden Plasmide pDR196 und pYES2 kloniert werden. Aus diesem Grund war es notwendig, auch die Kohlenstoffquellen im Medium zu variieren, da zur optimalen Expression von Genen auf Plasmid pDR196 Glukose notwendig ist und der *gal*-Promotor von pYES2 den Einsatz von Galaktose erfordert. In Vorexperimenten wurden die beiden Plasmide pDR196 und pYES2 in Y04177 transformiert. Anschließend wurde getestet, ob die rauhe, zerfurchte Oberfläche des Stamms auf SC-Selektivmedien mit 400, 500 oder 600 mM Kalziumchlorid zu beobachten war. Jeweils drei Transformanten Y04177/pYES2 oder Y04177/pDR196 wurden bezüglich ihres Wachstums auf SC-Glukose (mit 400 mM CaCl₂; für Selektion von pDR196) oder SC-Galaktose (mit 400 mM CaCl₂; für Selektion von pYES2) getestet. Es zeigte sich, dass der Makrokolonie-Phänotyp von Y04177 auf keinem der beiden SC-Medien auftrat. Die Strategie zur Komplementierung des Phänotyps von Y04177 durch NIC1 wurde an dieser Stelle aufgegeben und im nächsten Ansatz der Einfluss der NIC1-Expression auf das Wachstumsverhalten des Hefe-Stammes Y00000, der die beiden intakten MATE-Gene *ETR1* und *ydr338c* besitzt, untersucht.

Parallel zu den Wachstumsexperimenten wurde der Hefestamm Y04177 in der Arbeitsgruppe von Adam Bertl (Universität Karlsruhe) mittels Patch-Clamp Experimenten auf veränderte „Nicht Selektive Kationenkanäle“ (NSC) hin untersucht. Verglichen mit dem Kontrollstamm Y00000 zeigten sich jedoch keine Unterschiede der NSC-Ströme (A. Bertl, persönliche Mitteilung).

III.2.3.2. Expression von NIC1 im Hefestamm Y00000

Zur Expression von NIC1 in *S. cerevisiae* wurde das Konstrukt pYES2::*NIC1* in den Stamm Y00000 transformiert. Als Kontrollen in den anschließenden Wachstumsexperimenten dienten Zellen, in die der leere Vektor pYES2 transformiert worden war. Es folgte die Untersuchung der *NIC1*-Genexpression in zwei Transformanden Y00000/pYES2::*NIC1* und zwei Transformanden Y00000/pYES2 mittels RNA-Blot. Als Sonde in diesen Experimenten diente die radioaktiv markierte cDNA von *NIC1*. In den RNA-Präparationen der Transformanden Y00000/pYES2::*NIC1* konnte ein Signal in der Größe von *NIC1* (ca. 1500 Nukleotide) nachgewiesen werden. Es war in der RNA der Transformanden Y00000/pYES2 nicht detektierbar (Abb. III.28.B).

III.2.3.3. Untersuchung der Salztoleranz von NIC1-exprimierenden Hefestämmen

Nach der Detektion von *NIC1*-Transkripten in den Transformanden Y00000/pYES2::*NIC1* wurden mit diesen Stämmen und den entsprechenden Kontrollstämmen (Y00000/pYES2) Wachstumsexperimente auf SC-Galaktose Medien bei erhöhten Konzentrationen an mono- und divalenten Kationen durchgeführt. Aus zwei Gründen wurden in einem ersten Ansatz die Kationen Natrium, Lithium und Kalzium ausgewählt. Erste Hinweise, dass NIC1 wahrscheinlich am Transport von Kationen beteiligt ist, lieferten die Inhibitorstudien mit La^{3+} und Ga^{3+} in den Oozyten von *X. laevis* (III.2.2.3.). Außerdem hatten die Studien zu NorM aus *V. parahaemolyticus* gezeigt, dass dieses MATE-Protein im Antiport zu toxischen organischen Substanzen die monovalenten Kationen Natrium und Lithium transportiert (Morita *et al.*, 2000).

Jeweils fünf Transformanden Y00000/pYES2::*NIC1* und Y00000/pYES2 wurden in flüssigem SC-Galaktose Medium über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend die Zelldichte OD_{600} -normiert. Es folgte das Auftropfen der Zellsuspensionen auf NaCl-, LiCl- oder CaCl_2 -haltigen SC-Galaktose Agar. Die Kulturen wurden anschließend bei 30°C kultiviert. Für alle getesteten Konzentrationen an NaCl oder CaCl_2 zeigten sich keine Wachstumsunterschiede. Nur auf den Medien mit 300 mM LiCl war zu beobachten, dass die NIC1-exprimierenden Kolonien sich nach 24, 48 und 72 h deutlich schneller als die parallel kultivierten Kontrollstämme Y00000/pYES2 entwickelten. In Abbildung III.28.C ist dies exemplarisch für eine Transformande Y00000/pYES2::*NIC1* dargestellt.

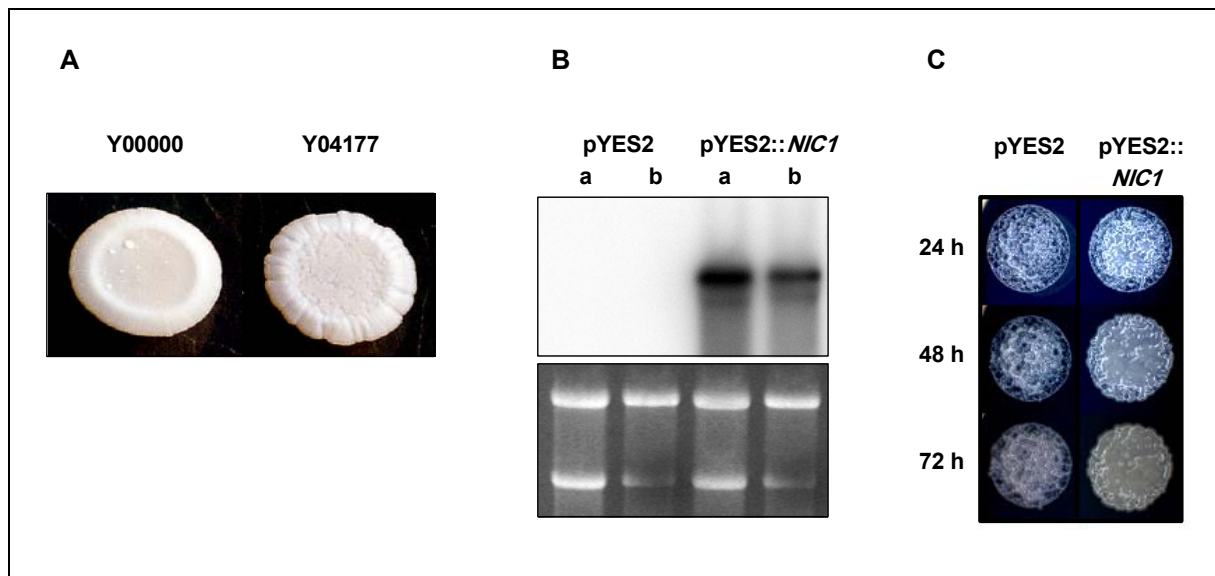


Abb. III.28. Phänotyp von Hefestamm Y04177 und Expression von NIC1 in Hefestamm Y00000

A. Die Makrokolonien des Stamms Y04177 (Knock-out von *ydr338c*, einem der zwei homologen Gene von *NIC1* in *S. cerevisiae*) unterschieden sich von den Makrokolonien des entsprechenden Kontrollstamms Y00000 (besitzt ein intaktes *ydr338*-Gen, hat aber sonst den gleichen Genotyp wie Y04177) bei Kultivierung auf YPD-Medium mit 400 mM CaCl_2 . Die zerfurchte Oberfläche deutete auf ein gestörtes Wachstum der Zellen hin (Wolff *et al.*, 1999).

B. Nach Transformation des Hefestammes Y00000 mit den Plasmiden pYES2 oder pYES2::*NIC1* wurden jeweils zwei Transformanten (a und b) in RNA-Blot Experimenten auf die Expression von *NIC1* hin untersucht. Wie sich im oberen Teil der Abbildung zeigt, konnte in den RNA-Präparationen der beiden *NIC1*-exprimierenden Kulturen (Y00000/ pYES2::*NIC1*) das erwartete Transkript in der Größe von ca. 1500 Nukleotiden detektiert werden. Es kam in der RNA der beiden Kontrollstämme (Y00000/pYES2) nicht vor. Der untere Teil der Abbildung zeigt als Ladungs- und Qualitätskontrolle die ribosomale RNA nach ihrer Auftrennung im RNA-Gel.

C. In Wachstumsexperimenten auf festem SC-Galaktose Medium mit 300 mM LiCl konnten Wachstumsunterschiede zwischen *NIC1*-exprimierenden Kulturen (Y00000/pYES2::*NIC1*) und Kontrollkulturen (Y00000/pYES2) beobachtet werden. Schon nach 24 h Wachstum war das stärkere Wachstum der *NIC1*-exprimierenden Kultur zu erkennen (rechter Teil der Abbildung). Dieser Wachstumsunterschied nahm in den nächsten Tagen (48 h und 72 h) noch zu.

Das veränderte Wachstum von *NIC1*-exprimierenden Hefen auf festem SC-Galaktose Medium mit hohen LiCl-Konzentrationen wurde in Experimenten mit flüssigen SC-Galaktose Medien bei ansteigenden Lithiumchloridkonzentrationen quantifiziert. Medien mit 0, 150, 300, 450 und 600 mM LiCl wurden mit Aliquots OD_{600} -normierter Übernachtskulturen von jeweils fünf Transformanten Y00000/pYES2::*NIC1* oder Y00000/pYES2 angeimpft und das Wachstum dieser Kulturen bis zur stationären Phase verfolgt. Es bestätigten sich die Beobachtungen aus den Experimenten mit festem LiCl-haltigen SC-Galaktose Medium. Ohne Lithium im Medium zeigten *NIC1*-exprimierende Hefen und die entsprechenden Kontrollstämme gleiches Wachstumsverhalten, bei zunehmenden Lithiumkonzentrationen führte dann aber die Expression von *NIC1* zu Wachstumsvorteilen. Je größer die Lithiumkonzentration, desto stärker unterschieden sich die *NIC1*-exprimierenden Kulturen von den Kontrollstämmen. Exemplarisch sind in Abbildung III.29. die Wachstumskurven bei

0, 300 und 600 mM LiCl im Medium dargestellt. Die NIC1-induzierte Lithiumtoleranz war der erste Hinweis, dass ein eukaryotisches MATE-Protein am Transport von Lithium beteiligt ist. Bisher konnte ein solcher Transport nur für prokaryotische Mitglieder dieser Familie gezeigt werden (zur Übersicht siehe Tab. IV.1. in der Diskussion).

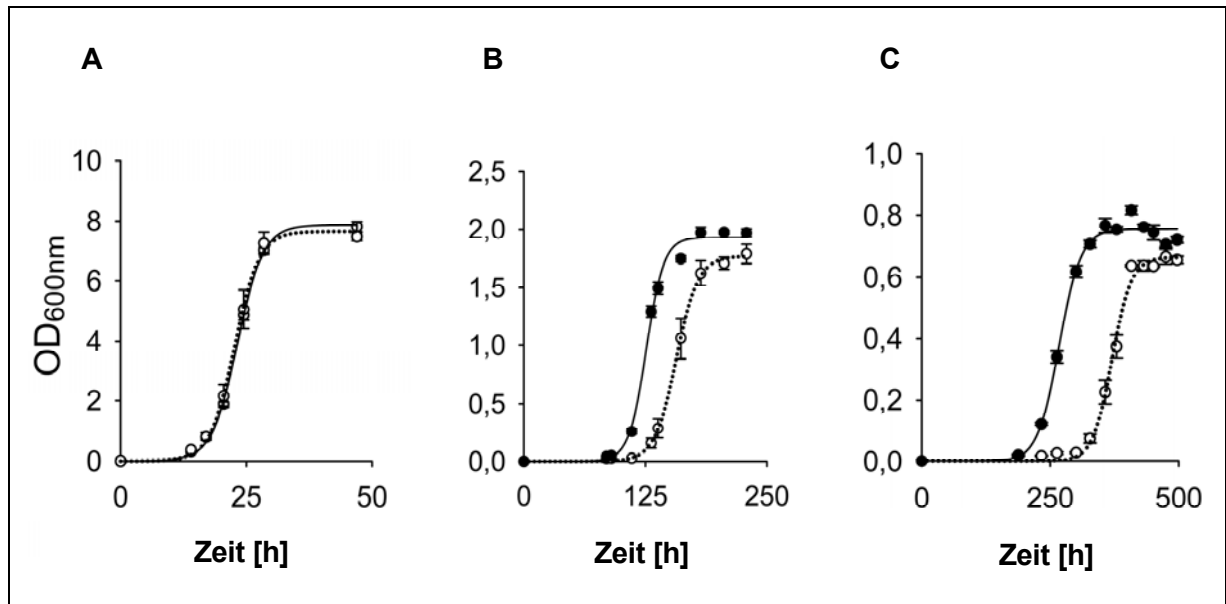


Abb. III.29. NIC1-Expression in *S. cerevisiae* vermittelt erhöhte Lithiumtoleranz

In Wachstumsexperimenten mit fünf Transformanten Y00000/pYES2::*NIC1* und fünf Transformanten Y00000/pYES2 zeigten sich bei zunehmenden Lithiumkonzentrationen im SC-Galaktose Medium ein Wachstumsvorteil durch *NIC1*-Expression. Ohne Lithiumchlorid (A) waren keine Wachstumsunterschiede zu beobachten, bei Wachstum in Medium mit 300 mM LiCl (B) erkannte man dann aber Wachstumsvorteile von *NIC1*-exprimierenden Hefen. Dieser Effekt nahm mit steigender LiCl-Konzentration noch zu und war bei 600 mM am deutlichsten (C). (• = OD₆₀₀-bestimmte Zelldichte der Y00000/pYES2::*NIC1*-Transformanten; o = OD₆₀₀-bestimmte Zelldichte der Kontrollstämme; die dargestellten OD₆₀₀-Werte entsprechen dem Mittelwert der Dichtemessungen von fünf Transformanten und die Fehlerbalken der einzelnen Messpunkte repräsentieren die Standardabweichungen (SD); an die gemittelten Messwerte wurde eine sigmoide Kurve angepasst)

Der beobachtete „Lithium-Phänotyp“ von Stamm Y00000 bei Expression von *NIC1* führte dazu, auch die NaCl-Toleranz von jeweils fünf Transformanten Y00000/pYES2::*NIC1* oder Y00000/pYES2 in Flüssigkulturen zu testen. Ab 900 mM NaCl traten dabei Wachstumsunterschiede zwischen den fünf Transformanten Y00000/pYES2::*NIC1* und den Kontrollstämmen auf. Es war das Gegenteil der Lithiumexperimente zu beobachten: Bei hohen Natriumkonzentrationen (900 und 1500 mM) im SC-Galaktose Medium führte der Besitz von *NIC1* zu erhöhter Natriumsensitivität. Das beobachtete Wachstumsverhalten wird in Abbildung III.30. dargestellt.

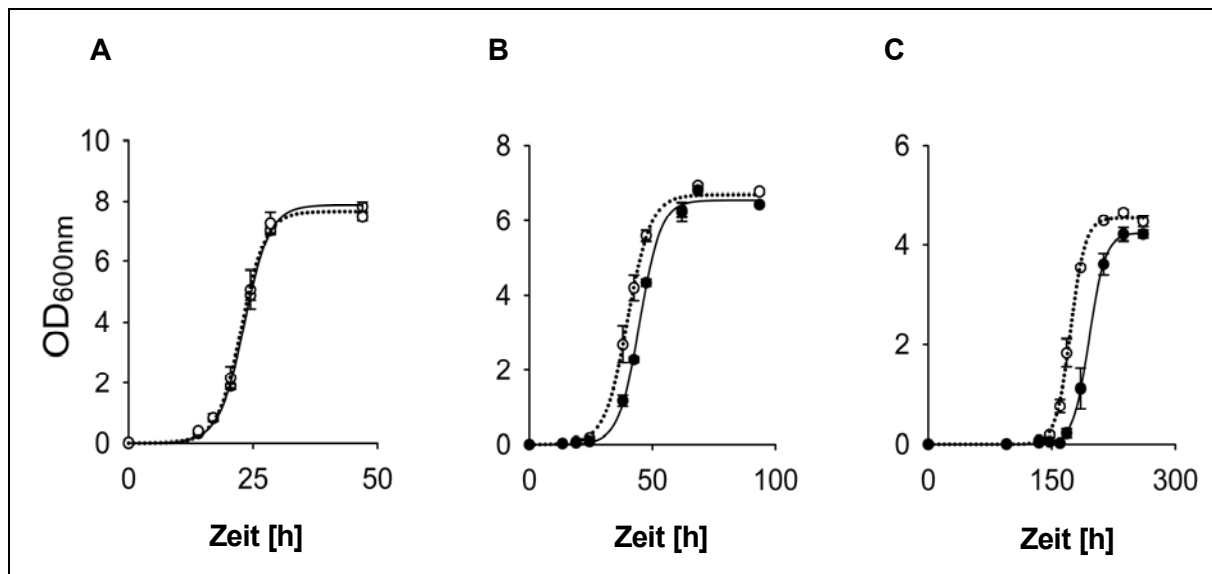


Abb. III.30. NIC1-Expression in *S. cerevisiae* erhöht die Natriumsensitivität

Das Wachstum von jeweils fünf Transformanten Y00000/pYES2::NIC1 oder Y00000/pYES2 wurde in SC-Galaktose Medium ohne (A), mit 900 mM (B) oder mit 1500 mM (C) NaCl untersucht. Ohne Zusatz von Salz wuchsen die Hefekulturen gleich (A). In Medium mit 900 mM NaCl erkannte man erste Verzögerungen im Wachstum der NIC1-exprimierenden Transformanten (B). Dieser Effekt verstärkte sich bei Wachstum der Kulturen in sehr hohen Salzkonzentrationen (1500 mM NaCl, Teil C der Abb.). (• = OD₆₀₀-bestimmte Zelldichte der Y00000/pYES2::NIC1-Transformanten; o = OD₆₀₀-bestimmte Zelldichte der Kontrollstämmen; die dargestellten OD₆₀₀-Werte entsprechen dem Mittelwert der Dichtemessungen von fünf Transformanten und die Fehlerbalken der einzelnen Messpunkte repräsentieren die Standardabweichungen (SD); an die gemittelten Messwerte wurde eine sigmoide Kurve angepasst)

Da für prokaryotische MATE-Proteine ein Transport von verschiedenen Toxinen gezeigt werden konnte (siehe Abb. IV.1. und Tab. IV.1. in der Diskussion), wurde nach der Zugabe von Tetramethylammonium, Norfloxacin, Berberidin, Ethidiumbromid oder Ethionin in das SC-Galaktose Medium untersucht, ob es zu Wachstumsunterschieden zwischen den NIC1-exprimierenden Hefen und den Kontrollstämmen (Y00000/pYES2) kam. In keinem dieser Versuche war es möglich, erhöhte Toxinsensitivität oder -toleranz bei NIC1-Expression zu beobachten.

III.2.3.4. Die Mutation G326T in NIC1 beeinflusst den „Lithium-Phänotyp“

Der „Lithium-Phänotyp“ NIC1-exprimierender Hefestämme wurde im Folgenden für eine erste Struktur-Funktionsstudie genutzt. Es sollte dabei untersucht werden, ob sich im heterologen Expressionssystem *S. cerevisiae* Bereiche von NIC1 identifizieren lassen, die einen Einfluss auf die Lithiumtoleranz haben. Durch drei Basenpaaraustausche im NIC1-Gen wurde eine G326T Mutation in NIC1 erzeugt. Diese Aminosäure ist Teil des Motivs R(IV)(G/S)XXLG, welches in allen NIC-Proteinen konserviert ist und auch in NorM aus *V.*

parahaemolyticus vorkommt. In Abbildung III.31. wird die Strategie zur Erzeugung der G326T-Mutation beschrieben.

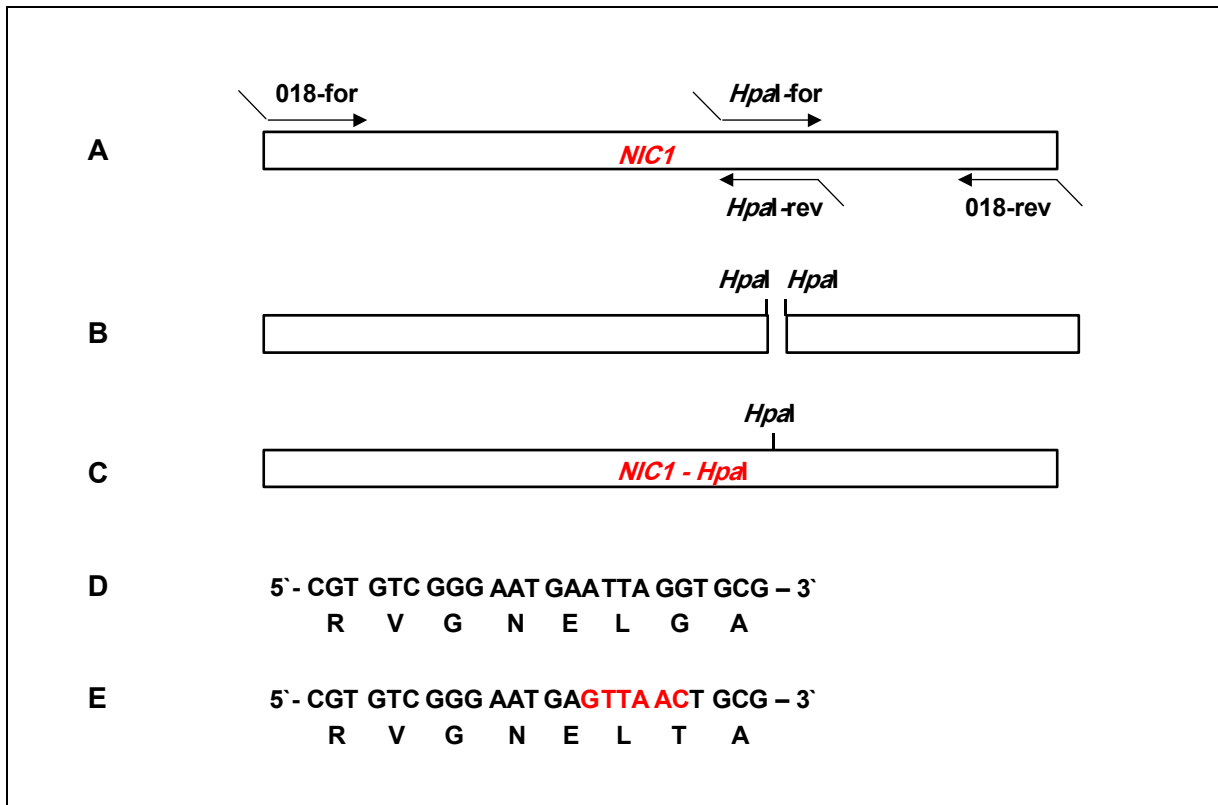


Abb. III.31. Mutation der Aminosäuresequenz RVGNELGA zu RVGNELTA

In zwei PCR-Ansätzen mit den Primern 018-for / *HpaI*-rev und *HpaI*-for / 018-rev wurden jeweils Teile der *NIC1*-cDNA amplifiziert (a, b). Durch die Primer *HpaI*-for und *HpaI*-rev wurden an die beiden PCR-Produkte *HpaI*-Schnittstellen angefügt. Im nächsten Schritt wurden diese Restriktionsstellen genutzt, um die entstandenen PCR-Fragmente zu schneiden und kompatible Enden für die anschließende Ligation zu schaffen. Das Ligationsergebnis diente im nächsten Schritt als Template für eine weitere PCR-Amplifikation mit den Primern 018-for / 018-rev. Es entstand die mutierte *NIC1*-cDNA „*NIC1-HpaI*“, welche in den Vektor pCR2.1 kloniert wurde. Mittels Sequenzierung konnte die erwartete DNA-Sequenz von *NIC1-HpaI* bestätigt werden. Durch das Einfügen der *HpaI*-Schnittstelle (rot markiert) war die ursprüngliche Sequenz von *NIC1* (d) an drei Positionen verändert worden (e). Die Basenpaaraustausche führten zur Veränderung der Aminosäuresequenz RVGNELGA zu RVGNELTA (d, e).

Nach seiner Sequenzierung wurde das Konstrukt *NIC1-HpaI* aus dem Vektor pCR2.1 in pYES2 umklontiert (es entstand pYES2::*NIC1-HpaI*). Anschließend folgte die Transformation des Plasmids in den Hefestamm Y00000. In Wachstumsexperimenten wurden fünf Transformanten von Y00000/pYES2::*NIC1-HpaI* parallel zu fünf Transformanten von Y00000/pYES2::*NIC1* und fünf Transformanten von Y00000/pYES2 in flüssigem SC-Galaktose Medium mit 450 mM LiCl kultiviert. Die Ergebnisse dieser Wachstumsexperimente sind in Abbildung III.32. dargestellt.

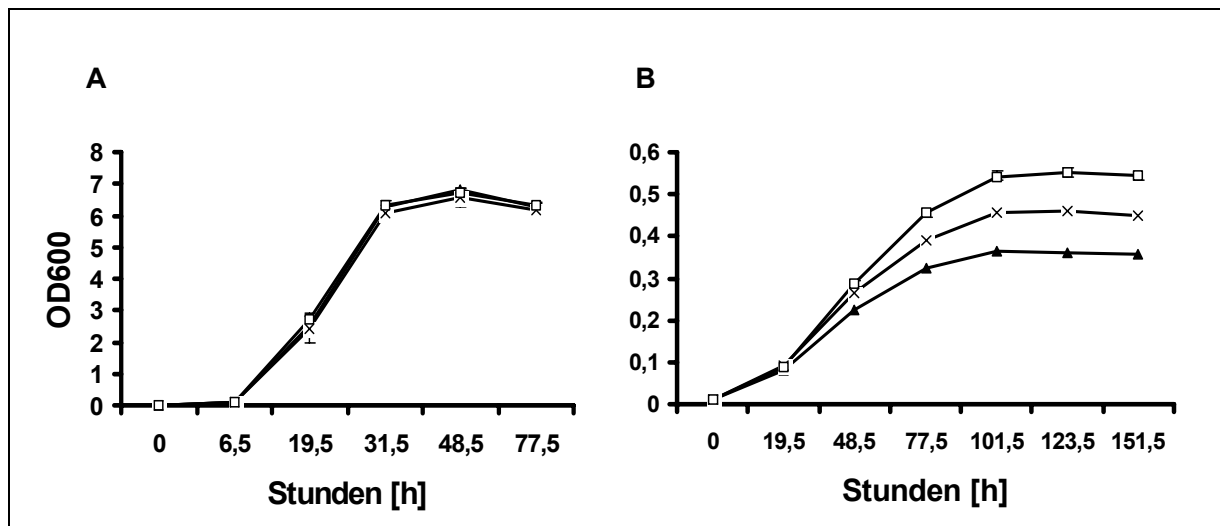


Abb. III.32. Aminosäuremutation G326T erhöht die NIC1-vermittelte Lithiumtoleranz in *S. cerevisiae*

Jeweils 5 Transformanten von Y00000/pYES2::NIC1-*Hpal* (viereckige Symbole), Y00000/pYES2::NIC1 (Kreuze) und Y00000/pYES2 (dreieckige Symbole) wurden in SC-Galaktose Medium ohne (A) und mit 450 mM (B) LiCl kultiviert. Ohne LiCl war das Wachstumsverhalten aller Transformanten identisch (A), in Medium mit 450 mM LiCl zeigten die Transformanten Y00000/pYES2::NIC1 aber gegenüber den Kontrollkulturen (Y00000/pYES2) die erwartete Erhöhung der Lithiumtoleranz. Sie wuchsen schneller und erreichten eine höhere Zelldichte als die Kontrollkulturen. Überraschenderweise zeigten die Kulturen, die NIC1 mit der mutierten Aminosäuresequenz RVGNELTA exprimierten, einen stärkeren „Lithiumeffekt“. Verglichen mit den anderen Kulturen (Y00000/pYES2::NIC1 und Y00000/pYES2) zeigten die fünf Transformanten Y00000/pYES2::NIC1-*Hpal* zu allen Zeitpunkten ihres Wachstums die höchste optische Dichte und erreichten die höchsten Zelldichten in der stationären Phase (B). Die dargestellten Wachstumskurven in Teil A und B der Abbildung fassen das Wachstum von jeweils fünf Transformanten zusammen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SE).

III.2.3.5. Einfluss von NIC2- und NIC4-Expression auf die Salztoleranz von Hefen

Neben der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehung durch Einfügen einer gezielten Mutation in das konservierte RVGNELG-Motiv von NIC1 zeigte die Charakterisierung von NIC2 und NIC4 in den Diplomarbeiten von Blazej Dolniak (2001) und Mandy Kursawe (2002), dass noch weitere Bereiche innerhalb dieser drei Proteine einen Einfluss auf die beobachtete Salztoleranz haben. Obwohl alle drei Proteine das Motiv RVGNELG besitzen, zeigten sie bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* deutlich unterschiedliche Wachstumsverhalten bei hohen LiCl- oder NaCl-Konzentrationen. Während bei NIC1-Expression in Hefen eine erhöhte Lithiumtoleranz und eine erhöhte Natriumsensitivität (III.2.3.3.) zu beobachten war, führte NIC2-Expression in den Hefen zu einer erhöhten Toleranz gegenüber beiden Kationen (Dolniak, 2001). NIC4-Expression führte zum entgegengesetzten Effekt. NIC4-exprimierende Hefen wiesen eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber LiCl und NaCl auf (Kursawe, 2002).

Wie der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte (siehe Abb. III.20.), besitzen NIC1, NIC2 und NIC4 neben dem konservierten RVGNELG-Motiv viele weitere Bereiche mit identischen

Aminosäuren. Trotz dieser großen Übereinstimmungen führte die Expression der drei Proteine in Hefen zu drei verschiedenen Phänotypen bezüglich der LiCl- und NaCl-Toleranz. Die Identifikation weiterer Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Toleranz gegenüber diesen monovalenten Kationen haben, wäre ein wichtiger Schritt zum Verständnis der NIC-Funktion in Hefen und möglicherweise auch in Pflanzen. Die Ergebnisse dieser Experimente in *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass Struktur-Funktionsstudien von NIC-Proteinen in diesem Expressionssystem möglich sind.

III.2.4. Modulation und Lokalisation der *NIC1*-Expression in *Arabidopsis thaliana*

Neben der heterologen Expression von *NIC1* in *X. laevis* Oozyten (III.2.2.) und Hefen (III.2.3.) wurde *in planta* untersucht, wo *NIC1* exprimiert wird (III.2.4.1) und wie eine Veränderung des *NIC1*-Transkriptgehalts die Pflanzen beeinflusst (III.2.4.2.).

III.2.4.1. Lokalisation von *NIC1*-Expression in *Arabidopsis thaliana*

Das Expressionsmuster von *NIC1* wurde durch Promotor-*gusA* Fusionen in transgenen Pflanzen untersucht. Ausgehend vom BAC-Klon AL031018, welcher das *NIC1*-Gen enthält, wurden zwei 946 bzw. 1857 bp große Fragmente aus dem Promotorbereich des Gens ausgewählt, durch PCR aus genomischer DNA von *A. thaliana* (Ökotyp C24) amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen konnten die erwarteten Identitäten der klonierten Fragmente bestätigt werden. Es folgte die Subklonierung der beiden Promotorfragmente in den Vektor pCAMBIA1303, in welchem sie den CaMV35S-Promotor vor dem *gusA*-Gen ersetzen (Abb. III.32.).

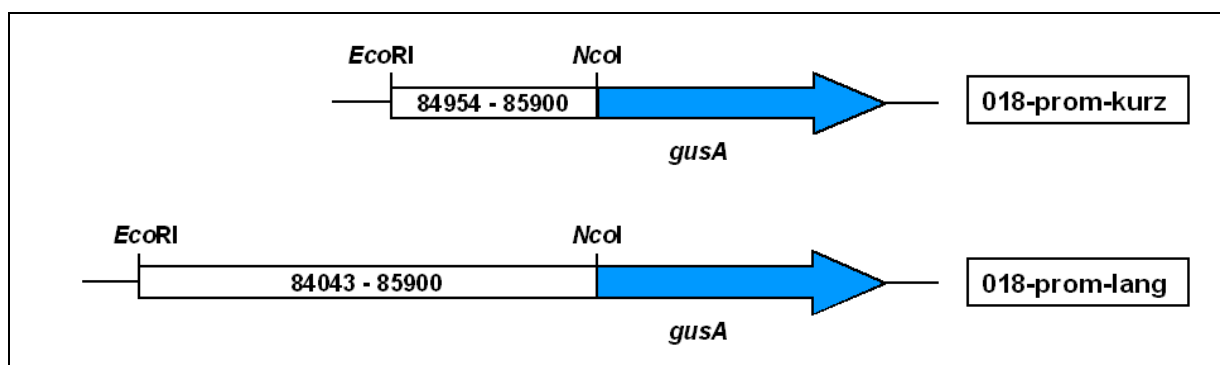


Abb. III.33. Klonierung von zwei *NIC1*-Promotorfragmenten in pCAMBIA1303

Zwei Fragmente aus dem DNA-Bereich direkt vor dem Startcodon des *NIC1*-Gens (von Base 85901 bis 85903 in BAC AL031018) wurden vor das *gusA*-Gen im Vektor pCAMBIA1303 kloniert. Auch die Nummerierung der beiden Fragmente leitet sich von BAC AL031018, welcher diesen Bereich von Chromosom 4 abdeckt, ab. Das Konstrukt „018-prom-kurz“ enthielt dabei eine DNA-Sequenz mit der Länge von 946 bp (84954 bis 85900) und „018-prom-lang“ war 1857 bp groß (84043 bis 85900). Die *EcoRI*- und *NcoI*-Schnittstellen wurden den Promotorfragmenten während ihrer Amplifikation aus genomischer DNA angefügt.

Die beiden Konstrukte „018-prom-kurz“ und „018-prom-lang“ wurden mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* (Ökotyp C24) transformiert und anschließend die Samen der transformierten Pflanzen auf Hygromycin-haltigem Medium selektiert. Vierzehn Primärtransformanten konnten identifiziert werden. Erneut selektierte Samen dieser vierzehn Linien dienten zur Anzucht von Pflanzen, die von der Keimung bis zur Samenreife auf gewebespezifische GUS-Aktivität hin untersucht wurden. In elf der vierzehn Linien konnte GUS-Expression beobachtet werden. Die *NIC1*-Promotor vermittelte Expression von *gusA* wurde im Wurzelbereich, in den Stengeln und in den Blättern detektiert. In den Blüten und Schoten war keine Blaufärbung zu beobachten. Das GUS-Expressionsmuster ist in Abbildung III.34. zusammengefasst.

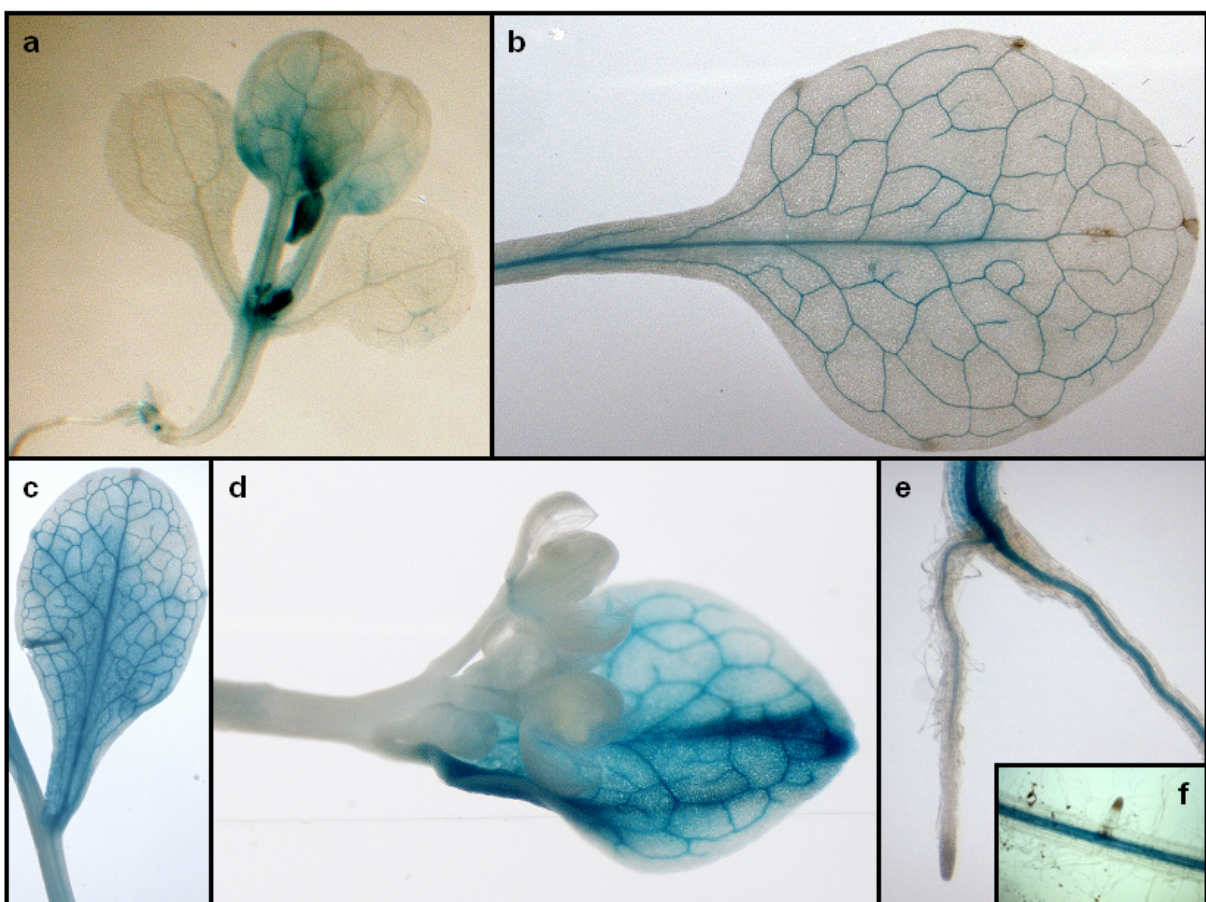


Abb. III.34. *NIC1*-Promotor vermittelte Expression von GUS in transgenen Pflanzen

In jungen Pflanzen (a) war die GUS-Färbung hauptsächlich im Bereich der Blattstiele und an der Blattbasis lokalisiert. In älteren Blättern zeigte sich GUS-Aktivität in den Blattadern und im vaskulären Gewebe des Blattstiels (b). Auch bei Stengelblättern war die GUS-Färbung in den Blattadern aller Blattbereiche detektierbar (c). In jungen Stengelblättern waren zusätzlich Bereiche der Blattspitze deutlich blau gefärbt (d). Die *NIC1*-Aktivität in den Wurzeln war bei jungen Pflanzen (e) auf den Zentralzylinder beschränkt. Zur Wurzelspitze hin nahm die Färbung dieses Bereiches stetig ab (e). In sehr jungen Seitenwurzeln älterer Pflanzen war keine GUS-Aktivität vorhanden (f) und auch ältere Gewebe im Bereich der Hauptwurzel zeigten keine Blaufärbung. In Blüten (d) und Schoten (nicht dargestellt) konnte zu keinem Zeitpunkt GUS-Aktivität festgestellt werden.

Von den vierzehn selektierten Primärtransformanten enthielten neun Linien das Konstrukt 018-prom-kurz und fünf Linien das Konstrukt 018-prom-lang. GUS-Aktivität konnte in sieben Linien von 018-prom-kurz und vier Linien von 018-prom-lang detektiert werden. Die aktiven Linien unterschieden sich zum Teil in den Intensitäten der jeweiligen GUS-Färbungen (nach zwölfstündiger Inkubation in der Färbelösung), die GUS-Expressionsmuster waren aber für alle aktiven Linien von 018-prom-kurz und 018-prom-lang gleich.

Die Promotorfragmente von *NIC1* wurden auch in der PLACE-Datenbank (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements; www.dna.affrc.go.jp/PLACE) analysiert. Es fanden sich dabei keine deutlichen Motive, die einen ersten Hinweis auf eine mögliche Regulation der Genexpression gegeben hätten.

III.2.4.2. Veränderung der *NIC1*-Genaktivität in *Arabidopsis thaliana*

Zur Untersuchung der *NIC1*-Funktion wurden neben der heterologen Expression des Gens in *X. laevis* Oozyten und Hefen auch transgene Pflanzen erzeugt, in denen die Genaktivität von *NIC1* erhöht (III.2.4.2.1) oder verringert (III.2.4.2.2) werden sollte. Die *NIC1*-cDNA wurde dazu in einem ersten Schritt in „sense“- und „antisense“-Orientierung in den Vektor pCAMBIA1302 hinter den CaMV35S-Promotor kloniert. Die beiden Konstrukte, die zur Erhöhung oder Verringerung des *NIC1*-Transkriptgehalts *in planta* eingesetzt wurden, sind in Abbildung III.35. skizziert.

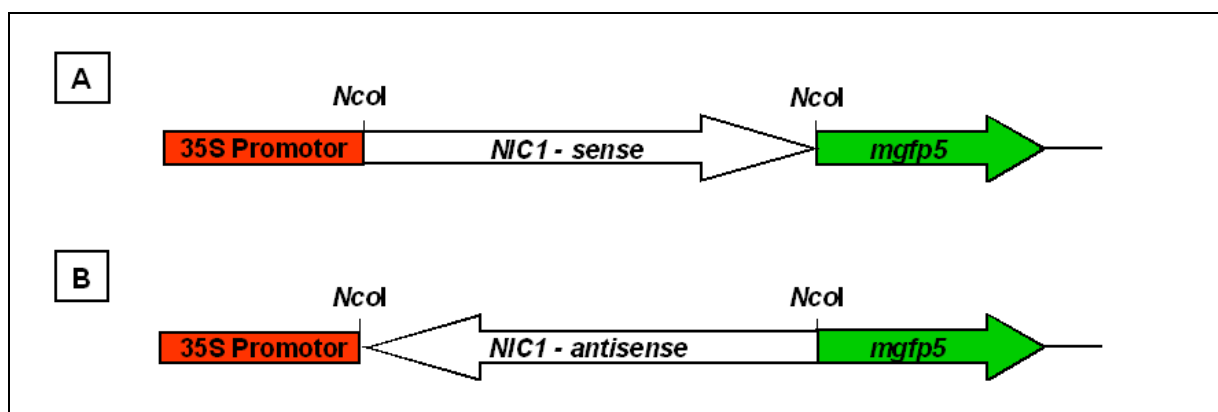


Abb. III.35. Klonierung von *NIC1* in „sense“- und „antisense“-Orientierung in pCAMBIA1302

Die *NIC1*-cDNA wurde in einer PCR mit den Primern 018-*Nco*-for und 018-*Nco*-rev amplifiziert. In dieser Reaktion wurden *NcoI*-Schnittstellen an beide Enden des PCR-Produkts angefügt. Das entstandene Fragment enthielt kein Stopcodon am 3'-Ende der cDNA mehr und wurde ungerichtet über die *NcoI*-Schnittstelle in den Vektor pCAMBIA1302 kloniert. Mittels Restriktionsanalysen konnten Konstrukte mit *NIC1* in sense-Orientierung (A; pCAMBIA1302::*NIC1*-sense) und antisense-Orientierung (B; pCAMBIA1302::*NIC1*-antisense) identifiziert werden. Sie wurden mittels *A. tumefaciens* in *A. thaliana* (Ökotyp C24) transferiert.

Die Klonierung von *NIC1* in sense-Orientierung führte in pCAMBIA1302 zu einer Fusion der cDNA mit dem *mgfp5*-Gen des Vektors. Ziel dieses Experimentes war neben der Überexpression auch die subzelluläre Lokalisation des NIC1-mGFP5-Fusionsproteins. In diesem und anderen Ansätzen zeigte sich allerdings, dass das vom Vektor pCAMBIA1302 kodierte mGFP5 nicht funktional war (persönliche Mitteilungen C. Sohlenkamp, B. Dolniak, M. Kursawe). Trotzdem ermöglichte es die Fusion von *NIC1* an *mgfp5*, das endogene *NIC1*-Transkript (ca. 1500 Nukleotide groß) vom *NIC1-mgfp5*-Transkript (ca. 2300 Nukleotide groß) zu unterscheiden. Diese Unterscheidung war auch in den transgenen Pflanzen, die mit pCAMBIA1302::*NIC1*-antisense transformiert worden waren, möglich.

Nach der Transformation von *A. thaliana* (Ökotyp C24) mit den Konstrukten pCAMBIA1302::*NIC1*-sense oder pCAMBIA1302::*NIC1*-antisense wurden jeweils zwanzig Primärtransformanten aufgrund ihrer Hygromycinresistenz identifiziert und bis zur Samenreife kultiviert. Aus der Transformation mit dem Konstrukt pCAMBIA1302::*NIC1*-sense hervorgegangene Pflanzen wurden im Folgenden S-Linien genannt. Dementsprechend stammten vom Konstrukt pCAMBIA1302::*NIC1*-antisense die zwanzig AS-Linien ab. Pro S- und AS-Linie wurden in der nächsten Generation jeweils zehn unselektierte Tochterpflanzen (insgesamt 200 F1-Pflanzen der S-Linien und 200 F1-Pflanzen der AS-Linien) parallel zum Wildtyp von *A. thaliana* (Ökotyp C24) auf Erde kultiviert.

Im Verlauf des Wachstums der 200 Tochterpflanzen der zwanzig S-Linien zeigten sechs Pflanzen (von vier S-Linien) im Vergleich zum parallel kultivierten Wildtyp ein verändertes Wachstumsverhalten. Die sechs Pflanzen entwickelten sich deutlich langsamer, blieben in ihrer Schotenbildung zurück und wuchsen zum Teil viel gedrungener als der Wildtyp. Von ihnen wurde Stengel-RNA isoliert und im RNA-Blot auf den *NIC1*-Transkriptgehalt hin untersucht. Nur in einer der sechs Pflanzen (#33 von Linie S100) war das *NIC1-mgfp5* Transkript detektierbar. Für #33 zeigte sich im RNA-Blot außerdem ein Signal in der Größe von ca. 1500 Nukleotiden (entspricht der Größe des *NIC1*-Transkriptes) und ein Signal in der Größe von ca. 500 Nukleotiden. Vermutlich handelte es sich hierbei um Degradationsprodukte der *NIC1*- und/oder *NIC1-mgfp5*-Transkripte. In einer weiteren untersuchten Pflanze (#8 von Linie S61) zeigte sich im RNA-Blot neben einem schwachen Signal vom *NIC1*-Transkript nur noch ein starkes Signal in der Größe von ca. 500 Nukleotiden. Vermutlich wiesen die Pflanzen #33 und #8 graduell unterschiedliche Ausprägungen von *NIC1-mgfp5* induzierter Cosuppression auf. Die beobachteten Phänotypen waren deshalb nicht auf eine Erhöhung, sondern auf eine Verringerung des funktionellen *NIC1*-Transkriptgehalts zurückzuführen.

Auch die weiteren vier untersuchten Pflanzen (#3 und #12 von Linie S7; #2 und #30 von Linie S52) stützten die Annahme, dass die beobachteten Phänotypen mit einer Verminderung des *NIC1*-Transkriptgehalts zusammenhingen. In der Stengel-RNA dieser vier Pflanzen waren zwar noch *NIC1*-Transkripte detektierbar, der Transkriptgehalt war aber im Vergleich zum parallel untersuchten Wildtyp stark vermindert. In Abbildung III.36. werden die Phänotypen der Pflanzen #3 (Linie S7), #12 (Linie S7), #2 (Linie S52) und #30 (Linie S52) und die Ergebnisse der jeweiligen RNA-Blot Analysen dargestellt.

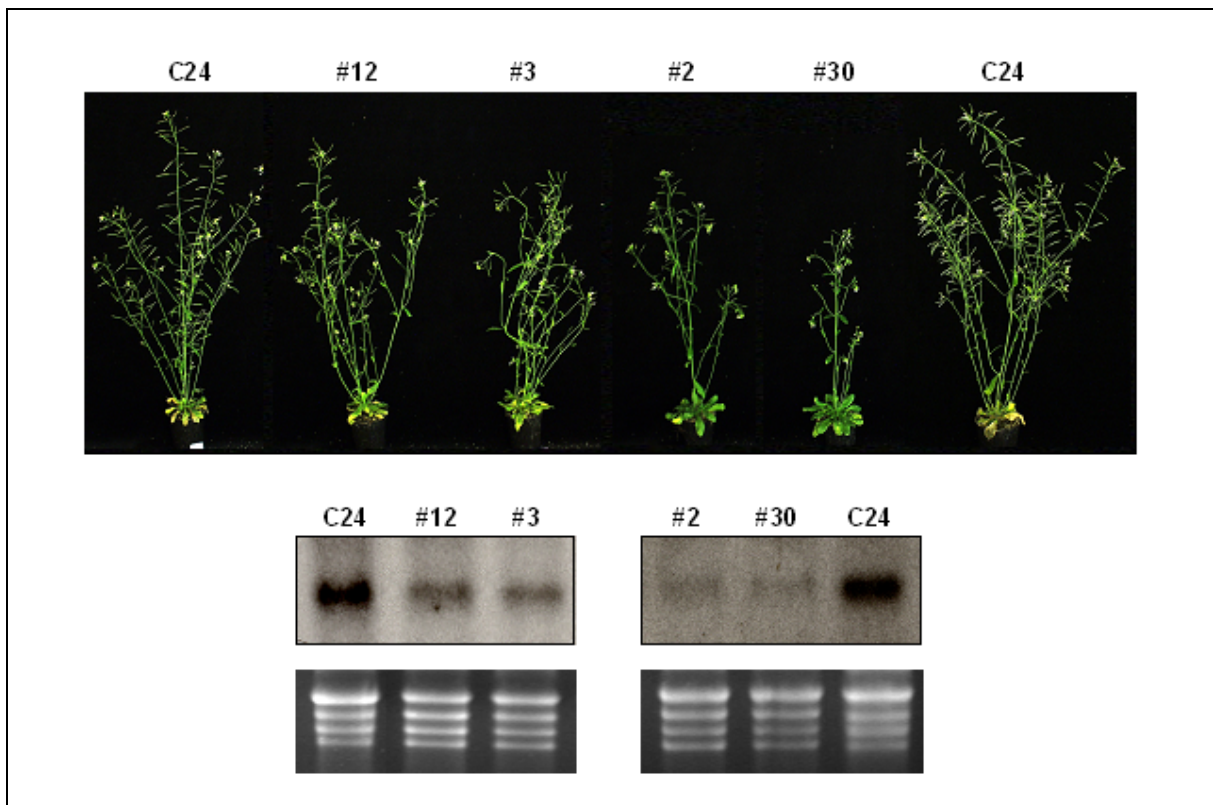


Abb. III.36. Phänotypen und RNA-Blot Analysen der Pflanzen #12, #3 (Linie S7) und #2, #30 (Linie S52)

Die Pflanze #12 (Linie S7) wies gegenüber dem Wildtyp nur ein leicht vermindertes Wachstum auf, war aber verlangsamt in ihrer Schotenbildung. Deutlicher wurden die Unterschiede zum Wildtyp für Pflanze #3 (Linie S7). Die Untersuchung des *NIC1*-Transkriptgehalts der beiden Pflanzen zeigte eine deutlich Reduktion des Signals von *NIC1* (bei ca. 1500 Nukleotiden). In der Größe von *NIC1-gfp5* (ca. 2300 Nukleotide) war kein Signal detektierbar. Die Pflanzen #2 und #30 aus Linie S52 zeigten im RNA-Blot einen kaum noch detektierbaren *NIC1*-Transkriptgehalt. Die beiden Pflanzen unterschieden sich deutlicher vom Wildtyp als #12 und #3. Sie besaßen nur wenige Seitensprosse, sehr jung aussehende Rosettenblätter und kaum Schoten.

Während die vier Tochterpflanzen der Linien S7 und S52 besonders durch eine verlangsamte Entwicklung auffielen, zeitversetzt aber ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp zeigten, konnte man bei den beiden Pflanzen #33 (Linie S100) und #8 (Linie S61) ein noch deutlicher vom Wildtyp abweichendes Wachstumsverhalten beobachten. Die Pflanze #33 fing etwa zur gleichen Zeit wie der parallel kultivierte Wildtyp mit der Entwicklung von Stengel und Blüten an, besaß aber schon zu diesem Zeitpunkt eine deutlich

gedrungene Blattrosette als der Wildtyp. Dieser Phänotyp verstärkte sich in den nächsten Wochen noch (siehe Abb. III.37.A.). Den deutlichsten Phänotyp von allen untersuchten 200 Tochterpflanzen der 20 S-Linien zeigte Pflanze #8 (Linie S61). Die Phänotypen von #33 und #8 und die Ergebnisse der entsprechenden RNA-Blot Experimente sind in Abbildung III.37. dargestellt.

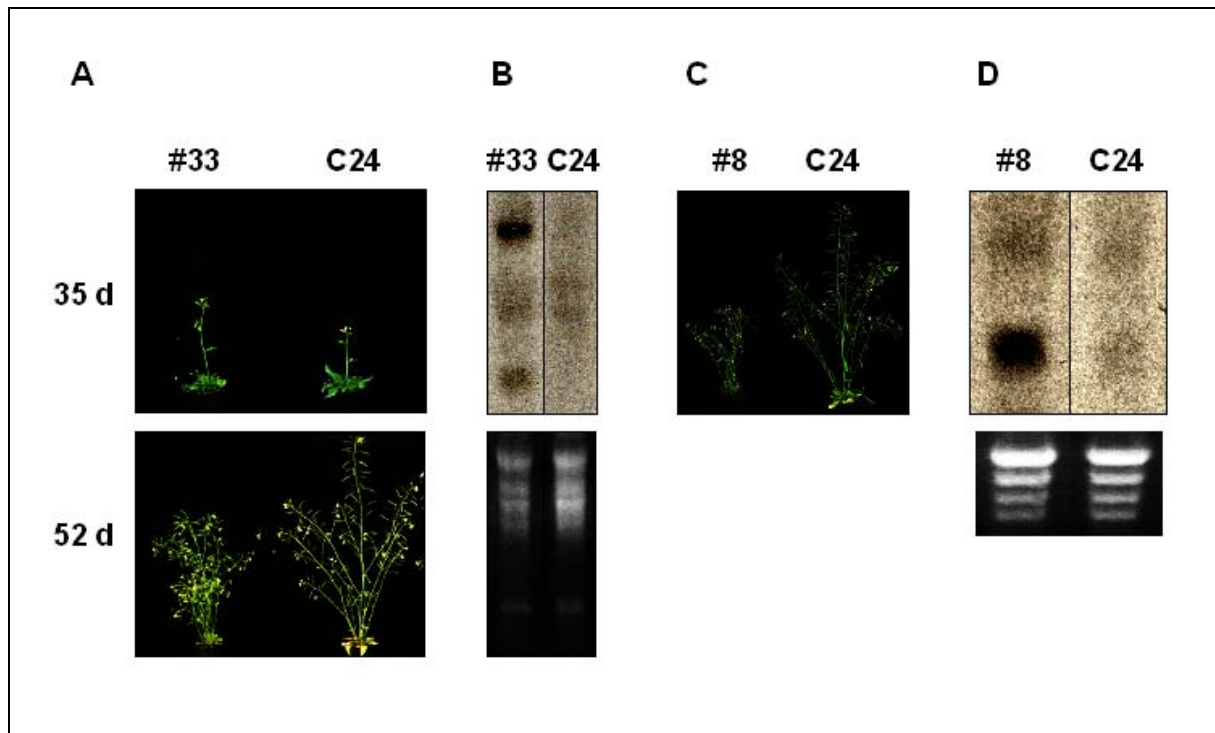


Abb. III.37. Phänotyp und RNA-Blot Analyse der Pflanzen #33 (Linie S100) und #8 (Linie S61)

A. Die Pflanze #33 aus Linie S100 begann fast zum gleichen Zeitpunkt mit Spross- und Blütenbildung wie der Wildtyp, zeigte aber zu diesem Zeitpunkt (35 d) schon eine kleinere Blattrosette. In den folgenden Wochen entwickelte sich #33 gedrungener und blieb in ihrem Wachstum deutlich hinter dem Wildtyp zurück (siehe Vergleich der Pflanzen bei 52 d).

B. Im RNA-Blot war für Pflanze #33 das Signal von *NIC1-gfp5* zu erkennen (oberste Bande von #33). Das Signal für *NIC1* war deutlich schwächer und deshalb quantitativ nicht eindeutig vom ebenfalls schwachen Signal des Wildtyps zu unterscheiden (mittlere Bande von #33 und wt). Auffällig war das Auftreten eines Signals in der Größe von ca. 500 Nukleotiden (unterste Bande von #33). Im unteren Teil der Abbildung ist als Ladungskontrolle die ribosomale RNA nach Auftrennung der RNA im Agarosegel dargestellt.

C. Die Pflanze #8 aus Linie S61 wuchs sehr gedrungen und zeigte von allen untersuchten Pflanzen den auffälligsten Phänotyp.

D. In der Stengel-RNA von Pflanze #8 ließ sich als dominante Bande nur noch das Signal bei circa 500 Nukleotiden detektieren. Sowohl beim Wildtyp als auch bei #8 war das Signal des *NIC1*-Transkripts sehr schwach vorhanden (jeweils die obere Banden). Der untere Teil der Abbildung zeigt als Ladungskontrolle die ribosomale RNA nach Auftrennung der RNA im Agarosegel.

Die RNA-Blot Analysen der sechs Tochterpflanzen der Linien S7, S52, S61 und S100 zeigten keinen erhöhten *NIC1*-Transkriptgehalt, sondern nur eine Verringerung der *NIC1*-mRNA (#2, #3, #12, #30) oder das Auftreten von Degradationsprodukten (#8, #33). Die

beobachteten Phänotypen der sechs Pflanzen waren deshalb vermutlich auf eine Verminderung von funktionalem *NIC1*-Transkript zurückzuführen. Um so erstaunlicher war, dass von den 200 getesteten F1-Pflanzen der zwanzig AS-Linien keine Pflanze einen vergleichbaren Phänotyp zeigte. Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der *NIC1*-Genaktivität und der Entwicklung von *A. thaliana* wurde für dieses Gen im Vektor pJawohl8 ein *NIC1*-spezifisches RNAi-Konstrukt hergestellt. Das Konstrukt wurde in *A. thaliana* transformiert und wird parallel mit weiteren *NIC*-RNAi Konstrukten im Rahmen der Doktorarbeiten von Mandy Kursawe, Blazej Dolniak und Fabien Poree untersucht.

Zur detaillierteren Charakterisierung der S-Linien wurden Tochterpflanzen der Linien S7, S52, S61 und S100 in der Gewebekultur auf ihre Salz- und Ethionintoleranz hin untersucht. Es sollte getestet werden, ob ein verminderter *NIC1*-Gehalt diese Toleranz beeinflusst. Die heterologe Expression von *NIC1*, *NIC2* und *NIC4* in *S. cerevisiae* hatte Hinweise geliefert, dass die *NIC*-Proteine am Transport von monovalenten Kationen beteiligt sein können. Aus der Literatur war außerdem bekannt, dass die *MATE*-Proteine *NorM* und *ETR1* am Transport von Lithium, Natrium und/oder Ethionin beteiligt sind (die entsprechenden Literaturangaben und das Substratspektrum der beiden Proteine findet sich in Tab.IV.1. der Diskussion). Bei der Kultivierung von jeweils zehn F1-Pflanzen pro S-Linie auf Medien mit Lithiumchlorid (10, 20 und 30 mM), Natriumchlorid (50, 100, 150 und 200 mM) und Ethionin (15 µM und 30 µM) zeigten sich keine Unterschiede zu parallel getesteten Kontrollpflanzen (*A. thaliana*, Ökotyp C24).

III.2.5. T-DNA Insertionsmutanten von *MATE*-Genen aus *Arabidopsis thaliana*: Kultivierung und erste Charakterisierung von neun GABI-KAT Linien

Neben der Untersuchung von Pflanzen mit *NIC1*-sense, *NIC1*-antisense oder *NIC1*-RNAi Konstrukten wäre ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der *NIC1*-Funktion *in planta* die Analyse von „Knock-out“ Linien, in denen durch eine T-DNA Insertion das *NIC1*-Gen inaktiviert ist. Eine entsprechende Linie wurde kürzlich von Mandy Kursawe identifiziert und wird im Rahmen ihrer Doktorarbeit charakterisiert.

Eine Suche im Winter 2002 ergab, dass in der GABI-KAT Datenbank für neun *MATE*-Gene Insertionsmutanten verfügbar waren. Für die Gene At1g71870 (*NIC2*), At1g15170, At1g33090, At1g51340, At2g04050, At4g38380, At4g21900, At5g44050 und At5g52450 (siehe Abbildung III.19. für eine Gruppierung der *MATE*-Sequenzen aus *A. thaliana*) wurden die Samen der entsprechenden Insertionsmutanten bestellt und ohne Selektion auf Erde angezogen. Pro Linie wurden anschließend zwanzig F1-Pflanzen pikiert und bis zur Samenreife mit parallel kultiviertem Wildtyp (Ökotyp Columbia) verglichen. Bei drei von zwanzig Pflanzen der Linie D12 (T-DNA Insertionsmutante von Gen At4g38380) zeigte sich

ein stark verändertes Wachstum. Die Pflanzen waren sehr klein, wuchsen gedrunen und zeigten keine Differenzierung in Blätter und Stengel. Der beobachtete Phänotyp wies starke Parallelen zum „Cabbage“ Phänotyp von Pflanzen, in denen die Brassinosteroid vermittelte Signaltransduktion gestört ist, auf. In Abbildung III.38. ist der Phänotyp der drei betroffenen Pflanzen (#1, #7 und #11) im Vergleich zum parallel kultivierten Wildtyp (Ökotyp Columbia) dargestellt.



Abb. III.38. Phänotypen der Pflanzen #1, #7 und #11 (F1-Pflanzen der Linie D12)

Von den zwanzig getesteten F1-Pflanzen der Linie D12 (GABI-KAT Insertionsmutante von At4g38380) zeigten die drei Pflanzen #1, #7 und #11 bei Kultivierung auf Erde ein stark verändertes Wachstum. Sie entwickelten sich nicht wie der parallel kultivierte Wildtyp (Col.), sondern blieben sehr klein und gedrunen. Eine Differenzierung in Blattrosette und Stengel war nicht zu erkennen. Die drei Pflanzen erinnerten an „Cabbage“ Mutanten mit gestörter Brassinosteroid Signaltransduktion.

Von den drei Pflanzen #1, #7 und #11, aber auch von den siebzehn weiteren D12-Tochterpflanzen, die sich wie die Kontrollpflanzen entwickelten, wurde die genomische DNA isoliert. In anschließenden PCR-Analysen wurde untersucht, ob die Pflanzen zwei, eine oder keine T-DNA Insertion in den beiden Allelen von At4g38380 besaßen. Die in den PCR-Reaktionen eingesetzten Primer D12-for und D12-rev waren auf Bereiche vor und hinter der T-DNA Insertion abgelegt (bekannt durch die Sequenzierung der „flankierenden Sequenzen“ im GABI-KAT Ressourcenzentrum). Als dritter Primer wurde T-DNA-rev, welcher auf einen Bereich der T-DNA abgelegt war, eingesetzt. In den PCR-Reaktionen mit diesen drei Primern waren folgende Signale zu detektieren:

- Bei T-DNA Insertionen in beiden Allelen von At4g38380 kam es nur zu PCR-Signalen von D12-for / T-DNA-rev. Die zu erwartenden Fragmente hatten eine Größe von ca. 350 bp.
- Bei einer Insertion der T-DNA in nur ein Allel von At4g38380 kam es zu PCR-Signalen von D12-for / T-DNA-rev und D12-for / D12-rev. Die zu erwartenden Fragmente hatten eine Größe von ca. 350 bp und ca. 900 bp.
- Bei Pflanzen, die zwei intakte Allele von At4g38380 besaßen, kam es nur zu PCR-Signalen von D12-for / D12-rev. Die zu erwartenden Fragmente hatten eine Größe von ca. 900 bp.

Es zeigte sich, dass nur die drei Pflanzen mit dem „Cabbage“ Phänotyp (#1, #7 und #11) T-DNA Insertionen in beiden Allelen von At4g38380 besaßen. Neun weitere Pflanzen waren heterozygot bezüglich der T-DNA Insertion, sieben Pflanzen besaßen zwei intakte Allele und für eine Pflanze waren keine PCR-Signale detektierbar (#9). Die Ergebnisse der PCR-Analyse der zwanzig D12-Tochterpflanzen sind in Abbildung III.39. dargestellt.

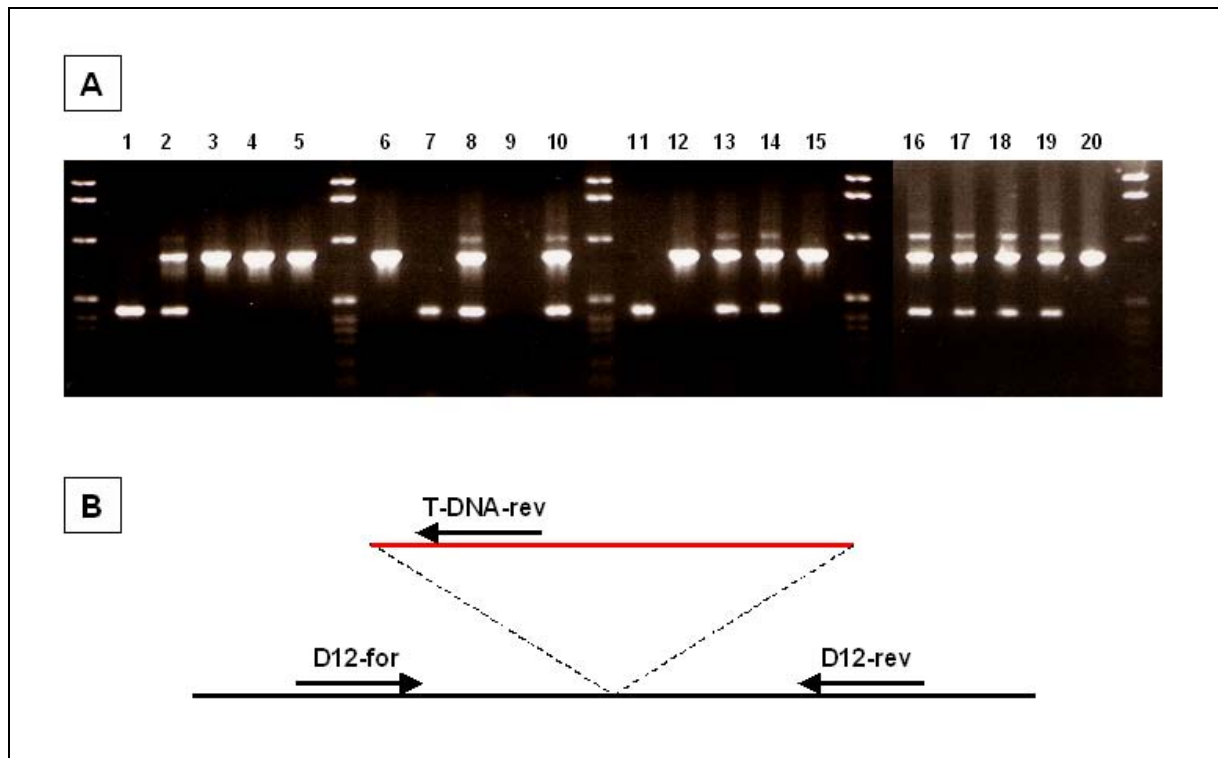


Abb. III.39. Vorgehensweise und Ergebnisse der PCR-Analyse von F1-Pflanzen der Linie D12

Die Untersuchung der genomischen DNA von zwanzig D12-Tochterpflanzen mittels PCR und den Primern D12-for, T-DNA-rev und D12-rev (B) zeigte, dass sich mit dieser Methode die möglichen Genotypen der F1-Generation detektieren ließen (A). Pflanzen, die bezüglich der T-DNA Insertion in At4g38380 homozygot waren, zeigten das erwartete PCR-Produkt von ca. 350 bp Länge (#1, #7 und #11). Bei Pflanzen, die bezüglich dieser T-DNA Insertion heterozygot waren, war zusätzlich zur Bande bei 350 bp ein Fragment in der Größe von ca. 900 bp detektierbar (Linien #2, #8, #10, #13, #14, #16, #17, #18, #19). Die Pflanzen #3, #4, #5, #6, #12, #15 und #20 zeigten nur das große Fragment von ca. 900 bp. In ihnen besaß keines der zwei Allele von At4g38380 eine T-DNA Insertion.

Das Auftreten des „Cabbage“ Phänotyps in den D12-Pflanzen #1, #7 und #11 erinnerte stark an Mutanten, in denen die Brassinosteroid vermittelte Signaltransduktion gestört ist. In einem nächsten Ansatz wurden deshalb F1-Pflanzen der Linie D12, die den „Cabbage“ Phänotyp aufwiesen, mit Brassinolid besprüht. Es sollte getestet werden, ob die externe Gabe dieses Phytohormons einen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Pflanzen hat. Auf Erde wurden erneut Samen der Linie D12 kultiviert und alle Pflanzen mit dem Phänotyp des Wildtyps ausselektiert. Zurück blieben fünf Pflanzen des „Cabbage“ Phänotyps (siehe Abb. III.40.). Zwei dieser Pflanzen wurden mit der Brassinolidlösung besprüht und drei Pflanzen bei dieser Behandlung durch umgestülpte Gefäße abgedeckt. Sie dienten als Negativkontrolle. Schon

nach 24 h war ein positiver Effekt der Brassinolid-Behandlung zu beobachten. Die zwei behandelten Pflanzen zeigten ein deutliches Wachstum und die Entwicklung von Blättern. Dieser Wachstumseffekt verstärkte sich in den folgenden Tagen noch. In Abbildung III.40. sind die Auswirkungen der Brassinolidbehandlung auf das Wachstum der Pflanzen dargestellt.

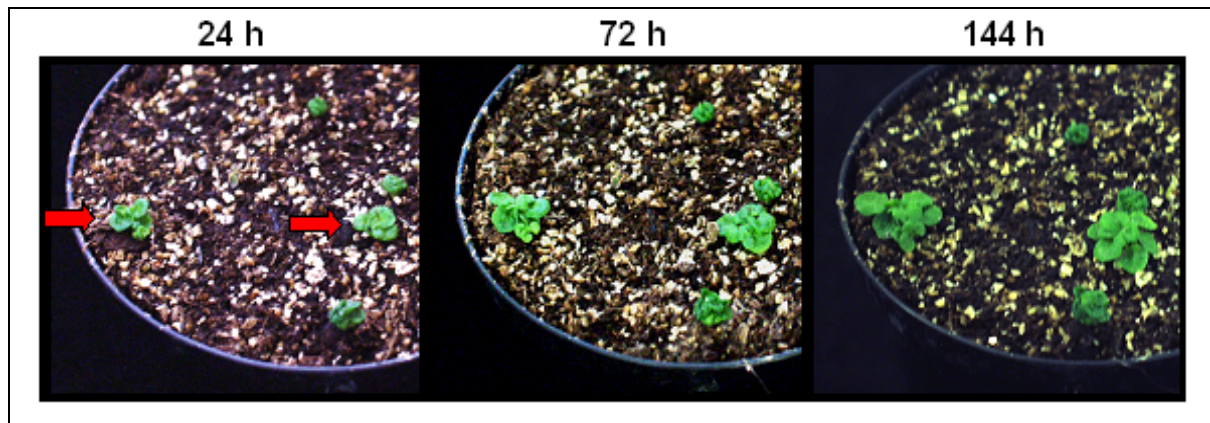


Abb. III.40. Brassinolidbehandlung von F1-Pflanzen der Linie D12

Zwei F1-Pflanzen (rote Pfeile) der Linie D12, die den „Cabbage“ Phänotyp aufwiesen, wurden mit Brassinolid besprüht. Drei parallel dazu kultivierten F1-Pflanzen mit dem gleichen Phänotyp wurden während der Brassinolidbehandlung durch Plastikgefäße abgedeckt und der Phytohormonbehandlung entzogen. Deutlich erkennbar ist schon nach 24 h das hellere Grün und der veränderte Wuchs der behandelten zwei Pflanzen. Dieser Effekt verstärkte sich in den nächsten Tagen noch (siehe 72 h und 144 h). Die drei unbehandelten Pflanzen zeigten dagegen kein verändertes Wachstum.

Die Möglichkeit, die F1-Pflanzen mit dem „Cabbage“ Phänotyp durch Brassinolidbehandlung in ihrem Wachstum zu beeinflussen, wurde zur weiteren Kultivierung der drei Pflanzen #1, #7 und #11 genutzt. Durch mehrmaliges Besprühen mit Brassinolid konnte die Ausbildung von Stengeln, Blüten und Schoten induziert werden. Es war möglich, von zwei der drei Pflanzen fertile Samen zu gewinnen. Alle Pflanzen der F2-Generation besaßen erwartungsgemäß den „Cabbage“ Phänotyp. PCR-Analysen konnten zeigen, dass sie bezüglich der T-DNA Insertion in Gen At4g38380 homozygot waren.

Auch von den jeweils zwanzig F1-Pflanzen der acht weiteren GABI-KAT Linien wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR analysiert. Keine der 160 untersuchten Pflanzen zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie die Pflanzen #1, #7 und #11 von Linie D12 oder die Pflanzen mit vermindertem *NIC1*-Transkriptgehalt. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit wurden die weiteren Analysen der neun GABI-KAT Linien von Mandy Kursawe, Fabien Poree und Blazej Dolniak im Rahmen ihrer Doktorarbeiten durchgeführt.

IV. Diskussion

Die Diskussion ist, wie die Einleitung und der Ergebnisteil, in zwei Teile gegliedert. Der erste Abschnitt (IV.1.) geht auf die Ergebnisse zu den PP1-/PP2A-Genen ein und im zweiten Abschnitt (IV.2.) werden die Ergebnisse zu den NIC-Membranproteinen analysiert.

IV.1. Charakterisierung der PP-Gene *TOPP1*, *TOPP2*, *TOPP5*, *STH1* und *STH2*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es Hinweise, dass *TOPP2* präferenziell in den Schließzellen der Blätter von *A. thaliana* exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde die Expression dieses PP-Gens untersucht und seine Genaktivität *in planta* vermindert. Die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden zwei Abschnitten (IV.1.1. und IV.1.2.) diskutiert. Die Charakterisierung weiterer PP-Gene aus *A. thaliana* schloss sich den *TOPP2*-Experimenten an und wird anschließend analysiert (IV.1.3. bis IV.1.7.).

IV.1.1. Expressionsanalyse von *TOPP2*

Die Arbeiten von Menke (1999) und Zähndler (2000) führten zur Selektion der zwei „Expressed Sequence Tags“ EST74 und J30. Die bei der Expressionsprofilierung gefundene EF-präferenzielle Expression der zwei entsprechenden Gene wurde im ersten Teil dieser Arbeit durch RNA-Blot Experimente überprüft (3.1.1.1.). Sie konnte nur zum Teil bestätigt werden. Beim Vergleich der Transkriptgehalte von EST74 in Gesamtblatt- und EF-RNA zeigte sich eine deutlich schwächere Expression in der EF-Fraktion (Abb.III.1.). Dieses Ergebnis war unabhängig von der Tageszeit und trat auch bei Verwendung einer Isoform-spezifischen Sonde aus dem 3'-UTR des Gens auf. Der Unterschied zwischen den Daten der Expressionsprofilierung und dem im RNA-Blot ermittelten Expressionsmuster erklärt sich möglicherweise durch die verschiedenen RNA-Präparationen, die für die jeweiligen Experimente genutzt wurden. Obwohl die Pflanzen im Gewächshaus unter gleichen Bedingungen wuchsen, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sie zum Zeitpunkt der RNA-Präparation unterschiedlichen abiotischen oder biotischen Umweltbedingungen ausgesetzt waren. Diese führten möglicherweise zur veränderten Expression der durch EST74 repräsentierten PK.

Die RNA-Blot Experimente für den EST J30 (repräsentierte *TOPP2*) zeigten eine Übereinstimmung mit den Daten der Expressionsprofilierung. Sowohl mit dem gesamten EST (J30 umfasst die ganze kodierende Region von *TOPP2*), als auch mit der Isoform-spezifischen Sonde (der 3'-UTR des Gens) konnte eine präferenzielle Expression in der EF-Fraktion beobachtet werden. Die Übereinstimmung der gefundenen Expressionsmuster führte zu dem Entschluss, für *TOPP2* eine Expressionsanalyse auf zellulärer Ebene mittels

Promotor-*gusA* Fusionen durchzuführen (3.1.1.2.). Es zeigte sich, dass die *TOPP2*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität in den transgenen Pflanzen vor allem in vaskulären Geweben von Wurzeln, Stengeln und Blättern detektierbar war. In den älteren Blättern waren neben den Blattadern auch die Hydathoden blau gefärbt. Die Pflanzen zeigten zu keinem Entwicklungsstadium *TOPP2*-Expression in den Schließzellen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Präparationsmethode der EF. So beginnt diese Präparation mit der Zerkleinerung von Blattmaterial im „Warring Blendor“. Im anschließenden Filtrierschritt werden dann die Zelltrümmer „sensiblerer“ Gewebe von den robusten Schließzellen abgetrennt. Obwohl die Schließzellen die Hauptfraktion der EF-Präparation bilden (Kopka *et al.*, 1997), bleiben auch Zellen des vaskulären Gewebes und der Epidermis während dieser Prozedur intakt. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass auch Transkripte dieser Zelltypen angereichert werden und die hohe Anzahl von *TOPP2*-Transkripten in der EF-Fraktion eine methodische Ursache hat. Ein hoher Transkriptgehalt in EF wäre folglich zwar ein notwendiges, aber kein ausreichendes Kriterium zur Isolation Schließzell-spezifischer Gene. Zur Expressionsanalyse aller weiteren in dieser Arbeit untersuchten Gene wurden deshalb transgene Pflanzen mit Promotor-*gusA* Fusionen hergestellt.

IV.1.2. Analyse der *TOPP2*-RNAi Pflanzen

Parallel zur Expressionsanalyse von *TOPP2* wurden transgene Pflanzen hergestellt, in denen mit Hilfe eines *TOPP2*-RNAi Konstruktes die Aktivität dieser PP-Isoform herabgesetzt werden sollte (III.1.1.3.). Bei der Analyse von dreißig Transformanten zeigte sich in sieben Linien eine deutlich veränderte Blattmorphologie (Abb.III.5.). Die Blätter waren „engerollt“, asymmetrisch entwickelt oder zur Mittelrippe hin vertieft. In anschließenden RNA-Blot Experimenten fand sich in allen Linien mit verändertem Blattphänotyp auch ein deutlich verminderter *TOPP2*-Transkriptgehalt (Abb.III.6.).

Möglicherweise bieten Studien zur heterologen Expression von *TOPP2* in *S. cerevisiae* und *S. pombe* eine Erklärung dieses Phänotyps. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass *TOPP2* die Funktion des PP-Gens *glc7* zum Teil übernehmen kann. GLC7 beeinflusst in den Hefen die Akkumulation von Glycogen und spielt eine Rolle in der Mitose. *TOPP2* konnte bei heterologer Expression die Funktion von GLC7 in der Mitose, nicht aber bei der Glycogenakkumulation ersetzen (Smith und Walker, 1996). In *S. pombe* komplementierte *TOPP2* die temperatursensitive Doppelmutante *cdc25^{ts}/wee⁻*, in der die Zellteilung während des Wachstums bei 37°C in der G2-Phase vor der Mitose arretiert war (Ferreira *et al.*, 1993). Obwohl der molekulare Mechanismus dieser Komplementation ungeklärt ist, deutet auch dieses Experiment auf eine wichtige Rolle von *TOPP2* bei der Zellteilung hin.

Nimmt man an, dass TOPP2 auch *in planta* an der Zellteilung beteiligt ist, so lässt sich die veränderte Blattmorphologie in den RNAi-Pflanzen möglicherweise durch eine gestörte Zellteilung in einigen Bereichen des Blattes erklären. Geht man außerdem davon aus, dass TOPP2 nicht gleichmäßig in allen Teilen des Blattes exprimiert wird (Hinweise liefern die Promotor-*gusA* Fusionen), so führt die Verminderung der TOPP2-Aktivität unter Umständen zu lokalen Störungen der Zellteilung. Folglich würden sich einige Blattbereiche normal, andere dagegen deutlich langsamer entwickeln.

Die Suche nach Studien, in denen vergleichbare Blattphänotypen auftraten, führte zu den Experimenten von Wyrzykowska *et al.* (2002), in denen das PP-Gen *cdc25* aus *S. pombe* unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors in *Nicotiana tabacum* exprimiert wurde. In definierten Bereichen des sich entwickelnden Blattes konnte dabei durch Applikation von Anhydrotetracyclin-haltigen Lanolinplättchen die Expression von *cdc25* induziert werden. Die so behandelten Blätter zeigten anschließend große Ähnlichkeit zum Phänotyp der TOPP2-RNAi Pflanzen. Möglicherweise führten die *cdc25*-Expression und die RNAi-Inhibierung von TOPP2 trotz unterschiedlicher Herangehensweise zu sehr ähnlichen Phänotypen, da in beiden Ansätzen lokal die Konzentrationen von PPs, die eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielen, verändert wurden. Falls die Hypothese zutrifft, dass eine lokale Verstärkung oder Verminderung der Zellteilungsrate zu ähnlichen Blattphänotypen führen kann, stellt sich die Frage, warum die Reduktion des TOPP2-Transkriptgehalts zu Asymmetrien im Blatt führt. Aus den beobachteten Expressionsmustern von TOPP2 lässt sich keine asymmetrische Verteilung der Genaktivität in den Blättern ableiten. Denkbar ist aber, dass das Gen nur zu einem frühen Stadium der Blattentwicklung asymmetrisch exprimiert wird. Zur Analyse dieser Fragestellung bieten die Promotor-*gusA* Linien die Möglichkeit, zu jedem Zeitpunkt der Blattentwicklung die TOPP2-Expression in histologischen Präparaten zu untersuchen. Weitere Literaturrecherchen zeigten, dass die beobachteten Blattphänotypen bei verminderter TOPP2-Expression nur geringe Ähnlichkeit mit den Phänotypen „*asymmetric leaves 1*“ (Byrne *et al.*, 2000) oder „*asymmetric leaves 2*“ (Semiarti *et al.*, 2001) besaßen.

In zukünftigen Studien könnte das TOPP2-RNAi Konstrukt mit einem Tetracyclin-induzierbaren Promotor in *A. thaliana* transformiert werden, um anschließend nur in definierten Bereichen eine RNAi-vermittelte Verminderung der TOPP2-Genexpression zu erzeugen. Mit der Methode von Wyrzykowska *et al.* (2002) könnte so untersucht werden, wie das lokale Herabsetzen der TOPP2-Konzentration den Blattphänotyp beeinflusst.

Eine ungeklärte Frage ist, warum in den anderen Geweben der Pflanze, in denen TOPP2 ebenfalls exprimiert wird (z.B. vaskuläres Gewebe des Stengels und Teile der Blüte), kein

veränderter Wuchs zu beobachten war. Es ist denkbar, dass eine Restaktivität von TOPP2 für normales Wachstum in diesen Geweben ausreichte oder dass TOPP2 durch eine andere PP funktionell ersetzt wurde. Zur Klärung dieser Fragen wäre es wichtig, Pflanzen mit komplett ausgeschalteter *TOPP2*-Genaktivität zu untersuchen. Eine entscheidende Voraussetzung für dieses Experiment ist allerdings, dass der komplette Verlust von TOPP2 nicht letal für die Pflanzen ist.

IV.1.3. Screeningansatz zur Identifikation von PP-Transkripten aus EF

Nach *TOPP2* wurden weitere PP-Gene auf ihre Schließzell-spezifische Expression hin untersucht. Mit Hilfe degenerierter Primer wurden Transkripte, die zu PP1 oder PP2A homolog waren, aus EF-mRNA isoliert (III.1.2.2.). Von den identifizierten PP-Genen wurden anschließend *TOPP1* (wegen der hohen Anzahl an Transkripten), *TOPP5* (wegen der engen Verwandtschaft zu *TOPP2*) und die beiden *sit4*-Homologe *STH1* und *STH2* ausgewählt, um mittels Promotor-*gusA* Fusionen die Expression auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Für den Verzicht auf eine Expressionsanalyse mittels RNA-Blot gab es zwei Gründe. So hatten die Experimente mit *TOPP2* gezeigt, dass eine präferenzielle Expression in EF nicht ausreicht, um eine Schließzell-spezifische Genexpression zu detektieren. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Schließzellen eines Blattes sehr individuelle Expressionsmuster aufweisen können (Mott *et al.*, 2000). So konnten z.B. Wang *et al.* (1998) zeigen, dass die Schließzellen der Blattoberseite und der Blattunterseite unterschiedlich auf die Gabe von ABA oder Kalzium reagierten. Die mögliche Variabilität einer Expression in Schließzellen wäre in RNA-Blot Experimenten nur schwer zu detektieren gewesen.

Im vorgestellten Screeningansatz konnten zwölf der 26 katalytischen PP1-/PP2A-Untereinheiten, die im Genom von *A. thaliana* kodiert werden, mittels degenerierter Primer aus EF-cDNA isoliert werden. Da es der gewählte Ansatz erlaubte, jeweils die kompletten 3'-UTRs der Gene zu klonieren, konnten die zum Teil sehr homologen Transkripte eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Transkripte von *STH1* und *STH2*, deren translatierte cDNA-Regionen zu 98 % übereinstimmen, konnten z.B. mit diesem Ansatz isoliert werden. Die Anzahl der verschiedenen cDNAs, die in diesem Ansatz gefunden wurden, war im Vergleich zu anderen Studien relativ hoch. Ferreira *et al.* (1992) fanden in einem Screeningansatz mit degenerierten Primern lediglich zwei verschiedene PP1-Transkripte in Blüten-RNA von *A. thaliana*. In einem anderen Experiment identifizierten Suh *et al.* (1998) in Blüten-RNA von *N. tabacum* die mRNAs von fünf PP1-/PP2A-Genen. Da in diesen beiden Studien und der vorliegenden Arbeit verschiedene cDNA-Präparationen eingesetzt wurden, lässt sich aus den Literaturdaten nicht die Effizienz der jeweils eingesetzten degenerierten Primer abschätzen. Für einen direkten Vergleich der verschiedenen Ansätze wäre es notwendig, alle Oligonukleotide an einer cDNA-Präparation zu testen.

IV.1.4. Charakterisierung der Expression von *TOPP1*

Die *TOPP1*-Promotor vermittelte GUS-Expression führte in Schließzellen von Blättern aller Altersstufen zu einer starken Blaufärbung. Die Anzahl der blaugefärbten Zellen nahm dabei vom Blattansatz zur Blattspitze hin zu. Dies war der erste Nachweis der präferenziellen Schließzell-Expression einer katalytischen PP1-/PP2A-Untereinheit. Auch für *TOPP1* wurde in heterologen Systemen eine Beteiligung an der Zellteilung nachgewiesen (Smith und Walker, 1996). Interessanterweise zeigten die homologen Proteine *TOPP1* und *TOPP2* bei Expression in Hefen aber ein gegensätzliches Verhalten. *TOPP2*, aber nicht *TOPP1*, konnte in *S. cerevisiae* die *GLC7*-Funktion am Beginn der Mitose übernehmen. Dafür komplementierte *TOPP1*, im Gegensatz zu *TOPP2*, in *S. pombe* den Defekt einer *dis2*-Mutante am Ende der Mitose (die Zellen werden durch den Verlust der *DIS2*-PP kältesensibel).

Neben den Daten zur *TOPP1*- und *TOPP2*-Expression in Hefen weisen auch die in dieser Arbeit gefundenen Expressionsmuster der beiden Gene auf unterschiedliche Funktionen *in planta* hin. So sind *TOPP1* und *TOPP2* in verschiedenen Geweben der Blätter aktiv (Abb.III.3. und Abb.III.11.) und nur für *TOPP2* zeigte sich eine Expression im vaskulären Gewebe des Stengels. Auffällig war auch die deutlich stärkere Expression von *TOPP1* in den Wurzeln und im Hypokotyl junger Pflanzen (die GUS-Färbung war in diesen Geweben schon nach 10 min Inkubation in der Färbelösung zu erkennen). Trotz seiner Expression in verschiedenen Geweben der Pflanze ist es möglich, dass *TOPP1* eine Schlüsselfunktion in den Schließzellen besitzt. Wie Literaturdaten zeigen, kann ein wichtiges Protein der Schließzellen auch in hohen Konzentrationen in anderen Geweben vorkommen. Für *RCN1*, einer der drei regulatorischen A-Untereinheiten von *PP2A* in *A. thaliana*, wurde eine wichtige Funktion beim Auxintransport in der Wurzel beschrieben (Garbers *et al.*, 1996; Dereuere *et al.*, 1999). In einem unabhängigen Screeningansatz wurde das Protein dann auch in EF identifiziert und seine wichtige Rolle beim ABA-induzierten Stomataschluss nachgewiesen (Kwak *et al.*, 2002).

Für eine weitere Analyse der *TOPP1*-Funktion in den Schließzellen wäre es notwendig, Pflanzen mit veränderter *TOPP1*-Genaktivität zu analysieren. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, ein RNAi-Konstrukt für *TOPP1* herzustellen. Da *TOPP1* nur einen relativ kurzen Isoform-spezifischen 3'-UTR besitzt, erscheint es außerdem erfolgversprechender, statt der Herstellung von RNAi-Pflanzen in den schnell wachsenden T-DNA Kollektionen nach Insertionsmutanten zu suchen.

IV.1.5. Charakterisierung der Expression von *TOPP5*

Im Vergleich zu *TOPP1* und *TOPP2* zeigte sich die *TOPP5*-Promotor vermittelte GUS-Aktivität in den Blättern deutlich schwächer. Sie war hauptsächlich auf das vaskuläre Gewebe am Blattansatz und in den Blattstielen beschränkt (Abb.III.12.). Außer in diesen Bereichen gab es eine starke Blaufärbung des vaskulären Gewebes der Stengel, eine schwächere Färbung an den Blattspitzen junger Blätter und eine sehr schwache Färbung in den Blütenblättern. Smith und Walker (1993) hatten für *TOPP1*, *TOPP2* und *TOPP5* keine deutlichen Expressionsunterschiede zwischen Wurzel-, Rosetten- und Blütengewebe gefunden. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Promotor-*gusA* Konstrukte zeigten dagegen sehr unterschiedliche Expressionsmuster dieser drei PP-Gene und verdeutlichten die Notwendigkeit einer zellulären Expressionsanalyse. Für *TOPP5* war keine Aktivität in den Wurzeln und nur eine schwache Aktivität in den Blüten detektierbar. Der Vergleich von *TOPP5*- und *TOPP1*-Promotor vermittelter *gusA*-Expression zeigte außerdem, dass die beiden Gene in keinem Gewebe parallel exprimiert wurden (Tab.III.1.). Für *TOPP5* und *TOPP2* erkannte man eine parallele Expression im vaskulären Bereich des Stengels und des Blattansatzes. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob *TOPP5* in der Lage ist, *TOPP2* funktionell zu ersetzen. In einem ersten Ansatz wäre es möglich, dies für *TOPP5* in den „Knock Out“ Stämmen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* (Smith und Walker, 1996) zu testen.

IV.1.6. Charakterisierung der Expression von *STH1* und *STH2*

Im vorgestellten Screeningansatz (Abb.III.7.) gelang es zum ersten Mal, Transkripte der zwei Gene *STH1* und *STH2* aus EF zu isolieren. Beide Gene bilden neben den Genen von PPX1 (At4g26720) und PPX2 (At5g55260) die zweite Untergruppe von PP2A-verwandten Sequenzen in *A. thaliana* (Abb.III.8.). Die abgeleiteten STH-Proteine waren fast vollkommen identisch (nur zwei Aminosäuren Unterschied) und zeigten Ähnlichkeit zu SIT4 aus *S. cerevisiae*. SIT4 gehört zur zwölf Proteine umfassenden PP1-/PP2A-Gruppe, die in der Bäckerhefe vorkommen (Stark, 1996). Es ist als eine der wichtigsten PP dieses Organismus an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass die Protein Kinase C Funktion von SIT4 abhängt (Torre-Ruiz *et al.*, 2002).

In *A. thaliana* gelang es, eine wichtige Funktion von *STH2* bei der Phytochrom-Regulation zu zeigen (Kim *et al.*, 2002). Es wurde nachgewiesen, dass *STH2* (in dieser Studie AtFyPP3 genannt) mit den lichtregulierten Rotlicht-absorbierenden Phytochromen interagiert und dadurch Einfluss auf den Blühzeitpunkt der Pflanzen nimmt. Kim *et al.* untersuchten auch die Expression von *STH1* (AtFyPP1) und *STH2* mittels RNA-Blot und RT-PCR. In ihren Experimenten zeigten sich für beide Gene hohe Transkriptgehalte in der Blüte, eine

schwächere Expression im Stengel und eine kaum detektierbare Aktivität in den Blättern. Im Gegensatz zu *STH1* war die *STH2*-Aktivität allerdings abhängig von der Tageslänge.

Durch die Analyse der Promotor-*gusA* Konstrukte konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *STH1* und *STH2* deutliche Unterschiede in ihrer Expression aufweisen. So zeigte sich nur *STH2*-Expression in der Narbe, in den Samenkörnern und an den Ansatzpunkten neuer Blattknospen (Abb.III.12. und Abb.III.13.). Entgegen der Literaturdaten (Kim *et al.*, 2002) ließ sich außerdem für beide Gene eine Expression in den Wurzeln beobachten. Bei der *STH1*-Promotor vermittelten GUS-Expression war eine Blaufärbung in den Wurzelspitzen junger Pflanzen zu erkennen. Auch für *STH2* konnte Expression in Seitenwurzeln und im vaskulären Gewebe junger Hauptwurzeln nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, warum *STH2*, falls seine ausschließliche Funktion in der lichtabhängigen Phytochrom-Regulation liegt, in Wurzeln aktiv ist. Zur Beantwortung dieser Frage und zur weiteren Charakterisierung der beiden Proteine wäre die Suche nach Proteinkomplexen, an denen *STH1* oder *STH2* beteiligt sind, ein interessantes Experiment. Für PP2A-Proteine ist beschrieben, dass ihre Spezifität und Lokalisation durch regulatorische Untereinheiten mitbestimmt wird (Luan, 2003). Falls auch für die beiden *STH*-Proteine solche Bindungspartner gefunden werden können, wäre zu klären, ob gewebe- oder stimuluspezifisch unterschiedliche Proteinkomplexe gebildet werden. Dies wäre ein erster Hinweis auf weitere Funktionen der *STH*-Proteine.

IV.1.7. Analyse der *STH1*-Insertionsmutanten

Bei der Durchmusterung der T-DNA Kollektion des GABI-KAT Ressourcenzentrums (www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/; Rosso *et al.*, 2003) konnte für *STH1* eine Insertionsmutante identifiziert werden. Die Analyse von zwanzig Pflanzen der T1-Generation zeigte bei den drei Pflanzen, die bezüglich der T-DNA Insertion in die beiden *STH1*-Allele homozygot waren, einen deutlich veränderten Phänotyp (Abb. III.15.). Verglichen mit dem parallel kultivierten Wildtyp wiesen die Insertionsmutanten eine veränderte Blattmorphologie (gezahnte Blattränder), einen gedrungeneren Wuchs und einen veränderten Blühzeitpunkt (5-7 Tage früher) auf. Auch für den „Knock Out“-Phänotyp von *STH2* wurde ein 2-3 Tage früherer Blühzeitpunkt beschrieben (Kim *et al.*, 2002). In einem weiteren Experiment wurde *STH2* überexprimiert und führte zu einem 4-5 Tage späteren Blühzeitpunkt. Die Literaturdaten und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die beiden *STH*-Proteine möglicherweise eine ähnliche Funktion in der Blüte besitzen. Es wird aber gleichzeitig deutlich, dass sich *STH1* und *STH2* trotz ihrer Homologie nicht funktionell ersetzen können. Eine Ursache dafür sind möglicherweise die unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Gene. Auch der Blattphänotyp der *STH1*-Insertionsmutanten, der bei *STH2*-Inaktivierung nicht auftrat, war ein Hinweis auf Funktionen von *STH1* außerhalb der Blüte.

IV.2. Charakterisierung von NIC1 und weiterer MATE-Proteine aus *A. thaliana*

Der Identifikation von *NIC1* (IV.2.1.) schloss sich die funktionelle Charakterisierung von NIC-Proteinen in *S. cerevisiae* und *X. laevis* Oozyten an. Diese Experimente werden mit den Literaturdaten zu MATE-Proteinen aus Prokaryoten, *S. cerevisiae* und *A. thaliana* verglichen (IV.2.2.). Die Lokalisation und Modulation der *NIC1*-Genaktivität *in planta* und die Analyse von T-DNA Linien weiterer MATE-Proteine werden anschließend diskutiert (IV.2.3. bis IV.2.5.).

IV.2.1. Das EF-spezifische „Fragment 9-4“ führte zur Klonierung von *NIC1*

Der Screeningansatz zur Identifikation von EF-exprimierten PP1-/PP2A-Genen mit Hilfe degenerierter Primer (III.1.2.1.) erforderte eine Optimierung der eingesetzten Primerkombinationen. In einem der ersten Ansätze trat dabei das EF-spezifische „Fragment 9-4“ auf. Obwohl dieses cDNA-Fragment nicht von einem PP-Gen stammte, wurde es wegen seiner EF-spezifischen Expression näher analysiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von „Fragment 9-4“ zeigte Homologie zu MATE-Membranproteinen. Es stellte sich die Frage, aus welchem Organismus die klonierte Nukleinsäure stammte. Auch nach der Sequenzierung des Genoms konnte kein identisches Gen in *A. thaliana* identifiziert werden. Homologe Proteine mit größter Übereinstimmung auf Aminosäureebene wurden bisher bei *S. pombe* und *S. cerevisiae* gefunden. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Vorgehensweise in diesem Versuch. So wurden Wildtyppflanzen von *A. thaliana* aus dem Gewächshaus genutzt, um EF- und Gesamtblatt-RNA zu isolieren. Es ist denkbar, dass pflanzenbesiedelnde Mikroorganismen mit robuster Zellwand die EF-Präparation überlebten und ihre Nukleinsäuren in die RNA-Präparation gelangten. Wahrscheinlich reichten dabei auch geringe Mengen an RNA, da in der anschließenden Selektion insgesamt 60 PCR-Zyklen vorkamen.

Obwohl sich die Hypothese zum Auftreten von „Fragment 9-4“ erst eindeutig beweisen lässt, wenn das entsprechende Gen in einem pflanzenbesiedelnden Mikroorganismus identifiziert wird, führte das unerwartete PCR-Produkt zur großen Familie der MATE-Proteine in *A. thaliana*. Zum Zeitpunkt seiner Klonierung (Ende 2000) war keines der mindestens 56 Mitglieder dieser Familie charakterisiert und ERC1 aus *S. cerevisiae* war das einzige beschriebene MATE-Protein aus Eukaryoten (Shiomi *et al.*, 1991 und 1995). Auch für Prokaryoten gab es nur funktionelle Daten zu NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* (Morita *et al.*, 1998 und 2000). Zur Charakterisierung von MATE-Proteinen aus höheren Organismen wurde deshalb die cDNA von *NIC1* (At4g23030) kloniert und das kodierte Protein auf seine Transporteigenschaften hin getestet. *NIC1* wurde ausgewählt, da die abgeleitete Aminosäuresequenz von allen 56 vorhergesagten MATE-Proteinen aus *A. thaliana* die

größte Übereinstimmung zu „Fragment 9-4“ zeigte. Die Studien zu NorM und ERC1 legten die Vermutung nahe, dass MATE-Proteine als „Multidrug-Exporteure“ sehr unterschiedliche organische Substrate im Antiport zu Protonen oder anorganischen Kationen transportieren können. Von dieser Annahme ausgehend wurde für NIC1 hauptsächlich der Transport anorganischer Kationen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erste Charakterisierung von NIC1 und weiterer MATE-Proteine ohne vorherige Kenntnis der transportierten organischen Substrate möglich war.

IV.2.2. NIC-Proteine lassen sich in *S. cerevisiae* und *X. laevis* Oozyten charakterisieren

In den letzten drei Jahren (seit 2001) wurden mehrere MATE-Proteine aus Bakterien und *A. thaliana* charakterisiert. Es zeigte sich, dass sie an der Detoxifizierung einer Vielzahl organischer Substanzen beteiligt sein können. Die folgende Abbildung (Abb.IV.1.) gibt einen ersten Überblick.

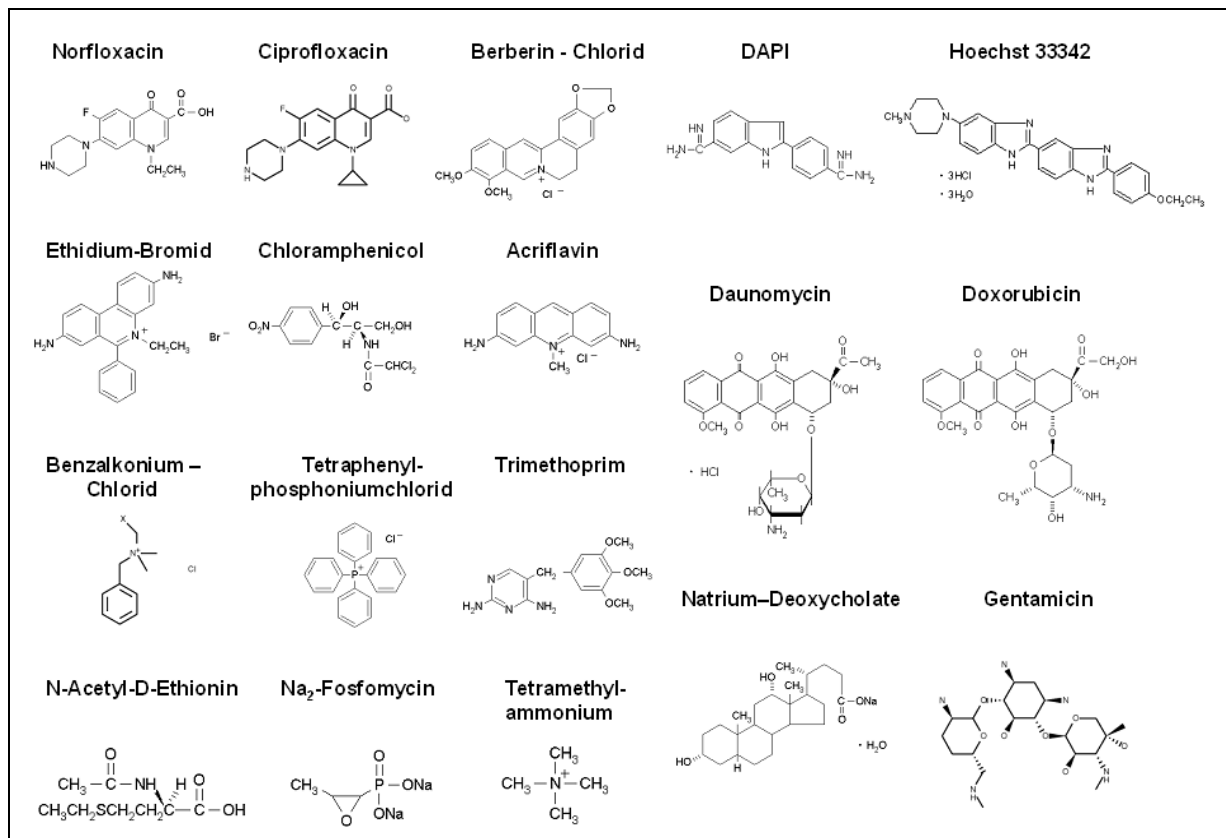


Abb. IV.1. Übersicht potenzieller Substrate von MATE-Proteinen

Keines der bisher charakterisierten MATE-Proteine ist in der Lage, alle in Abb. IV.1. aufgeführten Verbindungen zu detoxifizieren. Als größte „Generalisten“ zeigten sich neben NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* (Morita *et al.*, 2000) die beiden Proteine YdhE aus *E. coli* (Nishino *et al.*, 2001) und HmrM aus *Haemophilus influenza* (Xu *et al.*, 2003). Alle drei

Proteine konnten die Resistenz gegenüber mindestens neun toxischen Substanzen erhöhen, zeigten aber keine identischen Substratspektren (zur Übersicht siehe Tab. IV.1.).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden für fünf der mindestens 56 MATE-Proteine aus *A. thaliana* erste Funktionen beschrieben. In vier der fünf Studien wurde das jeweilige Protein jedoch nicht aufgrund seiner detoxifizierenden Eigenschaften isoliert (Debeaujon *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Diener *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002; Rogers und Guerinot, 2002). Nur für DTX1 (Li *et al.*, 2002) konnte bisher ein Toxin/Protonen-Antiport nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle (Tab. IV.1.) zeigt eine Übersicht der charakterisierten MATE-Proteine und ihrer potenziellen Substrate.

Tab. IV.1. Substratspektren beschriebener MATE-Proteine

Protein	Organismus	Organische Substanz	Anorganische Substanz	Quelle
NorM	<i>V. parahaemolyticus</i>	Ac, Ba, Be, Da, Do, <u>Eb</u> , Ho, Nc, No, Pi, Tm	<u>Na⁺</u> , <u>Li⁺</u>	Morita <i>et al.</i> (2000) Xu <i>et al.</i> (2003)
YdhE	<i>E. coli</i>	Ba, Cm, Do, En, Fo, <u>No</u> , Nc, Tm, Tp	<u>Na⁺</u>	Nishino <i>et al.</i> (2001) Chen <i>et al.</i> (2002)
BexA	<i>B. thalictoides</i>	Ci, Eb, No	n.d.	Miyamae <i>et al.</i> (2001)
VmrA	<i>V. parahaemolyticus</i>	<u>Ac</u> , <u>Eb</u> , <u>Pi</u> , <u>Tp</u>	<u>Na⁺</u>	Chen <i>et al.</i> (2002)
NorM	<i>B. vietnamiensis</i>	No	n.d.	Fehl.-Gard. <i>et al.</i> (2002)
NorMI	<i>B. melitensis</i>	Ac, Be, Ci, Ge, <u>No</u> , Tp,	<u>H⁺</u>	Braibant <i>et al.</i> (2002)
VcrM	<i>V. cholerae Non-O1</i>	<u>Ac</u> , <u>Eb</u> , Ho, Pi, <u>Tp</u>	<u>Na⁺</u> , <u>Li⁺</u>	Huda <i>et al.</i> (2003)
HmrM	<i>H. Influenza Rd.</i>	Ac, Ba, Be, Da, Do, <u>Eb</u> , Ho, Nc, No, Pi, Tm, Tp,	<u>Na⁺</u> , <u>Li⁺</u>	Xu <i>et al.</i> (2003)
NorM	<i>N. gonorrhoeae</i>	Ac, Be, Eb	n.d.	Rouq.-Lough. <i>et al.</i> (2003)
NorM	<i>N. meningitidis</i>	Ac, Be, Eb	n.d.	Rouq.-Lough. <i>et al.</i> (2003)
PmpM	<i>P. aeruginosa</i>	Ac, <u>Ba</u> , Fq, Ebr, Tp	<u>H⁺</u>	He <i>et al.</i> (2004)
Erc1	<i>S. cerevisiae</i>	n.d.	n.d.	Shiomi <i>et al.</i> (1995)
TT12	<i>A. thaliana</i>	n.d.	n.d.	Debeaujon <i>et al.</i> (2001)
DTX1	<i>A. thaliana</i>	<u>Be</u> , <u>Eb</u> , No	<u>H⁺</u>	Li <i>et al.</i> (2001)
AFL5	<i>A. thaliana</i>	Ta	n.d.	Diener <i>et al.</i> (2002)
EDS5	<i>A. thaliana</i>	n.d.	n.d.	Nawrath <i>et al.</i> (2002)
FRD3	<i>A. thaliana</i>	n.d.	n.d.	Rogers <i>et al.</i> (2002)

Für die unterstrichenen organischen und anorganischen Substanzen konnten Transportprozesse gezeigt werden. Ac = Acriflavine; Ba = Benzalkonium-Chlorid; Be = Berberidin; Ci = Ciprofloxacin; Cm = Chloramphenicol; Da = Daunomycin; Do = Doxorubicin; Ge = Gentamicin; Eb = Ethidiumbromid; En = Enoxacin; Fo = Fosfomycin; Fq = Fluoroquinolones; Ho = Hoechst 33342; Me = N-Methylellipticinium; Nc = Natrium Deoxycholate; No = Norfloxacin; Pi = DAPI; Ta = Tetramethylammonium; Tm = Trimethoprim, Tp = Tetraphenylphosphonium-Chlorid, n.d. = keine Literaturdaten vorhanden

Nicht für alle untersuchten toxischen Verbindungen wurden schon eindeutige Transportprozesse nachgewiesen. Alle Substanzen, für die bereits Transportstudien beschrieben wurden, sind in Tab. IV.1. markiert.

Verglichen mit den zahlreichen Studien zur Detoxifikation von organischen Substraten durch MATE-Proteine ist deutlich weniger über die im Antiport transportierten anorganischen Kationen oder Protonen bekannt. Morita *et al.* (2000) konnten einen Ethidium/Natrium-Antiport für NorM zeigen. Von dieser Arbeitsgruppe wurden mit der gleichen Vorgehensweise auch VmrA aus *V. parahaemolyticus* (Chen *et al.*, 2002), VcrM aus *V. cholerae* Non-O1 (Huda *et al.*, 2003) und HmrM aus *H. influenza* (Xu *et al.*, 2003) als Toxin/Natrium-Antiporter charakterisiert. Interessanterweise waren NorM, VcrM und HmrM in der Lage, statt Natrium auch Lithium als anorganisches Kation zu nutzen. Ersetzte man allerdings Natrium durch Kalium, so zeigte keines der getesteten Proteine eine Aktivität (Morita *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

In drei Studien zu MATE-Proteinen konnte bisher ein Antiport von organischen Substanzen und Protonen nachgewiesen werden. Braibnant *et al.* (2002) beobachteten bei heterologer Expression von NorMI in *E. coli* eine Detoxifikation von Norfloxacin, die vom Protonengradient abhängig war. Für PmpM (He *et al.*, 2004) aus *Pseudomonas aeruginosa* und DTX aus *A. thaliana* (Li *et al.*, 2002) fand man ähnliche Transportmechanismen. Die Experimente mit DTX1 waren bisher der einzige Nachweis, dass auch eukaryotische MATE-Proteine den gekoppelten Transport von Toxinen und Protonen katalysieren können. Interessanterweise führte DTX1 bei heterologer Expression in *E. coli* auch zu einer erhöhten Cadmium- (Cd^{2+} -) Toleranz der Zellen. Es ist bisher unklar, was für ein Mechanismus dieser Schwermetallresistenz zugrunde liegt (Li *et al.*, 2002).

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung von NIC1 in *X. laevis* Oozyten zeigte sich, dass dieses MATE-Protein bei Hyperpolarisation auswärts gerichtete Chloridströme induzierte, welche durch mikromolare Konzentrationen von Gd^{3+} oder La^{3+} inhibiert werden konnten. Für *X. laevis* Oozyten sind eine Reihe endogener Ströme beschrieben (Weber, 1999), zu denen auch mindestens zwei auswärts gerichtete Chloridströme gehören. So gibt es einen Hyperpolarisierungs-aktivierten, Kalzium-unabhängigen Chloridstrom (I_{hyp}) und einen Kalzium-aktivierten Chloridstrom (Weber, 1999; Hartje, 2001). Das Auftreten der Kalzium-abhängigen Stromantworten in den Oozyten wurde schon in einigen Studien für eine funktionelle Expressionsklonierung genutzt. So fanden Leymann *et al.* (1999) ein Syntaxin mit wichtiger Funktion in den Schließzellen von *N. tabacum* und Hartje (2001) gelang die Identifikation von StCHoR, einem Protein, das die Kalzium-Homöostase in *S. tuberosum* beeinflusst. Die elektrophysiologischen Daten zu den NIC1-induzierten

Chloridströmen ließen es nicht zu, eindeutige Aussagen über die Transporteigenschaften dieses Proteins zu machen. So könnte NIC1 als auswärts gerichteter Chloridkanal für die gemessenen Ströme selbst verantwortlich sein. Möglich ist aber auch, dass das Protein direkt oder indirekt die Kalziumkonzentration im Cytosol der Oocyte beeinflusst und dadurch endogene Ströme induziert. Die Inhibitorstudien mit Gd^{3+} oder La^{3+} sprechen gegen einen NIC1-katalysierten Chloridtransport. Die Wirkung dieser beiden trivalenten Kationen legt vielmehr den Schluss nahe, dass NIC1 Einfluss auf die cytosolische Kalziumkonzentration nimmt. Ein eindeutiger Beweis für diese Hypothese konnte im Oozytensystem nicht erbracht werden.

Die Limitierung des Oozytensystems bei der Charakterisierung von NIC1 lässt nicht den Schluss zu, dass dieses System zur Charakterisierung von MATE-Proteinen ungeeignet wäre. So konnte Kursawe (2002) in NIC4-exprimierenden Oozyten einen Barium-inhibierbaren Kaliumtransport charakterisieren. Für andere monovalente Kationen zeigten sich in diesen Experimenten keine Aktivitäten und auch eine Inhibition durch Gd^{3+} oder La^{3+} konnte nicht beobachtet werden. Die elektrophysiologische Charakterisierung von NIC1 und NIC4 war ein erster Hinweis auf die unterschiedlichen Eigenschaften dieser homologen Proteine. Die Daten der NIC4-Expression in Oozyten zeigten außerdem, dass MATE-Proteine auch am Transport von Kalium beteiligt sein können. Bisher waren als anorganische Substrate nur Protonen, Natrium oder Lithium beschrieben (siehe Tab. IV.1.).

Die NIC4-Daten aus Oozyten (Kursawe, 2002) und die „Lithium“-/„Natriumphänotypen“ NIC1-, NIC2- und NIC4-exprimierender Hefestämme zeigten zum ersten Mal eine Beteiligung eukaryotischer MATE-Proteine an Transportprozessen monovalenter anorganischer Kationen. Es war möglich, MATE-Proteine in heterologen Expressionssystemen ohne Kenntnis der transportierten organischen Verbindungen zu charakterisieren. Interessanterweise unterschieden sich die NIC1-, NIC2- und NIC4-exprimierenden Hefestämme untereinander und von parallel kultivierten Kontrollstämmen. Während NIC2 eine erhöhte Lithium- und Natriumtoleranz der Hefen bewirkte (Dolniak, 2001), reagierten NIC4-exprimierende Hefen im Vergleich zu den Kontrollstämmen sensitiver auf diese beiden Kationen (Kursawe, 2002). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Phänotypen könnte die Lokalisation der beiden Proteine sein. Möglicherweise kamen NIC2 und NIC4 in verschiedenen Membransystemen von *S. cerevisiae* vor oder waren mit unterschiedlicher Orientierung in einer Membran lokalisiert. Für die erhöhte Lithiumtoleranz und die verminderte Natriumtoleranz von NIC1-exprimierenden Hefen wird vermutlich erst die subzelluläre Lokalisation des Proteins eine Erklärung liefern. Entsprechende Experimente mit Fusionsproteinen von NIC und GFP sind geplant.

Die unterschiedlichen „Lithium“- und „Natriumphänotypen“ der NIC1-, NIC2- und NIC4-exprimierenden Hefen bieten die Möglichkeit, weitere MATE-Proteine anhand dieser Phänotypen zu gruppieren. Eine solche Gruppierung könnte anschließend dazu dienen, mittels der Sequenzunterschiede zwischen den drei Gruppen die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Kationentoleranz verantwortlich sind. Als zweiter Ansatz zur Identifikation wichtiger Aminosäuren kann auch ein MATE-Protein gezielt mutagenisiert werden, um anschließend in *S. cerevisiae* den Einfluss der Mutation auf die Kationentoleranz zu untersuchen. Exemplarisch wurde dieser Ansatz für NIC1 schon angewandt. Die Mutation der Aminosäuresequenz RVGNELGA zu RVGNELTA führte zur erhöhten Lithiumtoleranz der Hefen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein Phänotyp für das uncharakterisierte Gen *YDR338c*, welches in *S. cerevisiae* neben ERC1 für ein weiteres MATE-Protein kodiert, gefunden werden. Interessanterweise zeigte sich für den „Knock-Out“ Stamm von *YDR338c* eine Abhängigkeit der Makrokolonieförmigkeit von der Kalziumkonzentration im YPD-Medium (Abb.III.26.). Bei Konzentrationen ab 400 mM wiesen die Kolonien im Vergleich zum Kontrollstamm eine deutlich zerfurchtere Oberfläche auf, was auf ein gestörtes Wachstum der Zellen hinwies (Wolff *et al.*, 1999). Wie schon die elektrophysiologischen Versuche mit NIC1, so war auch dieses Experiment ein Hinweis auf mögliche Funktionen von MATE-Proteinen beim Kalziumtransport oder der Kalziumhomöostase. Außer den Studien zu NIC1 und YDR338C, die für diese Hypothese sprechen, gibt es noch die Experimente zur Cadmium-Toleranz von DTX1 (Li *et al.*, 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nur Spekulation, ob diesen Phänotypen ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Literaturdaten belegen immerhin, dass der Transport von Kalzium und Cadmium durch gleiche Transportproteine katalysiert werden kann. So fanden Clemens *et al.* (1998) bei der heterologen Expression von LCT1 in *S. cerevisiae*, dass das Protein sowohl die Kalzium- als auch die Cadmiumaufnahme katalysiert. Die Beteiligung von NIC- und anderen MATE-Proteinen am Transport von Kalzium, Cadmium oder anderen divalenten Kationen muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Es könnten Transportexperimente mit radioaktiven Kalzium- oder Cadmiumisotopen unternommen werden (wie in den Versuchen von Clemens *et al.*, 1998). Auch Experimente zur Komplementation von Hefestämmen, die auf bestimmte divalente Kationen hypersensibel reagieren, wären möglich.

Die NIC1-Expression in *S. cerevisiae* hatte keinen Einfluss auf die Toleranz gegenüber Norfloxacin, Berberidin, Ethidiumbromid, Ethionin oder Tetramethylammonium (Ta). Die unveränderte Ta-Toleranz war dabei ein erster Hinweis, dass sich NIC1 funktionell von ALF5 unterscheidet. So konnten Diener *et al.* (2001) bei heterologer Expression von ALF5 zeigen, dass dieses MATE-Protein eine erhöhte Ta-Toleranz, aber keine Veränderung der

Natriumtoleranz von *S. cerevisiae* bewirkt. Der Mechanismus der Ta-Toleranz und mögliche organische Substrate von ALF5 sind noch unbekannt. Das *ALF5*-Gen wurde identifiziert, weil es gestörtes Wurzelwachstum bei *A. thaliana* komplementieren konnte. Es zeigte sich, dass der Phänotyp von *ALF5* „Knock-Out“ Pflanzen nur auf einem bestimmten Bacto-Medium auftrat. Eine Auftrennung dieses Mediums führte zwar zu einer Fraktion mit der störenden Substanz, die geringen Mengen dieser Kontamination konnten aber nicht identifiziert werden (Diener *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, die Toleranz gegenüber allen beschriebenen MATE-Substraten (Abb. IV.1.) zu testen. Diese Toxizitätstests sollen in zukünftigen Experimenten mit NIC1-, NIC2- und NIC4-exprimierenden Hefestämmen durchgeführt werden. Möglich wäre auch, die drei MATE-Proteine in *E. coli* Stämmen, die hypersensibel auf Toxine reagieren, zu untersuchen.

IV.2.3. *NIC1* wird hauptsächlich in vaskulären Geweben exprimiert

Von den fünf *MATE*-Genen, die in *A. thaliana* charakterisiert werden konnten, wurden bisher nur *AFL5* und *TT12* auf ihre gewebespezifische Expression hin untersucht. Für *ALF5* (Diener *et al.*, 2001) konnte mittels Promotor-*gusA* Fusionen eine Expression in den Wurzeln der Pflanzen nachgewiesen werden. Bei der Analyse junger Wurzeln fand sich allerdings keine GUS-Färbung in der wachsenden Wurzelspitze und auch die jungen Seitenwurzeln älterer Pflanzen wurden nicht angefärbt. Innerhalb der Wurzeln war die *ALF5*-Expression hauptsächlich auf die Wurzelepidermis und die Cortexregion konzentriert. Für *TT12* (Debeaujon *et al.*, 2001) zeigten *in situ* Hybridisierungen eine Expression im Endothelium junger Samen. In RT-PCR Experimenten wurde dieses Ergebnis bestätigt und die *TT12*-Expression in jungen Schoten nachgewiesen. Keine Expression des Gens war in Blättern, Stengeln oder Wurzeln der Pflanze zu erkennen. Bei Untersuchung der *NIC1*-Promotor vermittelten GUS-Aktivität konnten Blaufärbungen im vaskulären Gewebe junger Wurzeln, in den Blättern und in den Blattstielen beobachtet werden (Abb. III.33.). Keine Genaktivität wurde in Blüten oder Schoten gefunden. Aus dem Vergleich der Expressionsmuster von *NIC1*, *ALF5* und *TT12* ergab sich deshalb kein Hinweis, dass *NIC1* in der Pflanze eine ähnliche Funktion wie die beiden anderen *MATE*-Gene besitzt. So gab es zwischen *NIC1*- und *TT12*- Expression keine Überschneidung und auch die Genaktivität von *NIC1* und *ALF5* wurde in unterschiedlichen Bereichen der Wurzel detektiert. Aufgrund der *ALF5*-Expression in der Wurzelepidermis vermuteten Diener *et al.* (2001) eine Funktion des Proteins bei der Detoxifikation von Substanzen, mit denen die Wurzel in Kontakt kommt. Die Lokalisation von *NIC1* in vaskulären Geweben der Pflanzen weist dagegen möglicherweise auf eine Funktion

des Proteins bei Transportprozessen von organischen Verbindungen (z.B. Sekundärmetaboliten) innerhalb der Pflanze hin.

IV.2.4. NIC1 beeinflusst die Entwicklungsgeschwindigkeit der Pflanzen

Sehr unterschiedliche Funktionen wurden für die fünf publizierten MATE-Proteine aus *A. thaliana* gefunden. Von ihnen konnte nur DTX1 wegen seiner Eigenschaften als „Multidrug-Detoxifizierer“ in einem funktionellen Screen identifiziert werden (Li *et al.*, 2002). Dabei wurden *E. coli* Zellen, die hypersensibel auf Toxine reagierten, mit einer cDNA-Bank aus *A. thaliana* transformiert. Einzig DTX1 war in der Lage, diesen Phänotyp zu komplementieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Ethidium und Berberin im Antiport zu Protonen aus der Zelle exportierte. *In planta* wurde DTX1 in der Cytoplasmamembran lokalisiert (Li *et al.*, 2002). Die Identifikation von ALF5 wurde im letzten Abschnitt schon kurz beschrieben (Diener *et al.*, 2001). Über die genauen Transporteigenschaften des kodierten Proteins ist noch nichts bekannt und auch der Mechanismus der ALF5-vermittelten Tetramethylammonium-Toleranz in Hefen ist bisher unklar. Bei den weiteren beschriebenen MATE-Genen aus *A. thaliana* handelt es sich um TT12 (das kodierte Protein hat wahrscheinlich eine Funktion beim Transport von Flavonoiden in die Vakuolen von Zellen der Samenhülle; Debeaujon *et al.*, 2001), EDS5 (das kodierte Protein spielt eine Rolle in der Salicylsäure-abhängigen Signaltransduktion bei Pathogenbefall der Pflanzen; Nawrath *et al.*, 2002) und FRD3 (das kodierte Protein hat eine Kontrollfunktion bei der Eisenaufnahme in die Pflanze; Rogers *et al.*, 2002). Die vier Gene ALF5, TT12, EDS5 und FRD3 wurden identifiziert, da *A. thaliana* Mutanten ohne die jeweilige Genaktivität einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp ausbildeten. Es stellt sich die Frage, warum in keinem der vier Fälle ein anderes Gen aus der großen MATE-Familie die jeweilige Funktion ersetzen konnte. Auch Li *et al.* (2002) konnten in ihrem funktionellen Screen nur DTX1 identifizieren, obwohl 55 weitere MATE-Gene in *A. thaliana* vorhanden sind. Die Ergebnisse zu DTX1, ALF5, TT12, EDS5 und FRD3 zeigten, dass die Proteine der MATE-Familie trotz ihrer Homologie vermutlich sehr unterschiedliche Funktionen in der Pflanze besitzen.

Für diese These sprechen auch die Experimente, in denen die Genexpression von *NIC1* verändert wurde. Es konnte beobachtet werden, dass sich Pflanzen mit vermindertem *NIC1*-Transkriptgehalt zum Teil deutlich langsamer entwickelten als der parallel kultivierte Wildtyp (Abb.III.35.). Besonders deutlich wurde dieses Phänomen bei der Blatt-, Blüten- und Schotenentwicklung. Eigentlich wurde in den Pflanzen dieses Phänotyps die Expression des „*NIC1*-Sense“ Konstruktes (Abb.III.34.) erwartet. Erstaunlicherweise konnten aber nur deutlich verminderte Gehalte an endogenem *NIC1*-Transkript detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Verminderung des *NIC1*-Transkriptgehalts sind

„Cosuppressions-“ und „Post-Transcriptional Gene Silencing“- (PTGS-) Mechanismen (Van Houdt *et al.* 2000; Matzke *et al.*, 2001; Stoutjesdijk *et al.*, 2002; Tijsterman *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Cosuppression, Antisense-Suppression und RNA-abhängige Virusresistenz von Pflanzen verschiedene Ausprägungen von PTGS sind (Stoutjesdijk *et al.*, 2002). Der zentrale Schritt des PTGS ist dabei die Prozessierung doppelsträngiger RNA-Moleküle zu kurzen Fragmenten (21 Nukleotide) und ihre anschließende Nutzung zur sequenzspezifischen Degradation einzelsträngiger mRNA. Im Verlauf der Cosuppression werden die notwendigen doppelsträngigen RNA-Moleküle vermutlich durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem ursprünglichen Transkript hergestellt (Matzke *et al.*, 2001). Unklar bleibt die Frage, warum die „Sense-“, aber nicht die „Antisense“-Expression von *NIC1* zu dieser Verminderung des endogenen *NIC1*-Transkriptgehalts führte.

Von vier der fünf beschriebenen *MATE*-Gene aus *A. thaliana* wurden bisher der entsprechende „Knock-Out“ Phänotyp beschrieben (Debeaujon *et al.*, 2001; Diener *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002; Rogers und Guerinot, 2002). In keiner der Studien konnte eine ähnliche Beeinflussung der Entwicklungsgeschwindigkeit gefunden werden, wie sie für die Pflanzen mit verminderter *NIC1*-Genaktivität zu beobachten war. So war der Wurzelphänotyp in *ALF5* „Knock-Out“ Pflanzen nur auf bestimmten Medien zu beobachten, die *TT12*-Inaktivierung führte zu helleren Samenkörnern, in *EDS5* „Knock-Out“- Pflanzen kam es nach Pathogenbefall nicht mehr zu einer Salicylsäureanreicherung und Pflanzen ohne *FRD3* akkumulierten mehr Eisen, Mangan und Zink in ihren Wurzeln. Die verlangsamte Entwicklung von Pflanzen mit verminderter *NIC1*-Genaktivität zeigt vermutlich, dass kein anderes *MATE*-Protein die *NIC1*-Funktion in der Pflanze ersetzen kann.

Die Ergebnisse zur heterologen Expression von *NIC1*, *NIC2* und *NIC4* zeigten darüber hinaus, dass auch eng verwandte *MATE*-Gene unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Für *NIC4* konnte gezeigt werden, dass die Modulation der Genaktivität einen dramatischen Einfluss auf die Pflanzen hat. Bei Überexpression des Gens bildeten die sehr kleinen Pflanzen bis zu 50 Sprosse. Die Pflanzen blühten deutlich schneller als der entsprechende Wildtyp (Kursawe, 2002). Es stellt sich die spannende und schwierige Frage, welche organischen Substrate *NIC4*, aber auch *NIC1* und die anderen *NIC*-Proteine transportieren. Diese Fragestellung war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit ein wichtiger Bestandteil der laufenden Arbeiten von Mandy Kursawe, Blazej Dolniak und Fabien Poree in der Arbeitsgruppe Müller-Röber.

IV.2.5. Untersuchung von Insertionsmutanten weiterer *MATE*-Gene

Bei der Suche nach Insertionsmutanten am GABI-KAT Ressourcenzentrum wurden neun Linien identifiziert, die T-DNA Insertionen in einem *MATE*-Gen besaßen. Für alle neun Linien folgte die Selektion von F1-Pflanzen, die bezüglich der T-DNA Insertion in das jeweilige *MATE*-Gen homozygot waren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die F1- und F2-Pflanzen, die in beiden Allelen des Gens At4g38380 eine T-DNA Insertion besaßen, näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigten den sehr auffälligen „Cabbage“-Phänotyp und wichen, wie auch die *NIC4*-Überexpressionspflanzen, stark in ihrer Entwicklung vom parallel kultivierten Wildtyp ab. Im Gegensatz zu den *NIC4*-Linien, bei denen eine Brassinolid-Behandlung keinen Einfluss auf die Entwicklung hatte, konnte für die selektierten F1- und F2-Pflanzen der Linie D12 (GABI-KAT Linie mit Insertion in At4g38380) eine deutliche entwicklungsfördernde Wirkung des Phytohormons beobachtet werden. Dies war der erste Hinweis, dass ein *MATE*-Protein möglicherweise eine zentrale Rolle in Brassinosteroid-gesteuerten Entwicklungsprozessen in *A. thaliana* besitzt. Schon die Studien zu TT12 hatten gezeigt, dass *MATE*-Proteine nicht nur an der Detoxifikation, sondern auch am Transport von Sekundärmetaboliten beteiligt sein können (Debeaujon *et al.*, 2001). Im Augenblick ist es nur Spekulation, dass das durch At4g38380 kodierte *MATE*-Protein direkt am Transport von Brassinolid oder verwandten Substanzen beteiligt ist. Trotz einer großen Anzahl von Studien zur Brassinosteroid-abhängigen Signaltransduktion (Bishop und Koncz, 2002; Krishna, 2003;), zum Einfluss von Brassinosteroiden auf physiologische Prozesse der Pflanze (Sasse, 2003) und auf Brassinosteroid gesteuerte Genexpression (Müssig und Altmann, 2003) ist über den Transport dieser Substanzen wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle F1- und F2-Pflanzen der Linie D12, die den Brassinolid-beeinflussbaren „Cabbage“-Phänotyp zeigten, bezüglich der T-DNA Insertion in At4g38380 homozygot waren. Trotzdem sind viele weitere Experimente zur eindeutigen funktionellen Charakterisierung des Gens notwendig. In zukünftigen Versuchen muss zuerst mit einer unabhängigen Vorgehensweise die Genaktivität von At4g38380 vermindert und der beobachtete „Cabbage“-Phänotyp reproduziert werden. Möglich wäre dies durch die Identifikation einer weiteren Insertionsmutante oder durch Herstellung eines genspezifischen RNAi-Konstruktes. Führen auch diese Experimente zum „Cabbage“-Phänotyp, so kann ausgeschlossen werden, dass in den Tochterpflanzen der Linie D12 eine zweite, gekoppelte T-DNA Insertion für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Obwohl diese Experimente noch ausstehen, geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anlass, auf weitere Studien zu den Substratspektren der 56 *MATE*-Proteine aus *A. thaliana* gespannt zu sein.

V. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der Protein Phosphatase-gene *TOPP1*, *TOPP2*, *TOPP5*, *STH1* und *STH2* analysiert. Alle fünf ausgewählten Gene kodieren für PP des PP1/PP2A-Typs. Es wurde untersucht, ob homologen PP-Isoformen individuelle Expressionsmuster zugewiesen werden konnten. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die Expression von PP-Genen in den Schließzellen von *A. thaliana*. In mehreren Inhibitorstudien wurde beschrieben, dass PP1/PP2A-Proteine eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion pflanzlicher Schließzellen spielen. Bisher konnte allerdings noch keine der entsprechenden katalytischen Untereinheiten auf molekularer Ebene identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass mit *TOPP1* ein Protein des PP1-Typs präferenziell in den Schließzellen von *A. thaliana* exprimiert wird. Ein Vergleich der Genexpression von *TOPP1*, *TOPP2* und *TOPP5* zeigte für die drei homologen Gene sehr Isoform-spezifische Expressionsmuster. Dies war ein deutlicher Hinweis, dass diese eng verwandten PP trotz großer Übereinstimmung auf Aminosäureebene vermutlich unterschiedliche Funktionen *in planta* haben.

Die Untersuchung der Genexpression von *STH1* und *STH2* zeigte, dass die fast identischen Proteine zum Teil in unterschiedlichen Geweben vorkommen. Die Transkripte der beiden Gene, welche eine eigene Untergruppe von PP2A-verwandten Sequenzen bilden, konnten aus EF isoliert werden. Der in dieser Arbeit entwickelte Screeningansatz ermöglichte es, die sehr ähnlichen cDNA-Fragmente eindeutig voneinander zu unterscheiden. Die gefundenen Isoform-spezifischen Expressionsmuster waren ein deutlicher Hinweis auf unterschiedliche Funktionen *in planta*.

Zur weiteren Untersuchung der PP-Funktionen *in planta* wurden Pflanzen mit veränderter Genaktivität von *TOPP2* oder *STH1* untersucht. In Pflanzen mit RNAi-vermittelter Reduktion des *TOPP2*-Transkriptgehalts ließ sich ein deutlich verändertes Blattwachstum beobachten. Die eingerollten oder asymmetrisch entwickelten Blätter waren vermutlich ein Hinweis, dass diese PP1-Isoform auch in *A. thaliana* eine Rolle bei der Zellteilung spielt. Für *TOPP2*-Expression in Hefen wurde diese Funktion schon nachgewiesen. Die Analyse von Insertionsmutanten mit T-DNA Insertionen in beiden *STH1*-Allelen waren neben den Expressionsstudien ein weiterer Hinweis, dass sich *STH1* nicht funktionell durch *STH2* ersetzen lässt. Die Experimente in dieser Arbeit zeigten, dass das Fehlen der *STH1*-Genaktivität zu einem deutlichen Blattphänotyp mit gezahnten Blatträndern führte. Für *STH2*-Insertionsmutanten wurde dieses veränderte Wachstum nicht beschrieben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Gen *NIC1*, welches für ein MATE-Membranprotein kodiert, identifiziert und charakterisiert. Die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* hatte gezeigt, dass mindestens 56 *MATE*-Gene in dieser Pflanze vorhanden sind. Zum Zeitpunkt der Identifikation von *NIC1* war keines dieser Gene charakterisiert. Außer für das MATE-Protein ERC1 aus *S. cerevisiae* gab es keine Studien zu eukaryotischen Mitgliedern dieser großen Familie von Membranproteinen. Anhand *NIC1* wurden heterologe Expressionssysteme zur funktionellen Charakterisierung von MATE-Proteinen aus Pflanzen etabliert.

Die cDNA von *NIC1* wurde nach ihrer Klonierung in *X. laevis* Oozyten und *S. cerevisiae* exprimiert. In *S. cerevisiae* erhöhte die *NIC1*-Expression die Lithumtoleranz der Hefen und führte zu einer Verminderung der Natriumtoleranz. Parallele Versuche mit *NIC2* und *NIC4* (in den Diplomarbeiten von Blazej Dolniak und Mandy Kursawe) zeigten, dass auch diese beiden Proteine die Salztoleranz von *S. cerevisiae* beeinflussten. Während *NIC2* die Lithium- und Natriumtoleranz erhöhte, führte *NIC4*-Expresion zu einer höheren Sensibilität gegenüber diesen beiden Kationen. Die unterschiedlichen Eigenschaften der drei homologen Proteine zeigten sich auch bei ihrer Expression in *X. laevis* Oozyten. *NIC1* induzierte in den Oozyten auswärts gerichtete Chloridströme, die spannungsabhängig waren und durch mikromolare Konzentrationen der trivalenten Kationen Lanthan oder Gadolinium inhibiert werden konnten. *NIC4* induzierte Barium-inhibierbare Kaliumströme, die spannungsunabhängig waren. Für *NIC2* ließ sich in diesem Expressionssystem keine Aktivität detektieren.

Zur Untersuchung der *NIC1*-Funktion *in planta* wurde die Genaktivität in transgenen Pflanzen lokalisiert und reduziert. Die *NIC1*-Genexpression war hauptsächlich in den vaskulären Geweben der Pflanze detektierbar und einer Verminderung des *NIC1*-Transkriptgehalts beeinflusste die Entwicklungsgeschwindigkeit der Pflanzen. Sie entwickelten sich deutlich langsamer als der parallel kultivierte Wildtyp. Der deutliche Phänotyp bei Veränderung der Genaktivität von nur einem der mindestens 56 vorhandenen *MATE*-Gene in *A. thaliana* zeigte, dass vermutlich keine weitere MATE-Isoform in der Lage ist, die Funktion von *NIC1* zu übernehmen.

Zur Untersuchung der Funktionen von weiteren MATE-Isoformen aus *A. thaliana* wurden für neun Gene die entsprechenden Insertionsmutanten vom GABI-KAT Ressourcenzentrum bezogen und anschließend analysiert. Für At4g38380 zeigte sich in einer ersten Charakterisierung, dass Pflanzen mit T-DNA Insertionen in beiden Allelen des Gens einen „Cabbage“-Phänotyp ohne klare Gliederung in Stengel und Blätter ausbildeten. In Wachstumsexperimenten konnte beobachtet werden, dass sich dieser Phänotyp durch Brassinolidbehandlung beeinflussen ließ.

Summary

Gene expression analysis of the protein phosphatase (PP) genes, *TOPP1*, *TOPP2*, *TOPP5*, *STH1* and *STH2*, of *Arabidopsis thaliana* was investigated in the first part of this thesis. All five genes encode PP of subgroups PP1 or PP2A. It was determined that homologous isoforms show individual and differing expression patterns. The PP-expression in guard cells was analysed further, because previous inhibitor studies showed an important influence of PP1/PP2A on signal transduction processes in these specialised cells. The previous studies had not addressed molecular identification of the inhibited PP1-/PP2A-subunits. This work demonstrates for the first time a preferential expression of a PP1 isoform, *TOPP1*, in guard cells. Further analysis of *TOPP1*, *TOPP2* and *TOPP5* gene expression also revealed isoform-specific expression patterns, suggesting non-redundant functions *in planta*.

Characterisation of the nearly identical PP2A-related genes, *STH1* and *STH2*, also revealed individual expression patterns. An established screening approach (this work) for the identification of PP-genes from EF (epidermal fragments; a preparation enriched for guard cells) made it possible to distinguish the cDNAs of *STH1* and *STH2*. The two genes form a subgroup of PP2A-related sequences. Differences in their expression patterns suggest that *STH1* and *STH2* have different functions in *A. thaliana*.

The analysis of plants with altered gene expression of *TOPP2* and *STH1* gave further insights into the roles of individual PP isoforms. The RNAi-mediated reduction of *TOPP2*-expression led to changed morphology of leaves, which showed curling and asymmetric development. The reason for this phenotype is probably due to changes of the cell cycle in certain parts of the leaf. Previous studies have already shown that heterologously expressed *TOPP2* complements yeast cell cycle mutants. The selection and characterisation of plants with insertions in both *STH1*-allels revealed the individual roles of *STH1* and *STH2* *in planta*. Although *STH2* was not affected, plants developed an extreme phenotype with reduced growth and altered leaf shape. Previous studies with *STH2* loss-of-function mutants did not show this morphology.

The second part of this thesis includes the identification and characterisation of a MATE (multidrug and toxic extrusion) membrane protein in plants. Described is NIC1, the first of at least 56 MATE proteins in *A. thaliana*. Indeed a study of the MATE protein, ERC1, of *Saccharomyces cerevisiae* was the only description of a eukaryotic member of this large family of membrane proteins.

A cDNA of *NIC1* was cloned and heterologously expressed in both *Xenopus laevis* oocytes and *S. cerevisiae*. *NIC1* expression increased lithium tolerance and decreased sodium tolerance of yeast strains. Interestingly, we found differing results for the related genes *NIC2* and *NIC4* (diploma theses, Blazej Dolniak and Mandy Kursawe). The *NIC2* expressing yeast strains showed increased lithium and sodium tolerance while *NIC4* expression decreased tolerance for both cations. The expression of *NIC1*, *NIC2* and *NIC4* in *X. laevis* oocytes also revealed different properties of the three proteins. Voltage clamp analysis of *NIC1*-expressing oocytes showed outward rectifying, voltage dependent chloride currents, which could be inhibited by micromolar concentrations of the trivalent cations lanthane or gadolinium. Expression of *NIC4* in the same system led to voltage independent potassium currents, which could be inhibited by barium ions. The voltage clamp analysis of *NIC2*-expressing oocytes showed no currents under the conditions tested.

The function of *NIC1 in planta* was analysed by localising and reducing its expression in transgenic plants. Using promoter-GUS-fusions, the expression was shown to be mainly localised in the vascular tissue. A reduction of *NIC1* expression influenced the rate of development. The plants developed slower than wildtype plants cultivated in parallel. The appearance of this phenotype suggests that none of the other MATE genes in *A. thaliana* (at least 55 more isoforms have been identified) were able to fully replace *NIC1* function.

For a more general survey of MATE functions in plants we identified insertional mutants for nine MATE genes at the GABI-KAT stock centre. Notably, plants homozygous for the insertion in MATE gene *At4g38380* showed a strong “cabbage” phenotype. These plants developed neither stems nor leaves. Interestingly, it was possible to compensate for the MATE gene defect in these plants after spraying them with the plant hormone brassinolid.

VI. Literatur

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.** 1995. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft
- Allen G.J., Muir S.R., Sanders D.** 1995. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science*. Vol. 268, 735 – 737
- Allen G.J., Chu S.P., Schumacher K., Shimazaki C.T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S.D., Tallman G., Tsien R.Y., Harper J.F., Chory J., Schroeder J.I.** 2000. Alteration of Stimulus-Specific Guard Cell Calcium Oscillations and Stomatal Closing in *Arabidopsis det3* Mutant. *Science*. Vol. 289, 2328 – 2342
- Allen G.J., Chu S.P., Harrington C.L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y.Y., Grill E., Schroeder J.I.** 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*. Vol. 411, 1053 – 1057
- Arabidopsis Genome Initiative** 2000. Analysis of the genome sequences of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. Vol. 408, 796 – 815
- Arango M., Gevaudant F., Oufattole M., Boutry M.** 2003. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta*. Vol. 216(3), 355 – 365
- Assmann S.M.** 1999. The molecular basis of guard cell sensing of rising CO_2 . *Plant Cell Environ.* Vol. 22, 629 – 637
- Assmann S.M.** 2003. *OPEN STOMATA1* opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends in Plant Sci.* Vol. 8(4), 151 – 153
- Assmann S.M. und Shimazaki K.** 1999. The Multisensory Guard Cell. Stomatal Responses to Blue Light and Abscisic Acid. *Plant Physiol.* Vol. 119, 809 – 815
- Atsumi T., McCarter L., Imae Y.** 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive-forces. *Nature*. Vol. 355, 182 – 184
- Axelsen K.B. und Palmgren M.G.** 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 126(2), 696 – 706
- Barbier-Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Maurel C.** 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1465, 199 – 218
- Baxter I., Tchieu J., Sussman M.R., Boutry M., Palmgren M.G., Gribskov M., Harper J.F., Axelsen K.B.** 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* Vol. 132(2), 618 – 628
- Bechthold N., Ellis J., Pelletier G.** 1993. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Molecular Biology Genetics*. Vol. 316, 1194 – 1199
- Becraft P.W.** 2002. Receptor Kinase Signaling in Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 18, 163 – 192
- Birnboim H.C. und Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol. 7, 1513 – 1523
- Bishop G.J. und Koncz C.** 2002. Brassinosteroids and plant hormone signaling. *Plant Cell*. Vol. 14, S97 – 110
- Blatt M.R.** 2000. Ca^{2+} signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 3, 196 – 204
- Bleecker A.B., Esch J.J., Hall A.E., Rodriguez F.I., Binder B.M.** 1998. The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, Vol 353(1374), 1405 – 1412

- Braibant M., Guilloteau L., Zygmunt M.S.** 2002. Functional Characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an Efflux Pump Belonging to the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 46(9), 3050 – 3053
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.** 1987. XI1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β - galactosidase selection. *Biotechniques*. Vol. 5, 376 - 378
- Burnett E.C., Desikan R., Moser R.C., Neill S.J.** 2000. ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *J. Exp. Bot.* Vol. 51, 197 – 205
- Byrne M.E., Simorowski J.; Martienssen R.A.** 2000. *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development*. Vol. 129, 1957 – 1965
- Cao Y., Anderova M., Crawford N.M., Schroeder J.I.** 1992. Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell*. Vol. 4, 961 – 969
- Chen J., Morita Y., Huda M.N., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.** 2002. VmrA, a member of a Novel Class of Na⁺ - Coupled Multidrug Efflux Pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* Vol.(2), 572 – 576
- Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P., Schroeder J.I.** 1998. The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *PNAS*. Vol. 95(20), 12043 – 120048
- Davenport R.** 2002. Glutamate receptors in plants. *Ann. Bot. (Lond)*. Vol. 90(5), 549 – 557
- Debeaujon I., Peters A.J.M., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M.** 2001. The *TRANSPARENT TESTA12* Gene of *Arabidopsis* encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium. *Plant Cell*. Vol. 13, 853 – 871
- Deblaere R., Bytebier B., Greve H.D., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J.** 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* Vol13, 4777 – 4788
- Demidchik V., Davenport R.J., Tester M.** 2002. Nonselective Cation Channels in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 53, 67 – 107
- Deruere J., Jackson K., Garbers C., Soll D., Delong A.** 1999. The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *Plant J.* Vol. 20 (4), 389 – 399
- Diener A.C., Gaxiola R.A., Fink G.R.** 2001. *Arabidopsis* ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell*. Vol 13, 1625 – 1637
- Dietrich P. und Hedrich R.** 1994. Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a guard cell anion channel. *Planta*. Vol. 195, 301 – 304
- Dolniak B.** 2001. Diplomarbeit an der Universität Wroclaw (Polen)
- Doyle J.J. und Doyle J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. Vol. 19, 11 – 15
- Durner J. und Klessig D.F.** 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 2, 369 – 374
- Fehlner-Gardiner C.C. und Valvano M.A.** 2002. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis* *norM* gene encoding a multi – drug efflux protein. *FEMS Microbiol. Letters*. Vol. 215(2), 279 – 283
- Ferreira P.C., Hemerly A.S., Van Montagu M., Inze D.** 1993. A protein phosphatase 1 from *Arabidopsis thaliana* restores temperature sensitivity of a *Schizosaccharomyces pombe* *cdc25ts/wee1* – double mutant. *Plant J.* Vol. 4(1), 81 – 87
- Forde B.G.** 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1465(1-2), 219 – 235

- Fox T.C. und Guerinot M.L.** 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 49, 669 – 696
- Fukuda M., Hasezawa S., Nakajima N., Kondo N.** 2000. Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba*. accompanies with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle. *Plant Cell Physiol.* Vol. 41(5), 600 – 607
- Garbers C., DeLong A., Deruere J., Bernasconi P., Soll. D.** 1996. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO J.* Vol. 15(9), 2115 – 2124
- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M.R.** 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signalling pathways. *PNAS.* Vol. 100(19), 11116 – 11121
- Gardner R.C.** 2003. Genes for magnesium transport. *Cur. Opin. Plant Biol.* Vol. 6(3), 263 – 267
- Geisler M., Axelsen K.B., Harper J.F., Palmgren M.G.** 2000. Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺ - ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol. 1465, 52 – 78
- Gietz D.J., Jean A.St., Woods R.A., Schiestl R.H.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* Vol. 20, 1425
- Glass A.D., Britto D.T., Kaiser B.N., Kinghorn J.R., Kronzucker H.J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi M.Y., Unkles S.E., Vidmar J.J.** 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* Vol. 53(370): 855 – 864
- Grabov A., Leung. J., Giraudat J., Blatt M.R.** 1997. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J.* Vol. 12, 203 – 213
- Grabov A. und Blatt M.R.** 1998. Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J. Exp. Bot.* Vol. 49, 351 – 360
- Grill E. und Ziegler H.** 1998. A Plant's Dilemma. *Science.* Vol. 282, 252 – 252
- Guerinot M.L.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1465(1-2), 190 – 198
- Hamilton D.W.A., Hills A., Köhler B., Blatt M.R.** 2000. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *PNAS.* Vol. 97(9), 4967 – 4972
- Han S., Tang R., Anderson L.K., Woerner T.E., Pei Z.M.** 2003. A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ - sensing in guard cells. *Nature.* Vol. 425, 196 – 200
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Molecular Biology.* Vol. 166, 557 – 580
- Hardie D.G. und Hanks S.** 1995. *The Protein Kinase Factsbook*, Academic Press, Harcourt Brace & Company
- Hardie D.G** 1999. Plant protein serine/threonine kinases: classification and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 50, 97 – 131
- Hartje, S.** 2000. Doktorarbeit an der Universität Potsdam
- He G.X., Kuroda T., Mim T., Morita Y., Mizushima T., Tsuchiya T.** 2004. An H⁺-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a member of the MATE Family of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* Vol. 186(1), 262 – 265
- Hey S.J., Bacon A., Burnett E., Neill S.J.** 1997. Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. Argenteum: Both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta.* Vol. 202, 85 – 92
- Heyl A. und Schumling T.** 2003. Cytokinin signal perception und transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol. 6(5), 480 – 484

- Huda N., Chen J., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.** 2003. Gene Cloning and Characterization of VcrM, a Na⁺ - Couplet Multidrug Pump, from *Vibrio cholerae* Non-O1. *Microbiol. Immunol.* Vol. 47(6), 419 – 427
- Hugouvieux V., Kwak J.M., Schroeder J.I.** 2001. An mRNA Cap Binding Protein, ABH1, Modulates Early Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Cell.* Vol. 106, 477 – 487
- Hvorup R.N., Winnen B., Chang A.B., Jiang Y., Zhou X.F., Saier M.H.** 2003. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* Vol. 270, 799 – 813
- Hwang I., Chen H.C., Sheen J.** 2002. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 129(2), 500 – 515
- Jack D.J., Yang N.M., Saier M.H.** 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* Vol. 268, 3620 – 2639
- Javot, H. und Maurel C.** 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann. Bot. (Lond.).* Vol 90, 301 – 313
- Jefferson R.A., Kanvanagh T.A., Bevan M.W.** 1987. GUS-fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal.* Vol. 6; 3901 – 3907
- Jung J.U., Kim Y.W., Kwak J.M., Hwang J.U., Young J., Schroeder J.I., Hwang I., Lee Y.** 2002. Phosphatidylinositol 3- and 4-Phosphate Are Required for Normal Stomatal Movements. *Plant Cell.* Vol. 14, 2399- 2412
- Kakimoto T.** 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 54, 605 – 627
- Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W., Barsam B., Veretnik S., Gribskov M.** 2002. The Complement of Protein Phosphatase Catalytic Subunits Encoded in the Genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 129, 908 – 925
- Kim D.H., Kang J.G., Yang S.S., Chung K.S., Song P.S., Park C.M.** 2002. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 14(12), 3043 – 56
- Kinoshita T., Nishimura M., Shimazaki K.I.** 1995. Cytosolic concentration of Ca²⁺ regulates the plasma membrane H⁺ - ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell.* Vol. 7, 1333 – 1342
- Kinoshita T. und Shimazaki K.I.** 2001. Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺ - ATPase in response to fusicoccin. *Plant Cell Physiol.* Vol. 42(4), 424 – 432
- Kohler C., Merkle T., Neuhaus G.** 1999. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Vol. 18(1), 97 – 104
- Kopka J., Provart N.J., Müller-Röber B.** 1997. Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J.* Vol. 11(4), 871 – 882
- Kolukisaoglu H.U., Bovet L., Klein M., Eggmann T., Geisler M., Wanke D., Martinoia E., Schulz B.** 2002. Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* Vol. 216(1), 107 – 119
- Krishna P.** 2003. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *J.Plant Growth Regul.* Vol. 22(3), 289 – 297
- Kudla J., Xu Q., Harter K., Griessem W., Luan S.** 1999. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *PNAS.* Vol. 96, 4718 – 4723
- Kursawe M.** 2002. Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie an der Universität Potsdam.
- Kwak J.M., Moon J.H., Murata Y., Kuchitsu K., Leonhardt N., DeLong A., Schroeder J.I.** 2002. Disruption of a Guard Cell-Expressed Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit, RCN1, Confers Abscisic Acid Insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 14, 2849 - 2861
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D.G., Schroeder J.I.** 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal.* Vol. 22(11), 2623 - 2633

- Kyte J. und Doolittle R.F.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Molecular Biology*. Vol. 157, 105 – 132
- Leckie C.P., MacAinsh M.R., Allen G.J., Sanders D., Hetherington A.M.** 1998. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *PNAS*. Vol. 95(26), 15837 – 15842
- Lee S., Choi H., Suh S., Doo I.S., Oh K.Y.** 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol*. Vol. 121, 147 – 152
- Lemoine R.** 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1465(1-2), 246 – 262
- Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E.A.C., Brearley C.A.** 2000. Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺ - inward rectifying conductance in guard cells. *PNAS*. Vol. 97(15), 8687 – 8692
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guerrier D., Cheddor F., Giraudat J.** 1994. *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1* – features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*. Vol. 264, 1448 – 1452
- Leung J., Merlot S., Giraudat** 1997. The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*. Vol. 9, 759 – 771
- Leymann B., Geelen D., Quintero F.J., Blatt M.R.** 1999. A Tobacco Syntaxin with a Role in Hormonal Control of Guard Cell Ion Channels. *Science*. Vol. 283, 537 – 540
- Leyman B., Geelen D., Blatt M.R.** 2000. Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco SNARE protein. *Plant J*. Vol 24(3), 369 – 381
- Li W.W., Luan S., Schreiber S.L., Assmann S.M.** 1994. Evidence for protein phosphatase 2A regulation of K⁺ channels in two types of leaf cells. *Plant Physiol*. Vol. 106, 963 – 970
- Li J. und Assmann S.M.** 1996. An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell*. Vol. 8, 1359 – 1368
- Li J., Lee Y.R.J., Assmann S.M.** 1998. Guard cells possess a calcium – dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol*. Vol. 116, 785 – 795
- Li J., Wang X.Q., Watson M.B., Assmann S.M.** 2000. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*. Vol. 287, 300 – 303
- Li L., He Z., Pandey G.K., Tsuchiya T., Luan S.** 2002. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J. Biological Chemistry*. Vol. 277, 5360 – 5368
- Liman E.R., Tytgat J., Hess P.** 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*. Vol. 9, 861 – 871
- Lin Q., Li J., Smith R.D., Walker J.C.** 1998. Molecular cloning and chromosomal mapping of type one serine/threonine protein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Bio*. Vol. 37, 471 – 481
- Lohse G. und Hedrich R.** 1992. Characterization of the plasma membrane H⁺ - ATPase from *Vicia faba* guard cells; modulation by extracellular factors and seasonal changes. *Planta*. Vol. 188, 206 – 214
- Luan S.** 1998. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends in Plant Sci*. Vol. 3(7), 271 - 275
- Luan S.** 2003. Protein Phosphatases in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. Vol. 54, 63 – 92
- Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J.M., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gripskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A., Guerinot M.L.** 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol. 126, 1646 – 1667

- Marcus A.I., Moore R.C., Cyr R.J.** 2001. The Role of Microtubules in Guard Cell Function. *Plant Physiol.* Vol 125, 387 – 395
- Martinoia E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu U., Müller-Röber B., Schulz B.** 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta.* Vol. 214(3), 345 – 355
- Matzke M.A., Matzke A.J.M., Pruss G.J., Vance V.B.** 2001. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Develop.* Vol. 11, 221 - 227
- Maurel C., Javot H., Lauvergeat V., Gerbeau P., Tournaire C., Santoni V., Heyes J.** 2002. Molecular Physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.* Vol 215, 105 – 148
- Miyamae S., Ueda O., Yoshimura F., Hwang J., Tanaka Y., Nikaido H.** 2001. A MATE Family Multidrug Efflux Transporter Pumps out Fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 45(12), 3341 – 3346
- Menke U.** 1999. Doktorarbeit an der Freien Universität Berlin
- Menke U., Renault N., Müller-Röber B.** 2000. *StGCPRP*, a potato gene strongly expressed in stomatal guard cells, defines a novel type of repetitive proline-rich proteins. *Plant Physiol.* Vol 122(3), 677- 686
- Mori I. und Muto S.** 1997. Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* Vol. 113, 833 – 840
- Morita Y., Kodama K., Shiota S., Mine T., Kataoka A., Mizushima T., Tsuchiya T.** 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein of *Vibrio parahaemolyticus*, and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* Vol. 42, 1778 – 1782
- Morita Y., Kataoka A., Shiota S., Mizushima T., Tsuchiya T.** 2000. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is a Na⁺ - driven multidrug efflux protein. *J. Bacteriology.* Vol. 182, 6694 – 6697
- Mott K.A. und Buckley T.N.** 2000. Patchy stomatal conductance: emergent collective behaviour of stomata. *Trends Plant Sci.* Vol. 5(6), 258 – 262
- Müller-Röber B., Ellenberg J., Provart N., Willmitzer L., Busch H., Becker D., Dietrich P., Hoth S., Hedrich R.** 1995. Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells. *EMBO Journal.* Vol. 14, 2409 – 2416
- Müller-Röber B., Ehrhardt T., Plesch G.** 1998. Molecular features of stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* Vol. 49, 293 – 304
- Müssig C., Fischer S., Altmann T.** 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol.* Vol. 129(3), 1241 – 1251
- Müssig C. und Altmann T.** 2003. Genomic Brassinosteroid Effects. *J. Plant Growth Regul.* Vol. 22(3), 313 – 324
- Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J.** 2002. *Arabidopsis* OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *Plant Cell.* Vol. 14, 3089 – 3099
- Nam K.H. und Li J.** 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell.* Vol. 110(2), 203 – 212
- Nambara E. und McCourt P.** 1999. Protein farnesylation in plants: a greasy tale. *Curr. Opin. in Plant Biol.* Vol. 2, 388 – 392
- Nawrath C., Heck S., Parinthewong N., Metraux J.P.** 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid - dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell.* Vol. 14, 275 – 286

- Nishino K. und Yamaguchi A.** 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. Vol. 183(20), 5803 – 5812
- Orsel M., Filleur S., Fraisier V., Daniel-Vedele F.** 2002. Nitrate transport in plants: which gene and which control? J. Exp. Bot. Vol. 53(370): 825 – 833
- Pei Z.M., Ward J.M., Harper J.F., Schroeder J.I.** 1996. A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. EMBO J. Vol. 15, 6564 – 6574
- Pei Z.M., Kuchitsu K., Ward J.M., Schwarz M., Schroeder J.I.** 1997. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. Plant Cell. Vol. 9, 409 – 423
- Pei, Z.M., Ghassemian M., Kwak C.M., McCourt P., Schroeder J.I.** 1998. Role of Farnesyltransferase in ABA Regulation of Guard Cell Anion Channels and Plant Water Loss. Science. Vol. 282, 287 – 290
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Schroeder J.I.** 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature. Vol. 406, 731 – 734
- Plesch G., Kamann E., Müller-Röber B.** 2000. Cloning of regulatory sequences mediating guard cell-specific gene expression. Gene. Vol. 249(1-2), 83 – 89
- Plesch G., Ehrhardt T., Müller-Röber B.** 2001. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. Plant J. Vol. 28(4), 455 – 464
- Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.** 2000. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 64(4), 672 – 693
- Rausch C. und Bucher M.** 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. Planta. Vol. 216(1), 23 – 37
- Rivas R., Vizcaino N., Buey R.M., Mateos P.F., Martinez-Molina F., Velazquez E.** 2001. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. J. Microbiological Methods. Vol. 47, 59 – 63
- Rogers E.E. und Guerinot M.L.** 2002. FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in *Arabidopsis*. Plant Cell. Vol. 14, 1787 – 1799
- Rosso M.G., Stritzhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B.** 2003. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. Plant Mol. Biol. Vol. 53(1-2), 247 – 259
- Rouquette-Loughlin C., Dunham S.A., Kuhn M., Balthazar J., Shafer W.M.** 2003. The NorM Efflux Pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* Recognize Antimicrobial Cationic Compounds. J. Bacteriol. Vol. 185(3), 1101 – 1106
- Saier M.H.** 2000. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 64(2), 354 – 411
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Irwin N., Ford N., Nolan Ch., Ferguson M., Ockler M., 2. Auflage. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sanders D., Brownlee C., Harper J.F.** 1999. Communicating with calcium. Plant Cell. Vol. 11; 691 – 706
- Sasse J.M.** 2003. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. J. Plant Growth Regul. Vol. 22(4), 276 – 288
- Schmidt C., Schelle I., Liao Y.J., Schroeder J.I.** 1995. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. PNAS. Vol. 92, 9535 – 9539
- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M., Waner D.** 2001. Guard Cell Signal Transduction. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. Vol. 52, 627 – 658

- Schwacke R., Schneider A., van der Graaf E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flüge U.I., Kunze R.** 2003. ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* Vol. 131(1); 16 – 26
- Seminarti E., Ueno Y., Tsukaya H., Iwakawa H., Machida C., Machida Y.** 2001. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development.* Vol. 128, 1771 – 1783
- Serrano E.E., Zeiger E., Hagiwara S.** 1988. Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts. *PNAS.* Vol. 85, 436 – 440
- Shaul O.** 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals.* Vol. 15(3), 309-323
- Shi, J., Kim K.N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S., Kudla J.** 1999. Novel Protein Kinases Associated with Calcineurin Sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Vol. 11, 2393 – 2405
- Shimazaki K., Iino M., Zeiger E.** 1986. Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature.* Vol. 319, 324 – 326
- Shiomi N., Fukuda H., Fukuda Y., Murata K., Kimura.** 1991. Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* Vol. 71, 211- 215
- Shiomi N., Fukuda H., Murata K., Kimura A.** 1995. Improvement of S-adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 42, 730 – 733
- Shiu S.H. und Bleecker A.B.,** 2001a. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *PNAS.* Vol 98 (19), 10763 – 10768
- Shiu S.H. und Bleecker A.B.,** 2001b. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function and signalling. *Sci. STKE.* Vol. 113; RE22
- Smith R.D. und Walker J.C.** 1993. Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* Vol. 21, 307 – 316
- Smith R.D und Walker J.C.** 1996. Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 47, 101 – 125
- Stacey G., Koh S., Granger C., Becker J.M.** 2002. Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci.* Vol. 7(6), 257 – 263
- Stadler R., Buttner, M., Ache P., Hedrich R., Ivashikina N., Melzer M., Shearson S.M., Smith S.M., Sauer N.** 2003. Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Vol. 133(2), 528-37
- Stark M.J.** 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast.* Vol. 12(16), 1647 – 1675
- Staxen I.I., Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M., MacAinsh M.R.** 1999. Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *PNAS.* Vol. 96(4), 1779 – 1784
- Stoutjesdijk P.A., Singh S.P., Liu Q., Hurlstone C.J., Waterhouse P.A., Green A.G.** 2002. hpRNA-Mediated Targeting of the *Arabidopsis FAD2* Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing. *Plant Physiol.* Vol. 129, 1723 – 1731
- Suh M.C., Cho H.S., Kim Y.S., Liu J.R., Lee H.S.** 1998. Multiple genes encoding serine/threonine protein phosphatases and their differential expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* Vol. 36(2), 315 – 322

- Sze H., Schumacher K., Müller ML., Padmanaban S., Taiz L.,** 2002. A simple nomenclature for a complex proton pump: *VHA* genes encode the vacuolar H⁺ - ATPase. *Trends in Plant Science*. Vol. 7, 157 – 161
- Talbott L.D. und Zeiger E.** 1996. Central roles for potassium and sucrose in guard cell osmoregulation. *Plant Physiol*. Vol. 111, 1051 – 1057
- Talke I.N., Blaudez D., Maathuis F.J., Sanders D.** 2003. CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci*. Vol. 8(6), 286 – 293
- Tchieu J.H., Fana F., Fink J.L., Harper J., Nair T.M., Niedner R.H., Smith D.W., Steube K., Tam T.M., Veretnik S., Wang D., Gribskov M.** 2003. The PlantsP and PlantsT Functional Genomics Databases. *Nucleic Acids Res*. Vol. 31(1), 342 – 344
- Tester M. und Davenport R.** 2003. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Ann. Bot*. Vol. 91, 503 – 527
- Theologis A.** 1998. Ethylene signalling: redundant receptors all have their say. *Curr. Biol*. Vol. 8 (24), R875 – 878
- Thiel G., MacRobbie E.A.C. Blatt M.R.** 1992. Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of stomatal guard cells. *J. Membr. Biol*. Vol. 126, 1 – 18
- Thiel G. und Blatt M.R.** 1994. Phosphatase antagonist ocadaic acid inhibits steady-state K⁺ - currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J*. Vol. 5, 727 – 733
- Thiel G. und Wolf A.H.** 1997. Operation of K⁺ - channels in stomatal movement. *Trends in Plant Sci*. Vol. 2(9), 339 – 345
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I.** 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *PNAS*. Vol. 97(9), 4991 – 4996
- Tijsterman M., Ketting R.F., Plasterk R.H.** 2002. The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet*. Vol. 36, 489 – 519
- Torre-Ruiz A., Torres J., Arino J., Herrero E.** 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. Vol. 277(36), 33468 – 33476
- Torsethaugen G., Pell E.J., Assmann S.M.** 1999. Ozone inhibits guard cell K(+) channels implicated in stomatal opening. *PNAS*. Vol. 96(23), 13577 – 13582
- Truernit E.** 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Curr. Biol*. Vol. 11(5), R169 – 171
- Tsuchiya T. und Shinoda S.** 1985. Respiration-driven Na⁺ pump and Na⁺ circulation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol*. Vol. 162, 794 – 798
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** 2001. Plant histidine kinases. An emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci.STKE*, 2001(109), RE 18
- Van den Brule S. und Smart C.C.** 2002. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*. Vol. 216(1), 95 – 106
- Van Houdt H., Van Montagu M., Depicker A.** 2000. Both sense and antisense RNAs are targets for the sense transgene-induced posttranscriptional silencing mechanism. *Mol. Gen. Genet*. Vol. 263, 995 – 1002
- Vervliet G., Holster M., Teuchy H., van Montagu M., Schell J.,** 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages on *Agrobacterium* strains. *J. Genetic Virology*. Vol. 26; 33 – 48
- Very A.A. und Sentenac H.** 2002. Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci*. Vol. 7(4), 168 – 175
- von Wiren N., Gazzarrini S., Gojon A., Frommer W.B.** 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Opin. Plant Biol*. Vol. 3(3), 254 – 261

- Wang X.Q., Wu W.H., Assmann S.M.** 1998. Differential responses of abaxial and adaxial guard cells of broad bean to abscisic acid and calcium. *Plant Physiol.* Vol. 118(4), 1421 – 1429
- Ward M.W.** 2001. Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics.* Vol. 17(6), 560 – 563
- Weber M.W.** 1999. Endogenous Ion Channels in Oocytes of *Xenopus laevis*. Recent Developments. *J. Membrane Biol.* Vol. 170, 1 – 12
- White P.J., Bowen H.C., Demidchik V., Nichols C., Davies J.M.** 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1564(2), 299 – 309
- Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L.** 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1465(1-2), 104 – 126
- Wipf D., Ludewig U., Tegeder M., Rentsch D., Koch W., Frommer W.B.** 2002. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* Vol. 27(3), 139 – 147
- Wolff A.M., Petersen J.G., Nilsson-Tillgren T., Din N.** 1999. The open reading frame *YAL048c* affects the secretion of proteinase A in *S. cerevisiae*. *Yeast.* Vol. 15(5), 427 – 343
- Wyrzykowska J., Pien S., Shen W.H., Fleming A.J.** 2002. Manipulation of leaf shape by modulation of cell division. *Development.* Vol. 129, 957 – 964
- Yang S., Clayton S.R., Zechiedrich E.L.** 2003. Relative contribution of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* Vol. 51(3), 545 – 556
- Xu X.J., Su X.Z., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.** 2003. Molecular Cloning and Characterization of the HmrM Multidrug Efflux Pump from *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiol. Immunol.* Vol. 47, 937 – 943
- Yoshimoto N., Takahashi H., Smith F.W., Yamaya T., Saito K.** 2002. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* Vol. 29(4), 465-473
- Zähndler, V.** 2000. Studienarbeit an der Humboldt Universität Berlin
- Zolnierowicz S. und Bollen M.** 1999. EMBO Conference report - Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO.* Vol. 19(4), 483 - 488

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt ...

Herrn Professor Dr. Müller-Röber für die Überlassung des interessanten Themas, die großen Freiräume, die er mir bei meiner Arbeit einräumte, und die Unterstützung in den ganzen Jahren.

Herrn Professor Dr. Willmitzer für das Bereitstellen der großartigen Infrastruktur am Max-Planck-Institut und für wertvolle Diskussionen.

allen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes, die diese Infrastruktur am Laufen halten.

der ganzen MÜRö-Gruppe für die nette und kollegiale Atmosphäre. Die drei Jahre mit Euch haben mir die Möglichkeit gegeben, vieles zu lernen.

Mandy, Susan, Blazej und Fabien, die mit mir im NIC-Team zusammengearbeitet haben.

Herrn Dr. Wayne Coco und Herrn Dr. Ulrich Kettling von der Direvo AG, die mir durch großzügige Urlaubsregelungen den nötigen Freiraum zum Verfassen dieser Arbeit einräumten.

Julia, Andreas, Natalie, Jochen, Uta, Jule, Johann, Dirk, Tante Putti, meinem Vater, Tine, Christina, Sabine, Mandy, Fabien, Heiko, Iris, Marlene, Stephan, Susanne, Oliver und Andi für Eure Hilfe in den letzten zwei Jahren.

Silke.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Köln, im Oktober 2004

Klaus Pellengahr