

Die *AtMRS2*-Genfamilie: Untersuchungen zur entwicklungs-/
gewebespezifischen Expression in *Arabidopsis thaliana* und
Protein-Proteininteraktionsanalysen mit dem *mating based*
Split-Ubiquitin-System in Hefe

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Karoline Meschenmoser

geboren am 25.01.1979 in Frankfurt am Main

Bonn, April 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. Volker Knoop
2. Gutachter: Professor Dr. Lukas Schreiber

Tag der Promotion: 03.07.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Funktion von Magnesium in der Zelle	9
1.2 Magnesiumtransportsysteme	10
1.2.1 Prokaryotische Magnesiumtransporter	10
1.2.2 Tierische und pilzliche Magnesiumtransporter	14
1.2.3 Pflanzliche Magnesiumtransporter	15
1.2.4 Funktionen und Wirkungen von Spurenelementen bzw. Schwermetallen.....	19
1.3 Ziele der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Pflanzenmaterial	23
2.1.2 Bakterienstämme	23
2.1.3 Hefestämme	23
2.1.4 Vektoren	23
2.1.5 verwendete Software	25
2.1.6 Primersequenzen.....	26
2.1.7 Laborgeräte.....	26
2.1.8 Reaktionskits	27
2.1.9 Restriktionsendonukleasen	28
2.1.10 Chemikalien.....	28
2.1.11 Medien	30
2.1.12 Antibiotika-Stammlösungen 1000 x.....	34
2.1.13 Zubehör zur Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Allgemeine Methoden der Molekularbiologie	36
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien	37
2.2.3 GATEWAY™-System der Firma Invitrogen.....	39
2.2.4 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
2.2.5 Sterilisation und Aussaat von Samen	46
2.2.6 GUS-Aktivitätsnachweis	46
2.2.7 Übersicht über den Klonierungsablauf Promotor:GUS.....	48
2.2.8 Herstellung von Semi-Dünnschnitten (<i>Arabidopsis</i> -Fixierung für die Elektronenmikroskopie)	49
2.2.9 Arbeiten mit Hefe	50
2.2.10 Grundlagen zum mating based Split-Ubiquitin-System.....	51
2.2.11 Übersicht über den Klonierungsablauf: Das mating based Split-Ubiquitin-System	63
3 Ergebnisse.....	65
3.1 Expressionsanalyse der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie	66
3.1.1 Analyse der GUS-Färbung unter Standardbedingungen	68
3.1.2 Einfluss von Licht auf die Expression der chloroplastidär lokalisierten Magnesiumtransporter <i>AtMRS2-4</i> und <i>AtMRS2-11</i>	77
3.1.3 Expression der <i>AtMRS2</i> -Magnesiumtransporter unter Einfluss von Schwermetallen	78
3.1.4 Einfluss von Verwundungen auf die Promotoraktivität	87
3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse der Promotoraktivität.....	91
3.2 Analysen von Protein-Protein-Wechselwirkungen über das <i>mating-based</i> Split-Ubiquitin-System in Hefe	93
3.2.1 Methodischer Ablauf zur Herstellung der Konstrukte für das <i>mating based</i> Split- Ubiquitin-System.....	94
3.2.2 <i>in vivo</i> Klonierung in der Hefe	95

3.2.3 Ergebnisse der Protein-Proteininteraktions-Analysen mit dem <i>mating based</i> Split-Ubiquitin-System.....	96
4 Diskussion	107
4.1 Expressionsmuster der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie	108
4.1.1 Vergleich der Ergebnisse mit Microarray-Datenbanken	114
4.2 Einfluss von Licht auf die Expression von <i>AtMRS2-4</i> und <i>AtMRS2-11</i>	117
4.3 Einfluss von Schwermetallen auf das Expressionsmuster der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie.....	119
4.4 Magnesiumtransporter und Verletzungsinduktion	123
4.5 Analysen des Promotors auf cis-aktive Elemente	124
4.6 Protein-Proteininteraktionsanalysen mit dem <i>mating based</i> Split-Ubiquitin-System.....	127
5 Ausblick.....	129
6 Zusammenfassung	131
7 Summary.....	133
8 Anhang	134
8.1 Abbildungsverzeichnis	134
8.2 Tabellenverzeichnis	135
8.3 Oligonukleotidsequenzen	136
8.4 Abkürzungsverzeichnisse	140
9 Literaturverzeichnis	144
10 Danksagung	155
Erklärung	157
Lebenslauf	158

1 Einleitung

Die Pflanze benötigt zum Aufbau von Biomasse mineralische Nährstoffe und Wasser. Einige Elemente sind essentiell, d.h. die Pflanze kann ohne sie nicht überleben. Die essentiellen Elemente werden entsprechend ihrem Anteil in der Pflanze, in Makro-Elemente und Mikro-Elemente eingeteilt. Den zum Aufbau organischer Substanz benötigten Kohlenstoff und Sauerstoff nimmt die Pflanze aus dem CO₂ und dem O₂ der Atmosphäre und der Bodenluft, Wasserstoff erhält sie aus dem „Bodenwasser“. Zu den Makro-Elementen gehören Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphor, Stickstoff und Schwefel. Zu den Mikro-Elementen gehören Bor, Chlor, Eisen, Kupfer, Mangan, Molybdän, Nickel und Zink. Diese essentiellen Elemente werden, wie auch weitere nützliche Elemente wie Silicium, Natrium und Kobalt aus dem Nährstoffvorrat des Bodens aufgenommen. Die so genannten „nützlichen Elemente“ fördern das Wachstum und die Resistenz der Pflanze. Verfügbarkeit und Konzentration der mineralischen Nährstoffe stellen den limitierenden Faktor für das Wachstum der Pflanze dar. Fehlt eines der für das Wachstum essentiellen Elemente oder liegt ein Mangel vor, dann zeigt sich dies zunächst durch ein verzögertes bzw. reduziertes Wachstum und Pigmentstörungen. Im fortgeschrittenen Stadium treten Aufhellungen und Nekrosen auf. Schließlich stirbt die Pflanze ab (Epstein und Bloom 2005, Hermans und Verbruggen 2005, Marschner 1995). Magnesiummangel beginnt zunächst mit einer Chlorose zwischen den Adern der älteren Blätter, später kommt es zu einer Gelbfärbung oder Weißfärbung und schließlich zum Abfallen der Blätter (Hermans und Verbruggen 2005, Taiz und Zeiger 2002).

Mineralische Nährstoffe liegen meistens in ionisierter Form an Bodenpartikel gebunden oder im „Bodenwasser“ gelöst vor. Die Löslichkeit aus den Komplexen mit den Bodenpartikeln und somit ihre Verfügbarkeit im Bodenwasser, ist stark abhängig vom pH-Wert. Wurzeln und Wurzelhaare bilden eine große Oberfläche und ermöglichen der Pflanze dadurch eine effiziente Aufnahme von gelösten Ionen, auch wenn diese nur in niedrigen Konzentrationen vorliegen. Die Aufnahme kann apoplastisch über Diffusion durch die Zellzwischenräume oder symplastisch über den Transport von Zelle zu Zelle durch das Cytoplasma über die Plasmodesmata erfolgen. Im Allgemeinen sind Ionen in der Pflanze an der Stabilität der Membranstruktur, als Cofaktor im Stoffwechsel und dem Aufrechterhalten des osmotischen Gleichgewichts in der Zelle beteiligt (Epstein und Bloom 2005, Marschner 1995). Die Pflanze benötigt Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff zum Aufbau wichtiger Grundstrukturen wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Pektine und Fette und sekundärerer Inhaltsstoffe der Pflanze wie zum Beispiel organische Säuren, Wachse, Lignine oder Gerbstoffe (Amberger 1996).

1 Einleitung

Phosphor, Stickstoff und Schwefel werden zum Aufbau physiologisch und strukturell relevanter Verbindungen wie Aminosäuren, Proteinen, Nukleinsäuren und Phospholipiden gebraucht. Phosphat kann durch Reaktion mit organischen Verbindungen neue energiereiche Verbindungen aufbauen, die als Energie-Lieferant wie ATP oder Acetyl-CoA für den Stoffwechsel dienen. Bor und Silicium sind an Aufbau und Stabilität von Membranen und Zellwänden beteiligt. Chlor besitzt einen Einfluss auf die Wasserabspaltung bei der Photosynthese. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} dienen als Cofaktoren und sind somit wichtig für die Funktion von Enzymen und Redox-Reaktionen (Taiz und Zeiger 2002).

1.1 Funktion von Magnesium in der Zelle

Magnesium ist eines der am häufigsten vorkommenden divalenten Kationen in der Biosphäre (Maguire und Cowan 2002). Es ist essentiell für eine Vielzahl biochemischer Prozesse in der pflanzlichen und tierischen Zelle. Magnesium dient dort als Cofaktor für viele Enzyme, darunter ATPasen, Proteinkinasen, Phosphatasen, Carboxylasen, die Glutathionsynthase und den Enzymen des Nukleotidstoffwechsels. Als Brückenelement verbindet sich Magnesium vorzugsweise mit Phosphoryl-Gruppen und N-Basen, z.B. Adenin, Polyphosphaten (ATP), anionischen Proteingruppen, Nukleinsäuren und Phospholipiden zu makromolekularen Komplexen. Es besitzt eine ausgeprägte Neigung zur Komplex-Bildung mit nukleophilen Liganden und dient meistens im Komplex mit ATP als Cofaktor für die meisten ATPasen und Phosphorylierungsreaktionen. Magnesiummangel beeinträchtigt die Synthese der Ribonukleinsäure und der Ribosomenkonfiguration (Amberger 1996, Fraústo da Silva und Williams 1991). In der Proteinbiosynthese ist Magnesium an der Aggregation der Ribosomenuntereinheiten beteiligt (Marschner 1995, Shaul 2002). Die wohl bekannteste Funktion in der Pflanzenzelle erfüllt Magnesium als Zentralatom des Chlorophylls und als Bestandteil des Protopektins. Die Enzyme, die den Einbau des Magnesiums in den Porphyrinring des Chlorophylls, bzw. die Freisetzung beim Abbau des Chlorophylls vermitteln, werden ebenfalls durch Magnesium reguliert (Marschner 1995).

Schwankungen in der Magnesiumkonzentration wirken sich auch auf die CO_2 -Assimilierung im Calvin-Zyklus aus, da die Aktivität einiger Enzyme der Kohlenstoff-Assimilation, wie die der Rubisco, eine starke Abhängigkeit von Magnesium aufweisen (Ettinger et al. 1999, Heldt 1979).

1.2 Magnesiumtransportsysteme

Membranen stellen Barrieren für Ionen wie Magnesium dar. Es besteht die Notwendigkeit von Transportsystemen in Form von Poren, Kanälen oder Transportern, die den Übergang der Ionen zwischen den einzelnen durch Membranen getrennten Kompartimente vermitteln.

Magnesium weist einzigartige physiko-chemische Eigenschaften auf: Im hydratisierten Zustand mit sechs oktahedral gebundenen Wassermolekülen besitzt es ein 400 x größeres Volumen als in der ionisierten, nicht-hydratisierten Form. Ein besonderes Transportsystem ist notwendig um die Bindung des Magnesiumions und den eigentlichen Transport über die Membran durch die Pore zu bewerkstelligen (Maguire und Cowan 2002).

1.2.1 Prokaryotische Magnesiumtransporter

In Bakterien sind drei Typen von Magnesiumtransportproteinen bekannt. Das *MgtE*, *MgtA/B* und das *CorA*-System (Kehres und Maguire 2002). Sie wurden in *Salmonella typhimurium* untersucht.

Die *MgtA/MgtB*-Magnesiumtransportproteine gehören zur Familie der P-Typ-ATPasen. Sie besitzen Ähnlichkeiten zur homologen H^+ -ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* und der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums bei Säugern. Das *MgtA/B*-Transportsystem besitzt zehn Transmembrandomänen, C- und N-Terminus liegen im Cytoplasma (Abbildung 1.0 1). Zum Transport von Magnesium gegen den elektrochemischen Gradienten benötigt dieses System ATP. *MgtA* und *MgtB* vermitteln zusätzlich zur Magnesiumaufnahme auch die Aufnahme von Nickel.

Das *MgtA/B*-Magnesiumtransportsystem wird im Gegensatz zu dem *MgtE*- und dem *CorA*-System nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch niedrige Magnesiumkonzentrationen induziert. Durch das PhoPQ-zwei-Komponenten-System erfolgt die Regulation. Liegt Magnesium an PhoQ, einer membrangebundenen Sensor-Kinase gebunden vor, dann ist PhoQ inaktiv. Sinkt die extrazelluläre Magnesiumkonzentration, dann dissoziiert das Magnesiumion. PhoQ phosphoryliert PhoP und dieses aktiviert bzw. reprimiert die Transkription von über vierzig Genen. Hierzu gehören die Gene für die *MgtA* und *MgtB* Magnesium-Transportproteine (Moncrief und Maguire 1999).

1 Einleitung

Das *MgtE*-Transport-System wurde ursprünglich aus *Providencia stuarti* isoliert. Das Transportprotein besitzt mindestens vier, wahrscheinlich aber fünf Transmembrandomänen (Abbildung 1.0 1) und wird konstitutiv exprimiert (Kehres und Maguire 2002, Smith et al. 1995). Neueste Untersuchungen zeigten für den *MgtE*-Transporter eine Dimer-Kristall-Struktur in *Thermus thermophilus* (Hattori et al. 2007).

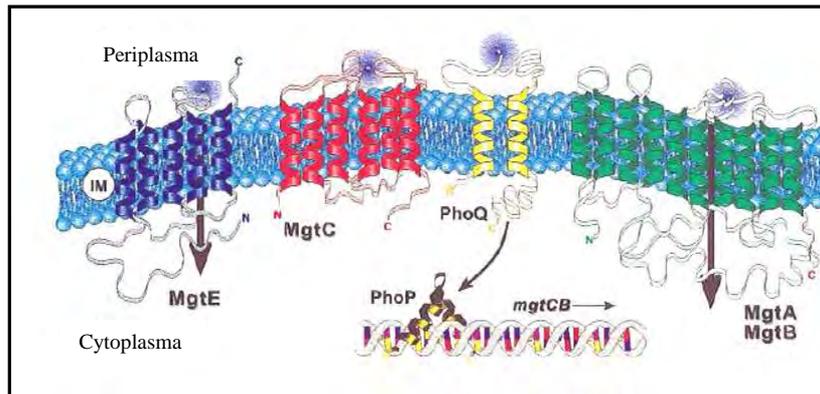


Abbildung 1.0 1: Struktur der prokaryotischen Magnesiumtransportproteine in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [entnommen aus (Moncrief und Maguire 1999)]

Auf der linken Seite der Abbildung wird der *MgtE*-Transporter mit fünf Transmembrandomänen (dunkelblau) schematisch dargestellt. Der C-Terminus liegt im Periplasma, der N-Terminus liegt im Cytoplasma. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die *MgtA/B*-Proteine in grün schematisch dargestellt, der C- und der N-Terminus liegen im Cytoplasma. Beide Systeme, *MgtA/B* und *MgtE* vermitteln die Aufnahme des Magnesiums. In der Mitte der Abbildung wird in rot eine *MgtC*-Untereinheit mit sechs Transmembrandomänen abgebildet. C- und N-Terminus liegen im Cytoplasma. Die Funktion des *MgtC*-Transportsystems ist bisher nicht bekannt. In gelb ist das PhoP/Q-Zwei-Komponenten System dargestellt. Das PhoP/Q-System vermittelt die Regulation des *MgtA/B*-Systems.

Das *CorA*-Magnesium-Transportsystem (Abbildung 1.0 2) wurde als erstes Magnesium-Transportsystem in *Escherichia coli* entdeckt (Hmiel et al. 1986, Lusk und Kennedy 1969, Nies und Silver 1989, Silver 1969, Silver und Clark 1971). Eine Mutation des Gens verleiht der Zelle, sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Salmonella typhimurium* eine Resistenz gegen Kobalt (Cobalt resistance protein) (Hmiel et al. 1986, Hmiel et al. 1989, Lusk und Kennedy 1969, Nelson und Kennedy 1971). Dieses Membrantransportsystem stellt eine vollkommen neue Klasse von Membrantransportproteinen dar. Es zeigt keine erkennbaren Homologien zu den anderen, bisher bekannten Membran-Transportsystemen (Kehres und Maguire 2002). *CorA* tritt universell bei Bakterien und Archaeobakterien auf und stellt hier den basalen Transportmechanismus für Magnesium dar. Da einzelne Mutationen in den Genen der *CorA*-Transportproteine in *Salmonella typhimurium* keinen erkennbaren Phänotyp zeigen, wird eine Kompensation durch die *MgtA/B*- und das *MgtE*-System vermutet (Kehres und Maguire 2002). In *Salmonella typhimurium* wird *CorA* konstitutiv exprimiert, es gehört

1 Einleitung

zu den housekeeping Genen und ist essentiell für die Funktion der Zelle. Veränderungen der Magnesiumkonzentration zeigen somit keine Auswirkungen auf die Expression. Das bakterielle CorA-Protein vermittelt außer der Magnesiumaufnahme den Influx von Kobalt und Nickel bei unnatürlich hohen Konzentrationen im Medium (Hmiel et al. 1986, Smith et al. 1993, Snavely et al. 1989).

Eine CorA-Untereinheit (Abbildung 1.0 2) in *Thermotoga maritima* besteht aus einer 240 Aminosäuren langen N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne und einem kurzen C-Terminus. In der Nähe des C-Terminus liegen zwei Transmembrandomänen (Knoop et al. 2005, Smith et al. 1993). Am Ende der ersten Transmembrandomäne liegt das für den Magnesium-Transport essentielle, stark konservierte GMN-Motiv (Smith et al. 1993). Wird das GMN-Motiv mutiert, dann erfolgt kein Magnesiumtransport mehr (Kolisek et al. 2003). Da zwei Transmembrandomänen zu wenig sind, um eine Pore oder einen Kanal zu bilden wird vermutet, dass ein Oligomer vorliegen muss (Moncrief und Maguire 1999, Smith et al. 1993). Durch Analyse der Kristallstruktur konnte kürzlich eine Homo-Pentamerstruktur in *Thermotoga maritima* gezeigt werden (Lunin et al. 2006).

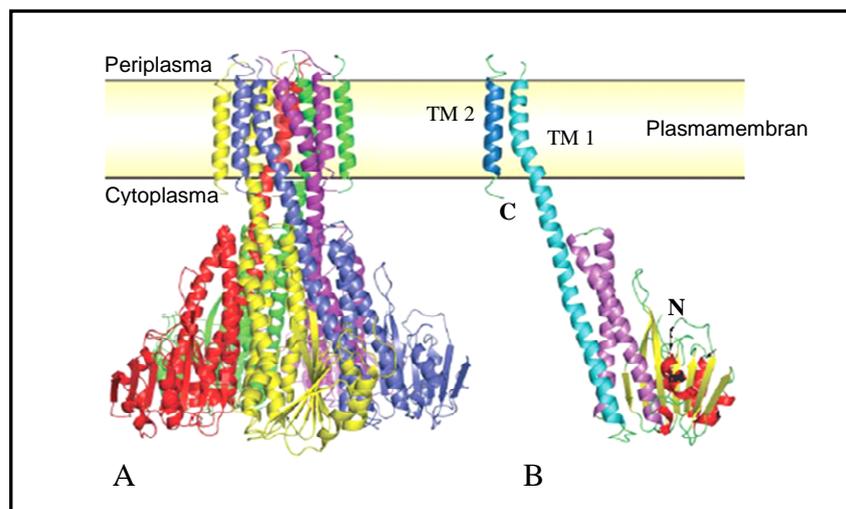


Abbildung 1.0 2: Kristallstruktur des bakteriellen CorA-Transporterproteins in *Thermotoga maritima* verändert nach (Lunin et al. 2006)

A) stellt schematisch die Homo-Pentamerstruktur des bakteriellen CorA-Transportsystems dar. B) zeigt eine der fünf CorA-Untereinheiten im Detail. Die Transmembrandomäne TM1 ist in hellblau dargestellt, Transmembrandomäne 2 in dunkelblau. Carboxy- und Amino-Terminus sind durch „C“ bzw. „N“ gekennzeichnet. Beide Transmembrandomänen liegen im Cytoplasma.

Für die Ausbildung der Pentamerstruktur wird eine Interaktion der Untereinheiten über *coiled coil*-Domänen vermutet. *Coiled coil*-Motive bestehen aus helikal angeordneten Aminosäuren, die sich zur Ausbildung multipler Strukturen in einer Superhelix umeinanderwinden. Die

1 Einleitung

Primärsequenz im Bereich der Assimilierung besteht aus einer charakteristischen Abfolge von sieben Aminosäuren (a-b-c-d-e-f-g)_n. An den Positionen „a“ und „d“ liegen hydrophobe Aminosäuren (Abbildung 1.0 3). Die anderen Positionen sind mit polaren und geladenen Aminosäuren besetzt. Es kommt so zu einer Ausbildung einer aliphatischen Helix, bei der alle hydrophoben Aminosäuren im Innern der α -helikalen Struktur liegen (Lupas 1996).

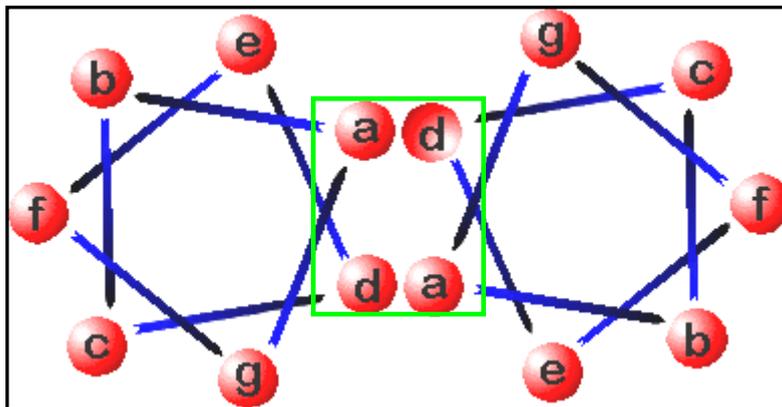


Abbildung 1.0 3: Schematische Darstellung der Primärsequenz eines *coiled coil*-Motivs [(verändert nach (Lupas 1996)]

Dargestellt ist der charakteristische Sequenzbereich einer *coiled coil*-Domäne im Bereich der Interaktion zweier Helices. Das *coiled coil*-Motiv besteht aus einer Abfolge von sieben Aminosäuren (a-b-c-d-e-f-g)_n. „a“ und „d“ sind hydrophobe Aminosäuren, die anderen Positionen sind mit polaren und geladenen Aminosäuren besetzt. Bei der Ausbildung der Helix liegen die hydrophoben Aminosäuren „a“ und „d“ im Innern der Helix (Core). Die Bereiche mit den hydrophilen, polaren Aminosäuren sind dem Cytoplasma zugewandt.

Entdeckt wurde das *coiled coil*-Motiv 1953 durch Pauling und Corey als Bestandteil des Cytoskellets (Intermediärfilamente), sowie von Keratin, Myosin und Fibrinogen. Am häufigsten wird eine Beteiligung des *coiled coil*-Motivs bei der Dimerisierung von Proteinen beobachtet (CAP= catabolite gene activator protein; Transkriptionsfaktoren wie Leucin zipper Proteine). Neuere Analysen zeigen eine Beteiligung der *coiled coil*-Domäne an der Ausbildung von Kaliumkanälen bei Säugern und Pflanzen (AtKAT1, AtAKT1) (Ludwig et al. 1997, Obrdlik et al. 2004). In Pflanzen wurde zudem eine Interaktion von G-Proteinuntereinheiten durch *coiled coil*-Domänen entdeckt (Obrdlik et al. 2000).

1.2.2 Tierische und pilzliche Magnesiumtransporter

In *Saccharomyces cerevisiae* wurden mehrere Homologe zum bakteriellen CorA-System gefunden. ALR1 und ALR2 zeigen in *Saccharomyces cerevisiae* eine Lokalisation in der Plasmamembran. Eine Überexpression verleiht der Zelle eine Resistenz gegen Aluminium, die hier namensgebend ist (Aluminium resistance protein 1 und 2). Untersuchungen der ALR-Proteine lassen vermuten, dass sie den Import und Export von Magnesium vermitteln können (Graschopf et al. 2001, MacDiarmid und Gardner 1998). Zusätzlich zu ALR1 und ALR2 besitzt *Saccharomyces cerevisiae* die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Proteine LPE10 und MRS2. LPE10 liegt mit beiden Termini in der Matrix. Mutationen von LPE10 führen zu einem „petite“ Phänotyp. Die Hefe kann nicht mehr auf nicht-fermentierbarem Medium wachsen und weist Defekte beim Spleißen von RNA auf. MRS2 (Mitochondrial RNA splicing factor II) ist kerncodiert und wurde in *Saccharomyces cerevisiae* als Spleißfaktor für mitochondriale Gruppe II Introns charakterisiert (Gregan et al. 2001, Wiesenberger et al. 1992). Mutationen des *mrs2*-Gens führen ebenfalls zu einem „petite“-Phänotyp der Hefe. Untersuchungen haben gezeigt, dass MRS2 Magnesium transportiert und dass auch in diesen Transportern das GMN-Motiv essentiell für den mitochondrialen Magnesiumtransport ist (Bui et al. 1999, Kolisek et al. 2003). ALR1/2, LPE10 und MRS2 besitzen wie auch das bakterielle CorA-Protein eine lange N-terminale Domäne und in der Nähe des C-Terminus zwei Transmembrandomänen. Am Ende der ersten der beiden Transmembrandomänen, liegt in einem kurzen hydrophilen Bereich das universell konservierte GMN-Motiv (Gly-Met-Asn). C- und N-Terminus liegen bei MRS2 in der Matrix (Abbildung 1.0 6). In Vertebraten liegt jeweils nur eine *MRS2*-Kopie vor (Knoop et al. 2005).

Bei Säugern vermitteln die Proteine TRPM6/TRPM7 (Transient Receptor Protein) den Magnesiumtransport über die Plasmamembran. Sie gehören zu einer Familie von Kationen-Transportern (Chubanov et al. 2004, Schmitz et al. 2003). In Säugern stellt Magnesium nach Calcium eines der am häufigsten vorkommenden Kation im Körper dar. Der Gesamtgehalt des Magnesiums liegt bei 24 g/kg Körpergewicht, davon befinden sich 20 % in der Muskelzelle und 50–60 % gebunden im Knochen. Magnesiummangel führt im Körper zu Verkrampfungen der Muskelzellen, Arteriosklerose und Herzproblemen (Sigel und Sigel 1990).

1.2.3 Pflanzliche Magnesiumtransporter

In der pflanzlichen Zelle dient Magnesium als Cofaktor für eine Vielzahl von Enzymen. Magnesium ist das Zentralatom des Chlorophylls und wird somit in allen chlorophyllhaltigen Geweben benötigt. Die Aufnahme des Magnesiumions erfolgt über die Wurzel und wird dann über den Spross in Blätter und Blüten transportiert. Die Aufnahme über die Wurzel kann über den Symplasten, von Zelle zu Zelle durch die Plasmodesmata oder durch Diffusion über die Zellzwischenräume bis zur Endodermis erfolgen (Abbildung 1.0 4). Für den Transfer über die Endodermis, die als Diffusionsbarriere dient, werden Transportproteine benötigt. Spätestens an dieser Stelle muss der Eintritt in den Symplasten erfolgen (Shaul 2002).

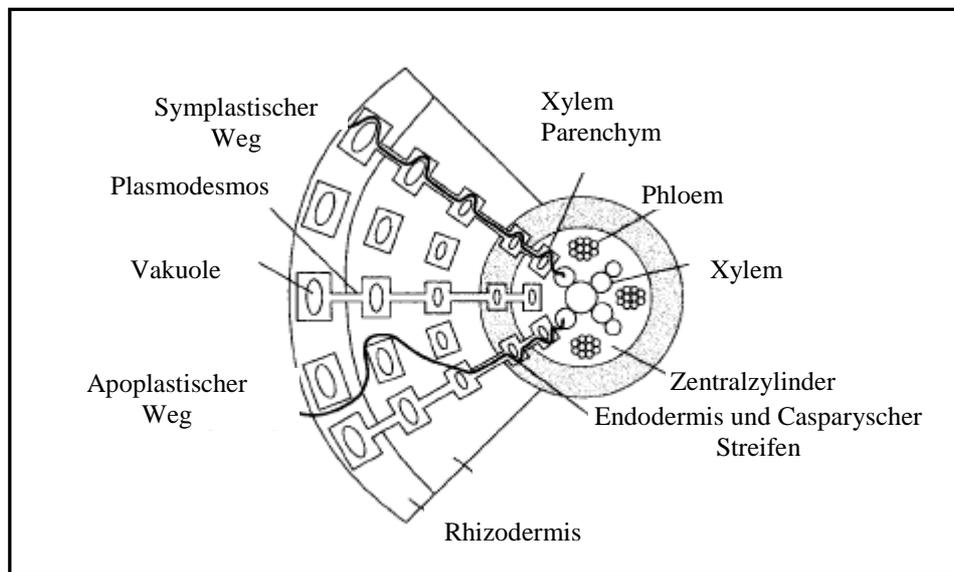


Abbildung 1.0 4: Schematische Darstellung der Ionenaufnahme durch die Wurzel (verändert nach (Shaul 2002)).

Dargestellt wird der Weg der Ionen aus dem Nährmedium über die Wurzel in den Zentralzylinder. Die Aufnahme kann durch Diffusion über die Zellzwischenräume (apoplastischer Transport) bis zur Endodermis erfolgen. Die Endodermis stellt aufgrund der hydrophoben Bestandteile (Lignineinlagerungen in den Zellen des Casparyschen Streifens der Endodermis) eine Diffusionsbarriere für Ionen dar. Ionen müssen an dieser Stelle in die Zelle aufgenommen werden, damit ein Transport in den Zentralzylinder erfolgen kann. Der symplastische Transport erfolgt, nachdem Ionen in die Zellen aufgenommen wurden von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata bis in das Leitgewebe der Stele, dem Zentralzylinder. Von hier aus erfolgt der Langstreckentransport im Wasser gelöster Ionen mit dem Transpirationsstrom über das Xylem.

Bisher ist nur sehr wenig über Regulationsmechanismen für den Erhalt des Magnesiumgleichgewichts in der pflanzlichen Zelle, sowie die Aufnahme und den Transport in der Pflanze bekannt. Als erstes wurden in *Hevea brasiliensis* (Gummibaum) und der Vakuole der Wurzel von *Zea mays* ein Mg^{2+}/H^{+} -Transporter identifiziert, über Homologe in *Arabidopsis thaliana* war zunächst nichts bekannt (Marschner 1995).

1 Einleitung

Der erste Magnesiumtransporter wurde in *Arabidopsis thaliana* 1999 entdeckt. Der Transporter AtMHX (*Arabidopsis thaliana* Magnesium proton exchanger) ist ein Mg^{2+}/H^{+} - und Zn^{2+}/H^{+} - Antiporter. Er zeigt eine Lokalisation in der Vakuole und den Xylemparenchymzellen, und scheint den Transport über die vakuoläre Membran zu vermitteln. Die Expressionsdaten lassen eine Beteiligung bei der Be- bzw. Entladung des Xylems vermuten (Shaul 2002). AtMHX besitzt elf vorhergesagte Transmembrandomänen und transportiert außer Magnesium auch Zink und Eisen (Shaul et al. 1999).

In *Arabidopsis thaliana* wurden elf Homologe zum MRS2-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (*AtMRS2-X*-Genfamilie: *Arabidopsis thaliana* MRS2) identifiziert, diese wurden von eins bis elf durchnummeriert. Zeitgleich arbeitete die Gruppe um Li (2001) mit der Genfamilie im Ökotyp Landsberg. Sie benannten die Mitglieder der Genfamilie mit *AtMGT* (*Arabidopsis thaliana* Magnesium transport) eins bis zehn. Im Ökotyp Columbia liegen elf Mitgliedern vor, darunter befinden sich zwei Pseudogene (*AtMRS2-8* und *AtMRS2-9*). Eine erweiterte Datenbanksuche brachte vier neue, aber weiter entfernte Mitglieder (Abbildung 1.0 5).

In *Oryza sativa* wurden elf Homologe (siehe Abbildung 1.0 5) gefunden (Knoop et al. 2005).

1 Einleitung

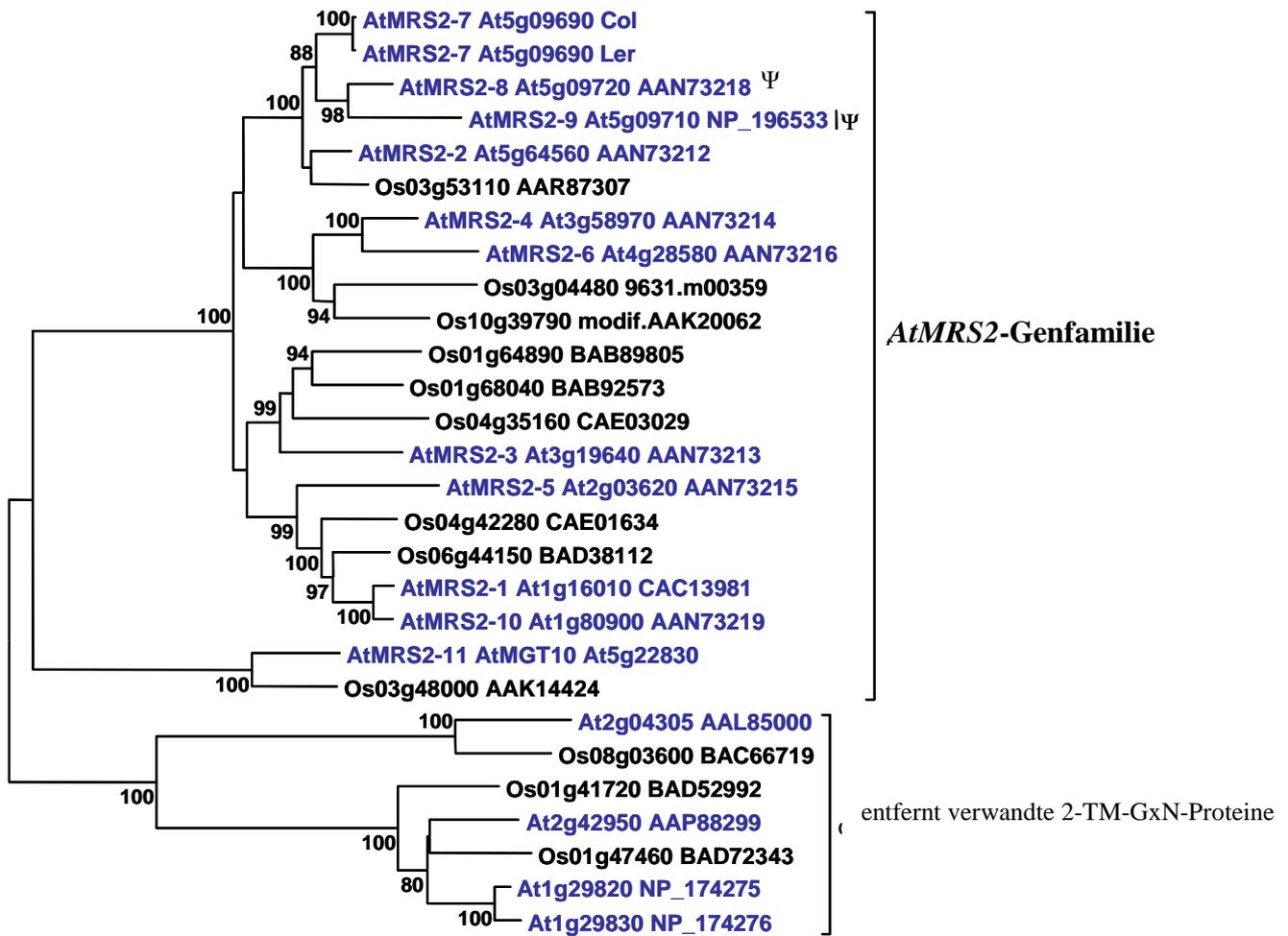


Abbildung 1.0 5: Phylogramm der Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* (*At*) und der Homologen in *Oryza sativa* (*Os*) (verändert nach (Knoop et al. 2005) basierend auf Proteinsequenzen).

Die angegebenen *accession numbers* der Gene und ggf. der Proteine finden sich unter: NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Die *AtMRS2*-Genfamilie besteht aus elf Kernmitgliedern, darunter die Pseudogene *AtMRS2-8* und *AtMRS2-9*, gekennzeichnet durch Ψ. Die Gene, bei denen Unterschiede in der Sequenz bestehen sind durch die entsprechende Angabe des Ökotypen gekennzeichnet (Col: *Columbia*, Ler: *Landsberg erecta*). Der Stammbaum wurde mit dem *neighbour joining* Verfahren mit Poisson-Korrektur und *pairwise gap deletion* erstellt. Es wurden nur *Bootstrap*-Werte von über 70 % bei 1000 Replikaten angegeben.

1 Einleitung

Alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie zeigen einen charakteristischen Aufbau. Sie bestehen wie das bakterielle CorA-Protein und das Homologe MRS2 in *Saccharomyces cerevisiae* aus einer langen N-terminalen Domäne (Abbildung 1.0 6). In der Nähe des sehr kurzen C-Terminus liegen zwei Transmembrandomänen (Abbildung 1.0 6). Am Ende der ersten der beiden Transmembrandomänen befindet sich ein kurzer hydrophiler Bereich mit dem konservierten GMN-Motiv am Ende der ersten Transmembrandomäne (Abbildung 1.0 6 A, B). Das GMN-Motiv ist wichtig für die Bildung der Pore und den Transport des Magnesiummoleküls (Gregan et al. 2001, Kolisek et al. 2003).

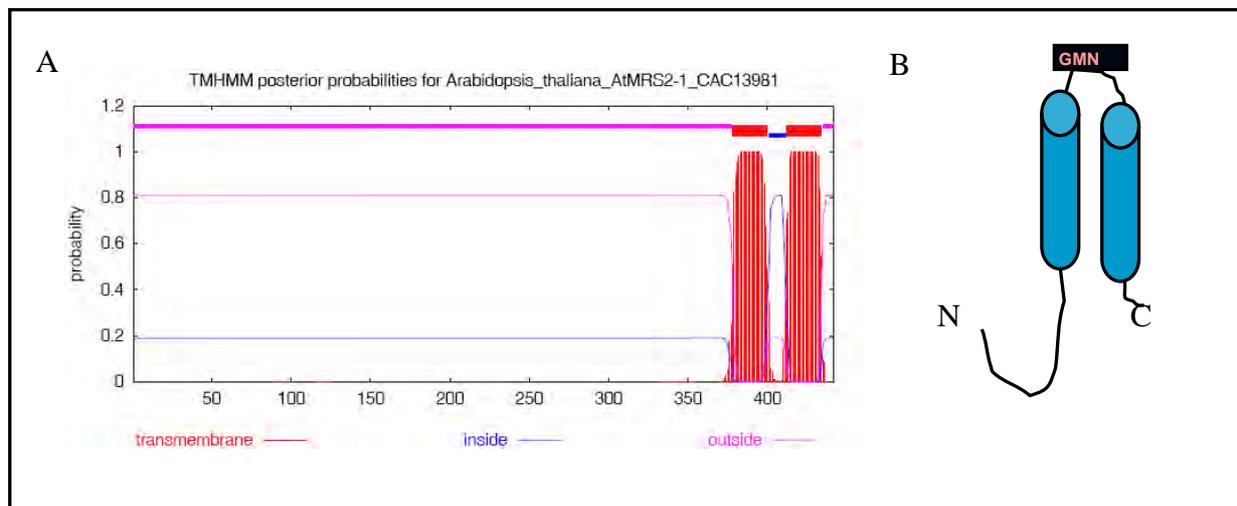


Abbildung 1.0 6: Struktur des AtMRS2-X-Transporters

A) Hydrophobizitätsprofil am Beispiel von *AtMRS2-1*

B) Schematische Darstellung eines einzelnen *AtMRS2*-Proteins. Das GMN-Motiv ist in einem schwarzen Kasten dargestellt. Die beiden Transmembrandomänen sind in blau gezeichnet.

In ersten Untersuchungen konnten einige Mitglieder der Genfamilie das Wachstum der $\Delta mrs2$ -Mutante komplementieren und Magnesiumtransport konnte gezeigt werden (Drummond et al. 2006, Li et al. 2001, Schock et al. 2000). Lokalisationsstudien durch GFP-Fusion erbrachten für den Transporter *AtMRS2-6* eine mitochondriale Lokalisation (Schock et al. 2000), für *AtMRS2-10* eine Lokalisation in der Plasmamembran und für *AtMRS2-11* eine Lokalisation im Chloroplasten (Drummond et al. 2006, Li et al. 2001, Schock et al. 2000). Weiterführende Untersuchungen zu den Eigenschaften der Transporter haben eine Inhibition der Magnesiumaufnahme durch Aluminium gezeigt (Li et al. 2001). Eine Überexpression des *AtMRS2-10*-Transporters in *Nicotiana bethamiana* vermittelte der Pflanze eine erhöhte Toleranz gegenüber Aluminium-Ionen (Deng et al. 2006).

1.2.4 Funktionen und Wirkungen von Spurenelementen bzw. Schwermetallen

Das bakterielle Homologe CorA vermittelt zusätzlich zum Magnesiumtransport auch den Transport von anderen divalenten Kationen wie Kobalt und Nickel. Spurenelemente wie Kobalt, Kupfer und Nickel werden von der Pflanze nur in geringen Mengen benötigt. Liegen Spurenelemente, bzw. toxische Mineralstoffe wie die bekannten Schwermetalle Aluminium und Cadmium in hohen Konzentrationen im Boden und für die Pflanze verfügbar vor, dann kommt es zu starken Schädigungen der Pflanze. Schwermetalle bilden häufig Metall-Chelat-Komplexe. Sie besitzen die Fähigkeit zum Valenzwechsel und treten als Bestandteile wichtiger Enzyme wie Oxidoreduktasen auf. Sie stellen häufig ein Problem für den Stoffwechsel der Pflanze dar, da sie aufgrund ähnlicher Eigenschaften wie Größe der Hydrathülle, Ionenradius oder Ladung die Ionen aus der Wirkgruppe von Enzymen ersetzen, und so schwerwiegende Probleme im Stoffwechsel der Pflanze auslösen (Amberger 1996). Zu den Folgen des Austausches der Ionen gehören eine Einschränkung der Enzymaktivität aufgrund einer falschen Konformation des Proteins bzw. eine schlechtere Bindung des Substrats. Schließlich folgt die Degradation des Enzyms bis hin zum Abbau der Zellorganelle (Mitochondrien, Chloroplasten) in denen das Enzym lokalisiert ist (di Toppi und Gabbrielli 1999).

Zu den bekanntesten Schwermetallen gehört Cadmium. Es besitzt keine nützliche Funktion für die Pflanze und gehört somit zu den Schadelementen. Cadmium wird für die Pflanze erst bei einem pH-Wert von 5,0 verfügbar. Die Aufnahme erfolgt als Cd^{2+} über die Wurzel in die Zelle. Dort bindet es aufgrund seiner hohen Affinität zu SH-Gruppen an SH-Gruppen haltige Proteine (Cowan 2002). Toxizitäts-Symptome sind relativ unspezifisch, da Cadmium wie auch andere Schwermetalle die Photosyntheserate senkt und die Aktivität hydrolytischer Enzyme steigert. Als Folge treten Chlorosen und Nekrosen auf (Stohs et al. 2000).

Kobalt besitzt eine wichtige Funktion als Metall-Komponente der Dipeptide. Es wirkt zum Teil aktivierend auf Enzyme wie die Pyruvatkinase und inhibierend auf andere wie die Peroxidase (Amberger 1996). Eine exakte Funktion in der Pflanze konnte allerdings bislang noch nicht ermittelt werden. Toxizitätssymptome sind auch hier eher unspezifisch, da sie meistens auf eine verminderte Wirksamkeit und Verfügbarkeit anderer Mineralstoffe zurückgeführt werden können (Scheffer 2002).

1 Einleitung

Kupfer wird von der Pflanze als Cu^{2+} -Ion oder in Form von Chelaten aufgenommen. Die Aufnahme selbst erfolgt häufig über die Bindung an Aminosäuren und wird in dieser Form in der Pflanze transportiert. Die bekannteste Funktion besitzt Kupfer als Bestandteil des Plastocyanins. Das Plastocyanin wird am Ende der Elektronenübertragung vom Photosystem II und dem Cytbf-Komplex, die einen Protonengradienten über der Thylakoidmembran erzeugen, reduziert. Verschiedene Enzyme, darunter einige Phenol-Oxidase (Tyrosinase, Diphenolase), die Cytochrom-Oxidase, die Ascorbinsäure-Oxidase und die chloroplastidäre Superoxid-Dismutase benötigen Kupfer als Cofaktor (Amberger 1996). Kupfer besitzt auch eine essentielle Funktion bei der Pollenentwicklung (Sancenón et al. 2004).

Nickel wird im Boden bei pH-Werten $<6,0$ verfügbar. Bereits bei der Aufnahme konkurriert es mit anderen divalenten Kationen wie Calcium, Eisen, Mangan und Zink um Bindestellen an der Wurzeloberfläche. Nickel tritt meistens als Metall-Komponente bei Enzymen des Stickstoffstoffwechsels auf. Toxizitätssymptome sind auch hier nicht eindeutig definiert (Brown et al. 1987).

Aluminium stellt besonders unter Magnesiummangel in sauren Böden ein Problem dar. Es wird bei pH-Werten $<5,5$ mobilisiert, somit für die Pflanze verfügbar und aufgenommen. In sauren Böden liegen Konzentrationen von $10 - 100 \mu\text{M}$ vor (Ciamporová 2002). Aluminium konkurriert aufgrund seiner ähnlichen Größe mit divalenten Kationen wie Magnesium um die Aufnahme und den Transport. Auf diese Weise blockiert es auch die Magnesiumkanäle und verstärkt so den Mangel an Magnesium (MacDiarmid und Gardner 1998, Rengel und Robinson 1989). Unter Magnesiummangel treten vermehrt freie Radikale auf. Er beginnt in den älteren Blättern und zeigt sich zunächst in punktförmig auftretenden Chlorophyll-Defekten, die sich schließlich über Chlorosen zu Nekrosen weiterentwickeln. Eine Aluminium-Toxizität macht sich durch eine Hemmung des Wurzelwachstums durch Inhibition der Zellteilung bemerkbar. Es treten verdickte Wurzeln mit wenigen Verzweigungen auf. Aluminium hemmt außerdem die Photosynthese, die Chlorophyll-Bildung, Transpiration und Zuckerphosphorylierung sowie ATPasen und Phosphatasen. Zusätzlich aktiviert es das Enzym Polygalakturonase wodurch die Pektine der Mittellamelle aufgelöst werden und es zu einer Anreicherung in den Mitochondrien kommt (Delhaize und Ryan 1995, Matsomoto 2000, Richards et al. 1998).

1.3 Ziele der Arbeit

Der Mechanismus des Magnesiumtransports ist in Pflanzen bisher wenig untersucht. Erste Erkenntnisse gibt es nur über die Funktion des vakuolären Magnesiumtransporter AtMHX. Über die Aufnahme und den weiteren Transport des Magnesiums in der Pflanze ist bisher fast nichts bekannt. Die *AtMRS2*-Genfamilie mit elf Mitgliedern, darunter ökotypenspezifisch in Columbia die zwei Pseudogene *AtMRS2-8* und *AtMRS2-9*, stellt eine völlig neue Klasse von Transportproteinen dar. Aufgrund der hohen Zahl von Mitgliedern stellt sich die Frage, ob für die einzelnen Mitglieder eine entwicklungs- oder eine gewebespezifische Expression vorliegt und ob exogene Faktoren wie zum Beispiel Licht die Expression des chloroplastidär lokalisierten *AtMRS2-11* Proteins beeinflussen können. Da das bakterielle Homologe CorA-Protein auch den Transport von anderen divalenten Kationen wie Kobalt und Nickel vermittelt, soll auch untersucht werden, ob diese Ionen und Schwermetalle wie Kupfer und Cadmium die Expression beeinflussen. Aluminium konkurriert aufgrund seiner ähnlichen Größe mit dem Magnesiumion um Bindestellen, und blockiert so die Magnesiumtransporter. Hierzu sollen Experimente zum Aluminium-Einfluss auf die Expression durchgeführt werden. Zur Analyse der Expression in *Arabidopsis thaliana* wurden transgene Pflanzen für alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie hergestellt, die das Reportergen für das Enzym β -Glucuronidase unter Kontrolle des jeweiligen Promotors exprimieren. Transgene Linien für den *AtMRS2-11*-Transporter lagen aus der Diplomarbeit schon vor.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen durch heterologe Expression in Hefe Interaktionsanalysen durchgeführt werden. In *Thermotoga maritima* wurde eine Pentamerstruktur für den bakteriellen CorA-Transporter gezeigt. Da man aufgrund der Strukturähnlichkeit der Proteine in *Arabidopsis thaliana* vermuten kann, dass auch hier ein Transportprotein nicht ausreicht, um einen funktionalen Kanal zu bilden, sollte mit dem speziell für Membranproteine entwickelten *mating based* Split-Ubiquitin-System (Obrdlik et al. 2004) untersucht werden, ob eine Interaktion von Homo- und Heterooligomeren prinzipiell möglich wäre.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia (Col-0)

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Invitrogen Inc.) Genotyp: F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80*dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*)*U169 hsdR17*(r_K⁻k_K⁺) λ ⁻

Agrobacterium tumefaciens GV3101pMP90 (besitzt Resistenz gegen die Antibiotika Rifampicin und Gentamycin)

2.1.3 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae THY.AP4 Genotyp: MAT α *ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*

Saccharomyces cerevisiae THY.AP5 Genotyp: MAT α *URA3 leu2 trp1 his3 loxP::ade2*

Saccharomyces cerevisiae BY4730 Genotyp: MAT α *leu2 D0 met15D0 ura3D0*

2.1.4 Vektoren

Tabelle 2. 1: Liste der verwendeten Vektoren

Vektor	Quelle	Anwendung
pDONR221	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	Donorvektor, GATEWAY TM System
pKGWFS7	(Karimi et al. 2002)	Expressionsvektor, Fusion des Promotors mit den Reportergenen für das <i>eGFP</i> und das Enzym β -Glucuronidase, GATEWAY TM System
pMetYCgate	(Obrdlik et al. 2004)	<u>mating based Split-Ubiquitin-System</u> : Fusion der codierenden Sequenzen mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins
pNXgate33-3HA	Capellaro und Boles (Universität Frankfurt Main), nicht publiziert	<u>mating based Split-Ubiquitin-System</u> : Fusion der amcodierenden Sequenzen mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins
pNubWTXgate	(Obrdlik et al. 2004)	<u>mating based Split-Ubiquitin-System</u> : N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation
KAT1-Cub	(Obrdlik et al. 2004)	<u>mating based Split-Ubiquitin-System</u> : Fusion des KAT1-Kalium-Kanals mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins
N-KAT1 3HA	(Obrdlik et al. 2004)	<u>mating based Split-Ubiquitin-System</u> : Fusion des KAT1-Kalium-Kanals mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins

2 Material und Methoden

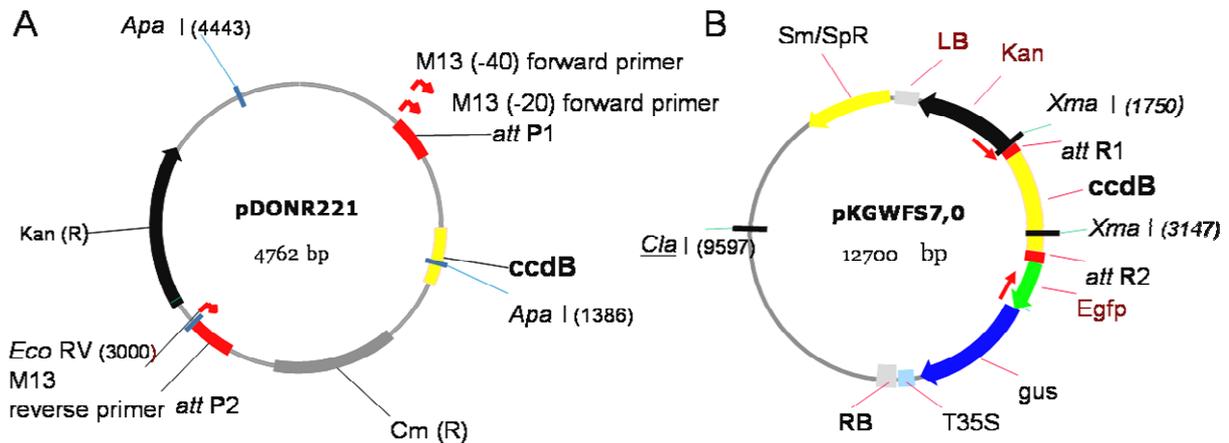


Abbildung 2.0 1 verwendete Vektoren zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionskonstrukte. Die Angaben zu dem Vektor pDONR221 wurden der Anleitung des GATEWAY-Systems entnommen und die Vektorkarte mit dem Programm VektorNTI erstellt. Die Angabe für den Zielvektor pKGWFS7 wurden der Publikation von Karimi entnommen und die Vektorkarte ebenfalls mit dem Programm Vector NTI erstellt (Karimi et al. 2002).

A) Vektorkarte des Donorvektors pDONR221 für das GATEWAY-System: Die *att*-Sequenzen sind als rote Kästen gekennzeichnet, zusätzlich enthält der Vektor eine Kanamycinresistenz (schwarzer Pfeil) und das *ccdB*-Gen (gelber Kasten). Die als grauer Kasten dargestellte Cm Resistenz geht ebenso wie das *ccdB*-Gen bei der Rekombinationsreaktion verloren. Die Bindestellen der für die Sequenzierung verwendeten Primer (M13 (-40) *forward* Primer und M13 *reverse* Primer) sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur die Erkennungsstellen für die hier verwendeten Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *ApaI* eingezeichnet.

B) Vektorkarte des Expressionsvektors (Zielvektors) pKGWFS7: Der Vektor pKGWFS7 enthält eine Spectinomycinresistenz für die Selektion in *Escherichia coli* (gelber Pfeil) und eine Kanamycinresistenz für die Selektion in der Pflanze (schwarzer Pfeil). Die *att*-Sequenzen sind wie im Donor-Vektor als rote Kästen und das *ccdB*-Gen ist als gelber Kasten gekennzeichnet. Zu den weiteren wichtigen Merkmalen des Vektors gehören die als graue Kästen dargestellten RB- und LB-Sequenzen, die für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* benötigt werden (nähere Erläuterungen dazu siehe Abschnitt 2.2.4). Das Reportergen *Egfp* ist als grüner und das *uid*-Gen für das Enzym β -Glucuronidase ist als dunkel-blauer Pfeil dargestellt. Der 35S-Terminator ist durch einen hellblauen Kasten gekennzeichnet. Die Erkennungsstellen für die zur Sequenzierung verwendeten Primer *attR1* und GFPdo sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Zur besseren Übersicht wurden auch in dieser Vektorkarte nur die Erkennungsstellen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen *XmaI* und *ClaI* eingezeichnet.

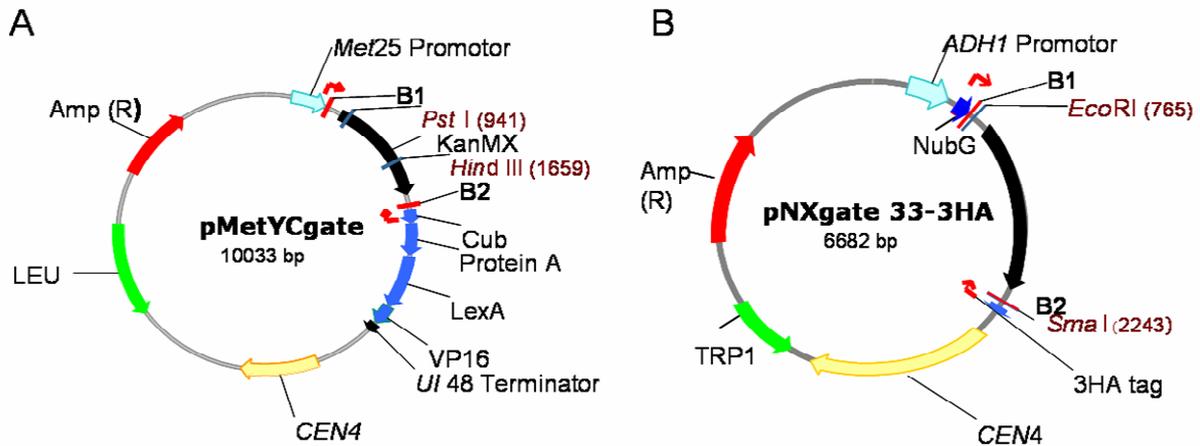


Abbildung 2.0 2 Vektorkarten der Hefevektoren pMetYCgate für die Herstellung der C_{ub} -Fusionen und pNXgate 33-3HA für die Herstellung der N_{ubG} -Fusionen. Die Angaben zu den Vektoren wurden der Anleitung von P. Obrdlik entnommen (Obrdlik et al. 2004). Die Vektorkarten wurden mit dem Programm VectorNTI erstellt.

A) Vektorkarte des Hefevektors pMetYCgate: Die für die Rekombination essentiellen B1- und B2 -Stellen sind durch rote Striche gekennzeichnet. Der Methionin-reprimierbare Promotor *pMet25* ist als hellblauer Blockpfeil dargestellt, der Terminator *term* als schwarzer Blockpfeil. Die C-terminale Hälfte des Ubiquitins, C_{ub} ist als dunkelblauer Blockpfeil dargestellt, ebenso der künstliche Transkriptionsfaktor PLV für *lexA* gekoppelte Reportergene, bestehend aus dem Protein A, LexA und VP16. Der low-copy *origin of replication* der Hefe *CEN4* ist als gelber Blockpfeil dargestellt. Das Gen für die Biosynthese von Leucin ist als grüner Blockpfeil dargestellt. Ein weiteres wichtiges Element des Vektors ist die Ampicillinresistenz für die Selektion in *Escherichia coli* (roter Pfeil). Die Kanamycinresistenz, die bei der Rekombination gegen die codierende Sequenz des jeweiligen *AtMRS2*-Gens ausgetauscht wird, ist in Form eines schwarzen Kastenpfeils dargestellt. Die Bindestellen der Primer für die Sequenzierung (*pMet25* im Methionin reprimierbaren Promotor, C_{ub} in der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins) sind durch rote eckige Pfeile gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur die Erkennungsstellen für die tatsächlich verwendeten Restriktionsendonukleasen, *Pst* I und *Hind*III eingezeichnet.

B) Vektorkarte des Hefevektors pNXgate 33-3HA: Essentielle Elemente des Vektors sind der Promotor für die Alkoholdehydrogenase aus Hefe, *pADH1* (hellblauer Blockpfeil) und die mutierte N-terminale Hälfte des Ubiquitins, N_{ubG} , (dunkelblauer Blockpfeil), sowie das 3HA-Tag (blauer Blockpfeil). Wie in der Vektorkarte für den Vektor pMetYCgate sind hier ebenfalls die Ampicillinresistenz für die Selektion in *Escherichia coli* als roter Blockpfeil und der *CEN4 origin of replication* der Hefe als gelber Blockpfeil dargestellt. Das Gen für die Biosynthese von Tryptophan ist als grüner Blockpfeil dargestellt. Ebenso sind die Bindestellen der für die Sequenzierung verwendeten Primer durch eckige rote Pfeile (N-terminalen Hälfte N_{ubG} , HA-Tag) gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden auch in dieser Vektorkarte nur die Positionen der Erkennungssequenzen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Sma*I eingezeichnet.

2.1.5 verwendete Software

Vector NTI Advance R 10 (Invitrogen, 2006)

BioEdit 7.0.7 (Tom Hall, 1997-2007)

Adobe Photoshop, Version 6.0 (Microsoft)

2.1.6 Primersequenzen

Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Anhang (Tabelle 8.0 2 und Tabelle 8.0 3). Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert.

2.1.7 Laborgeräte

Tabelle 2. 2 verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Thermocycler Eppendorf Mastercycler	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Gelkammersystem	Amersham Biosciences	Freiburg (Deutschland)
UV-Tisch KW 254 nm	Faust	
Digitalkamera, Olympus C-4000 Zoom, Camedia	Olympus	Hamburg (Deutschland)
Digitalkamera, Olympus C-4040 Zoom, Camedia	Olympus	Hamburg (Deutschland)
Thermomixer, Eppendorf comfort	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Vortex	Heidolph Reaxtop	Schwabach (Deutschland)
Zentrifuge, Biofuge 15R Heraeus sepatech	Heraeus	Hanau (Deutschland)
Zentrifuge, Biofuge 22R Heraeus	Heraeus	Hanau (Deutschland)
Zentrifuge, Eppendorf 5415R	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge, Sorvall RC-5BR Refrigerated Superspeed Centrifuge	Kendro Laboratory Products GmbH	Hanau (Deutschland)
Speedvac, Eppendorf 5301	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Sterilbank, HERA safe Heraeus	Heraeus	Hanau (Deutschland)
Ultramikrotom Om U3	C. Reichert Werke AG	Optische Wien (Österreich)
Pflanzenanzuchtsschrank, KBW400	Binder GmbH,	Tuttlingen (Deutschland)
Glühbirnen 110 $\mu\text{mol photons x m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Osram L 18W/77	Osram	München (Deutschland)
Anzuchtammer	Binder GmbH	Tuttlingen (Deutschland)
Leuchtröhren 24 $^{\circ}\text{C}$, 110 $\mu\text{mol photons x m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Osram LUMILUX Daylight FQ 39W/860	Osram	München (Deutschland)
Klimaaggregat R410A Split Series FTKS35CVMB	Daikin Industries Ltd.	Tokio (Japan)

2.1.8 Reaktionskits

Tabelle 2. 3 verwendete Reaktionskits

Produkt	Anwendung	Hersteller
DNeasy Plant Mini Kit	DNA-Extraktion	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
NucleoSpin®-Plant	DNA-Extraktion	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RNase A	Degradation von RNA	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
NucleoSpin®-RNA Plant	RNA Extraktion	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Dynabeads mRNA DIRECT Kit	RNA-Extraktion aus Saccharomyces cerevisiae	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Transcriptor Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Protector RNase Inhibitor	cDNA-Synthese	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
RevertAid™M-MuLV Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
Taq DNA Polymerase	PCR	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
Bioscience Taq DNA-Polymerase S&E	PCR	Genaxxon (Biberach, Deutschland)
Pfunds Polymerase	PCR	Genaxxon (Biberach, Deutschland)
FastStart High Fidelity PCR System	PCR	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelelution	Qiagen (Hilden, Deutschland)
NucleoSpin®-Extract II	Gelelution	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Perfectprep® Gel Cleanup	Gelelution	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
BP-Klonase-Enzym-Mix II	BP-Klonase-Reaktion, GATEWAY System	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
LR-Klonase-Enzym-Mix II	LR-Klonase-Reaktion, GATEWAY System	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Generuler 1kb DNA ladder	Molekularer Größenstandard	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)

2.1.9 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 2. 4 verwendete Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen	Hersteller
<i>ApaI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>EcoRV</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>HindIII</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>PstI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>PvuII</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>SmaI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>XbaI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)
<i>XhoI</i>	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland)

2.1.10 Chemikalien

Tabelle 2. 5 spezielle verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma
Adeninsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Agarose Low EEO	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumsulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Benzaminopurin (Bapty et al. 1998)	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Dimethylformamid (DMF)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gentamycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Heringssperma-DNA	Fluka (Buchs, Schweiz)
L-Histidin HCl	Fluka (Buchs, Schweiz)
Kanamycin	Fluka (Buchs, Schweiz)
L-Leucin	Fluka (Buchs, Schweiz)
L-Methionin	Fluka (Buchs, Schweiz)
MS-Salze mit B5 Vitaminen und Gamborg Vitaminen	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Oxoid-Agar	Oxoid GmbH (Wesel, Deutschland)
PEG 4000	Fluka (Buchs, Schweiz)

2 Material und Methoden

Chemikalie	Firma
Phenol/Chloroform (24:1)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Rifampicin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Spurr Low Viscosity Embedding Kit	Polysciences Europe, Eppelheim (Deutschland)
Silvet-L77	Boehringer Ingelheim (Mannheim, Deutschland)
Spectinomycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tryptophan	Fluka (Buchs, Schweiz)
Uracil	Fluka (Buchs, Schweiz)
X-GlcA	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
X-Gal	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)

Alle weiteren Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Karl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

2.1.11 Medien

Tabelle 2. 6 Auflistung der verwendeten Medien

Medium	Komponenten
Gelelektrophorese	
Ladepuffer	0,04 % Kresolrot 13 % Ficoll [®] 400
TBE-Puffer (10 x)	0,9 M Tris-HCl 0,9 M H ₃ BO ₄ 20 mM EDTA pH 8,0 mit HCl
Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	
SOB-Medium	2 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl in H ₂ O dest. pH6,8 – 7,0
nach dem Autoklavieren	10 mM MgSO ₄
nach dem Autoklavieren	10 mM MgCl ₂
TB-Puffer	10 mM PIPES 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl in H ₂ O bidest, pH 6,7 mit KOH
steril filtrieren	55 mM MnCl ₂
Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	
SOC-Medium	2 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl in H ₂ O dest. pH6,8 – 7,0 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂
nach dem Autoklavieren	20 mM Glucose steril filtriert
Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	
LB (Luria Bertani)	1 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl in H ₂ O bidest, pH 7,0
fest	1,5 % Agar
Antibiotika:	
Hefektoren	50 µg/ml Ampicillin
BP-Plasmide (Donorvektoren)	50 µg/ml Kanamycin
LR-Plasmide (Zielvektoren)	100 µg/ml Spectinomycin
Plasmidminipräparation (Birnboim und Doly 1979)	
Bibdo 1	25 mM Tris-HCl 10 mM EDTA
nach dem Autoklavieren	50 mM Glucose
nach dem Autoklavieren	50 mg/ml RNase A

2 Material und Methoden

Medium	Komponenten
Bibdo 2	0,2 M NaOH
	1 % SDS
Bibdo 3	3 M Kaliumacetat
	11,5 % Essigsäure
TE-Puffer (1 x)	10 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA
	pH 8,0
Herstellung kompetenter <i>Agrobacterien</i>-Zellen	
YEB-Medium	0,5 % Fleischextrakt
	0,1 % Hefeextrakt
	0,1 % Pepton
	0,5 % Saccharose
	pH 7,0 mit NaOH
fest	1,5 % Agar
nach dem Autoklavieren	20 mM MgCl ₂
Antibiotika	25 µg/ml Gentamycin
	100 µg/ml Rifampicin
Mit Zielvektor zusätzlich	100 µg/ml Spectinomycin
TE-Puffer (1 x)	10 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA
	pH 8,0
Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Infiltrationsmedium	1 x MS-Salze mit B5 Vitaminen und Gamborg Vitaminen
	5 % Saccharose
	0,025 % MES
	pH 5,7 mit KOH
nach dem Autoklavieren	0,044 µM BAP
	0,05 % Silvet-L-77
Sterilisation von <i>Arabidopsis</i>-Samen	
	70 % Ethanol
	12 % Natriumhypochlorit
	20 % SDS
Aussaat von <i>Arabidopsis</i>-Samen	
Selektionsmedium	1 x MS-Salze mit B5 Vitaminen und Gamborg
	0,5 % Saccharose
	0,05 % MES
	pH 5,7 mit KOH
fest und weich	0,8 % Agar
fest und hart	1,5 % Agar
nach dem Autoklavieren	
Antibiotika	50 µg/ml Kanamycin
	100 µg/ml Ampicillin
Top-Agar	0,1% Agar in H ₂ O bidest
Hydroponische Kultur	
(Siegenthaler und Depéry 1976) 1 x	5 mM KNO ₃
	1,5 mM Ca(NO ₃) ₂

2 Material und Methoden

Medium	Komponenten
	1 mM KH ₂ PO ₄
	1 mM nH ₄ Cl
	1 x Mikroelemente
	1 x Fe-EDTA-Lösung
Magnesiumsulfat	50 bzw. 1,5 mM
fest	0,7 % Agarose Low EEO
Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin
	50 µg/ml Kanamycin
Mikroelement-Lösung 1000 x	46 mM H ₃ BO ₄
	10 mM MnSO ₄
	0,77 mM ZnSO ₄
	0,32 mM CuSO ₄
	0,58 mM MoO ₃
Fe-EDTA-Lösung	0,1 M EDTA
	0,37 M KOH
	0,1 M FeSO ₄
	ca. pH3,0
Schwermetall-Lösungen	50 µM AlCl ₃
	30 µM CdCl ₂
	50 µM Co(NO ₃) ₂
	25 µM CuSO ₄
	40 µM NiCl ₂
GUS-Aktivitätsnachweis	
X-GlcA-Substratlösung	1 mM X-GlcA
	0,05 mM Natriumphosphatpuffer
	10 mM EDTA
	3 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]
	0,5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]
	0,1 % TritonX-100
Natriumphosphat-Puffer	0,05 M NaH ₂ PO ₄
	0,05 M Na ₂ HPO ₄
	pH7 in H ₂ O bidest.
Herstellung von Semi-Dünnschnitten	
Fixierungspuffer	50 mM PIPES
	1,5 % Glutaraldehyd
	0,5 g Glucose
Einbettungsmedium	13 g NSA (Nonenyl Succinic Anhydrid)
	5 g VCD (Vinylecyclohexan Dioxid)
	3 g D.E.R (Dow Epoxid Resin 736)
	0,2 g DMAE (Dimethylaminoethanol)
Herstellung kompetenter Hefe-Zellen	
YPD-Medium	8 g Hefeextrakt
	16 g Pepton
fest	16 g Bacto-Agar
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert

2 Material und Methoden

Medium	Komponenten
Hefetransformation nach Gietz (Gietz und Woods 2002)	
YPAD-Medium (0,8 l)	8 g Hefeextrakt 16 g Pepton 8 ml Adeninsulfat
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert
Heringssperma-DNA	5 mg/ml in 1 x TE-Puffer
LiAc	1 M steril filtriert
PEG	50 %
10 x TE-Puffer	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH7,5 mit NaOH
LiAc/TE-Puffer	1 ml 10 x TE-Puffer 1ml 1 M LiAc 8 ml H ₂ O bidest
PEG/LiAc-Puffer	0,5 ml 10x TE-Puffer 0,5 ml 1M LiAc 4 ml 50 % PEG
mating based Split-Ubiquitin-System	
AHTLUM dropout (-Ade,-His-Leu,-Trp-Ura-Met)	2 g Arginin HCl 2 g Isoleucin 2 g Lysin HCl 3 g Phenylalanin 2 g Serin 2 g Threonin 2 g Tyrosin 9 g Valin
SC (0,8 l)	1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 4 g Ammoniumsulfat 1,5 g AHTLUM Dropout (-Ade,-His,-Leu-Trp-Ura-Met) pH6,0-6,3 mit NaOH
Fest	16 g Oxoid-Agar
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert
SC+ A+H+L (0,8 l)	SC-Medium 8 ml Adeninsulfat 1,6 ml Histidin 8 ml Leucin pH6,0 – 6,3 mit NaOH 16 g Oxoid-Agar
SC+A+H+T+U (0,8 l)	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert SC-Medium + 8 ml Adeninsulfat 1,6 ml Histidin 1,6 ml Tryptophan 8 ml Uracil pH6,0 – 6,3 mit NaOH
Fest	16 g Oxoid-Agar

2 Material und Methoden

Medium	Komponenten
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert
SC + A + H (0,8 l)	SC-Medium +
	8 ml Adeninsulfat
	1,6 ml Histidin
	pH6,0 – 6,3 mit NaOH
	16 g Oxoid-Agar
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert
SD-Medium (0,8 l)	1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat
	4 g Ammoniumsulfat
	+ 0 / 75/ 150/ 400 µM Methionin
	pH6,0-6,3
	16 g Oxoid-Agar
nach dem Autoklavieren	16 g Glucose in 100 ml H ₂ O bidest, steril filtriert
Adenin	(A) 0,2 g/100 ml
L-Histidin HCl	(H) 0,2 g/100 ml
L-Leucin	(L) 1 g/100 ml
L-Methionin	(M) 1 g/100 ml
L-Tryptophan	(T) 1 g/100ml
Uracil	(U) 0,2 g/100ml
Z-Puffer	10,68 g/l Na ₂ HPO ₄
	5,5 g/l NaH ₂ PO ₄
	0,75 g/l KCl
	0,246 g/l MgSO ₄ ·6H ₂ O
	pH 7,0
	80 mg/ml X-GAL in DMF
	10 % SDS
DNA-Extraktion aus Hefe	
DNA-Extraktionslösung	2 % Triton X-100
	1 % SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
	nicht autoklavieren
	Glasperlen (Micron beads 0,7 – 1mm Durchmesser)

2.1.12 Antibiotika-Stammlösungen 1000 x

Tabelle 2. 7 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O bidest
Gentamycin	25 mg/ml H ₂ O bidest
Kanamycin	50 mg/ml H ₂ O bidest
Rifampicin	100 mg/ml in DMSO
Spectinomycin	100 mg/ml H ₂ O bidest
	Steril filtriert

2.1.13 Zubehör zur Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Tabelle 2. 8 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Zubehör	Firma
Arasystem	BetaTech (Gent, Belgien)
Confidor WG70	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)
Düngerperlen Osmocoté Plus Mini	Substral
Flüssigdünger „Die Profis“	Drogerie Markt dm (Karlsruhe, Deutschland)
Gärtnererde	Floradur (Deutschland)
Perligran G	Bonjo-Versand (Celle)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden der Molekularbiologie

Gängige Methoden der Molekularbiologie wurden verwendet, um die Konstrukte zur Analyse der Expression durch Promotor:GUS-Fusionen und zur Analyse der Protein-Proteininteraktion mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System herzustellen. Zu diesen Methoden zählen die Extraktion der Nukleinsäuren, die PCR und die gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung. Diese Methoden sollen hier nicht mehr im Einzelnen aufgeführt werden. Sie wurden mit Kits, entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionskonstrukte und der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktionsanalysen wurde die Klonierungstechnik von Invitrogen (Karimi et al. 2002) über homologe Rekombination verwendet, diese soll unter 2.2.3 näher erläutert werden. Die Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen erfolgte durch Hitzeschock und die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Birnboim&Doly, Bibdo (Birnboim und Doly 1979). Beide Methoden werden unter 2.2.2.1 aufgeführt. Die Methodik der Restriktionsanalyse und der Sequenzierung zur Verifizierung sollen hier ebenfalls nicht mehr beschrieben werden.

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte mit dem NucleoSpin®-Plant-Kit von Macherey-Nagel (Tabelle 2. 3) entsprechend der Anleitung. Zur Amplifikation der PCR-Produkte mit dem FastStart High Fidelity PCR System (2.1.8, Tabelle 2. 3) wurde das in Tabelle 2. 9 aufgeführte Thermoprofil verwendet.

Tabelle 2. 9: Thermoprofil „GFP 60“ zur Synthese der PCR-Produkte für die Promotor:GUS-Fusionen

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer [min]	Funktion
1	95	2	Initiale Denaturierung
2	95	1	Denaturierung
3	60	1	Anealing
4	72	2	Elongation
gehe zu 2-4			34 Wiederholungen
6	72	5	Terminale Elongation
7	8	∞	

Für die Herstellung der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktionsanalysen wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen extrahiert. Die Extraktion der Gesamt-

2 Material und Methoden

RNA erfolgte mit dem NucleoSpin[®]-RNA Plant Kit (Tabelle 2. 3) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Durch gelelektrophoretische Auftrennung wurde die Qualität der Gesamt-RNA bestimmt, und die Gesamt-RNA-Menge für die cDNA-Synthese abgeschätzt. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem Enzym RevertAid[™] M-MuLV Reverse Transcriptase (Tabelle 2. 3) von Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die Amplifikation der PCR-Produkte aus cDNA für die Analyse der Protein-Proteininteraktion in Hefe, erfolgte mit dem FastStart High Fidelity PCR System (2.1.8, Tabelle 2. 3). Es wurde ebenfalls das in Tabelle 2. 9 aufgeführte Thermoprofil verwendet.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Kompetente *Escherichia coli*-Zellen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Hanahan (1983) hergestellt. Über Nacht wurden kompetente *E.coli*-Zellen auf festem LB-Medium ohne Antibiotikum bei 37 °C inkubiert. Zehn bis zwölf Kolonien wurden mit einer Impföse in 250 ml SOB Medium überführt und bei 18 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden auf Eiswasser für zehn Minuten abgekühlt, auf Zentrifugationsgefäße verteilt und bei 2500 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubationsphase von zehn Minuten wurde die Bakteriensuspension erneut bei 2500 g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden in jeweils 5 ml TB-Puffer resuspendiert, beide Ansätze vereinigt und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Nach einer abschließenden Inkubationsphase bei 4°C für zehn Minuten wurden Aliquots der Bakteriensuspension von jeweils 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan 1983). Hierzu wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl BP-Klonase-Reaktionsansatz, 2 µl LR-Klonase-Reaktionsansatz, bzw. 10 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation in Eiswasser erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Anschließend wurde der Transformationsansatz für weitere fünf Minuten in Eiswasser inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 1000 rpm für eine Stunde. 200 µl des 1000 µl Transformationsansatzes wurden direkt auf festem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Der restliche Transformationsansatz wurde bei 800 g pelletiert, in 200 µl SOC-Medium resuspendiert und

2 Material und Methoden

ebenfalls auf festem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für die Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Selektion der *E. coli*-Zellen wurde für die Transformationsansätze mit den Hefevektoren Ampicillin, für die BP-Plasmide Kanamycin und für die Selektion der LR-Plasmide Spectinomycin verwendet.

2.2.2.2 Plasmid-Mini-Präparation (Bibdo) (Birnboim und Doly 1979)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden einzelne *E. coli*-Kolonien in flüssigem LB-Medium unter Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation bei 2500 g pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl Bibdo 1 mit RNase resuspendiert. Nach einem fünf minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 400 µl Bibdo 2 versetzt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl kaltes Bibdo 3 zugegeben und für zehn Minuten ebenfalls auf Eis inkubiert. Zellbestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt für fünfzehn Minuten bei 4 °C und 10000 g pelletiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Für die Sequenzierung erfolgte eine Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung.

2.2.2.3 Herstellung und Transformation kompetenter *Agrobacterien*-Zellen

Bei der Herstellung transgener Pflanzen arbeitet man mit dem so genannten binären Vektorsystem (siehe Abschnitt 2.2.4). Hierbei werden die für die Transformation notwendigen Eigenschaften auf verschiedene Vektoren aufgeteilt. Der verwendete *Agrobacterien*-Laborstamm GV3101 (pMP90) besitzt virulente Eigenschaften und die Resistenz gegen Rifampicin und Gentamycin, aber keine T-DNA für den Transfer von DNA in die Pflanze (Koncz und Schell 1986).

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Höffgen und Willmitzer (Höffgen und Willmitzer 1988). Kompetente *Agrobacterien*-Zellen wurden auf festem YEB-Medium mit den Antibiotika Gentamycin und Rifampicin ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Zwei bis drei Kolonien wurden in jeweils 20 ml Vorkultur (YEB-Medium mit Gentamycin und Rifampicin) über Nacht bei 28 °C und 170 rpm inkubiert. Diese Vorkulturen wurden in jeweils 200 ml YEB-Medium mit Gentamycin und Rifampicin (Hauptkultur) überimpft und für drei bis vier Stunden bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkulturen wurden für zehn Minuten bei 4 °C abgekühlt und dann für zehn Minuten bei

2 Material und Methoden

4 °C und 4000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie zuvor beschrieben) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml YEB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde als 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte durch Hitzeschock ebenfalls in Anlehnung an das Protokoll von Höffgen und Willmitzer (Höffgen und Willmitzer 1988). Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit ca. 1 µg Plasmid-DNA gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation auf Eis folgte eine fünf minütige Inkubation in flüssigem Stickstoff und anschließend ein Hitzeschock für fünf Minuten bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde danach mit 1 ml YEB-Medium ohne Antibiotika versetzt und bei 800 rpm für mindestens 3 h bei 28 °C inkubiert. Ein Aliquot von 200 µl des Transformationsansatzes wurde direkt auf festem YEB-Medium mit den Antibiotika für die Selektion des Laborstamms Gentamycin und Rifampicin, sowie Spectinomycin für die Selektion des transformierten Plasmids ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde für drei Minuten bei 800 g pelletiert, in 200 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf YEB-Medium mit Gentamycin, Rifampicin und Spectinomycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 28 °C.

2.2.3 GATEWAY™-System der Firma Invitrogen

Die GATEWAY™-Technik beruht auf dem Rekombinationssystem des λ-Phagens. Durch Rekombination kann der λ-Phage seine DNA in das Genom von *E. coli* integrieren und dann den lysogenen oder lytischen Weg vollziehen. Die Rekombination selbst erfolgt zwischen den **attachment**-Sequenzen (*attachment-sites*), die jeweils auf dem Genom von *Escherichia coli* und dem Genom des λ-Phagens liegen. Sie wird durch spezifische Enzyme des λ-Phagen und von *E. coli* vermittelt (Curtis und Grossniklaus 2003, Ptashne 1992). Die **attB**-Sequenzen liegen auf dem Genom von *E. coli*, die **attP**-Sequenzen auf dem Genom des λ-Phagens. Bei der Rekombination binden bakterien- und phageneigene Enzyme an die **att**-Sequenzen und schneiden dort. Die DNA-Stränge werden ausgetauscht und wieder kovalent verbunden. Dazu werden unter anderem Faktoren wie IHF, *Escherichia coli* Integration factor und die *Int*- und *Xis*-Proteine (*Excisionase*) des λ-Phagens benötigt.

2 Material und Methoden

Invitrogen bietet im GATEWAYTM-System Donorvektoren mit den *attP*-Sequenzen des λ -Phagen an, sowie die Enzyme und Faktoren, die die Rekombination in Form des BP- bzw. LR-Klonase-Enzym-Mixes (Tabelle 2. 3) vermitteln. Die Rekombination erfolgt hier in einer ersten Rekombinationsreaktion, der BP-Klonase-Reaktion (Abbildung 2.0 3 A), zwischen amplifiziertem PCR-Produkt mit flankierenden *attB*-Sequenzen aus *E. coli*, und dem Donorvektor (pDONR221, Abbildung 2.0 1 A). Ein Aliquot (2 μ l/10 μ l) des BP-Klonase-Reaktionsansatzes wird in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf LB-Medium mit Kanamycin inkubiert. Der Donor-Vektor enthält die entsprechenden *attP*-Sequenzen des λ -Phagen und außerdem zur Selektion eine Kanamycin-Resistenz und das *ccdB*-Gen. Das *ccdB*-Protein interagiert mit der Gyrase aus *E. coli*, wodurch die Zellen nicht mehr wachsen können (Bahassi et al. 1999, Bernard und Couturier 1992). Der BP-Klonase-Enzym-Mix enthält die für die Rekombination notwendigen Enzyme und Cofaktoren. Das Produkt der BP-Klonase-Reaktion enthält den entstandenen *Entry*-Klon (BP-Plasmid = Donorvektor mit dem PCR-Produkt, Abbildung 2.0 3 B) und wird über eine Kanamycin-Resistenz in *E. coli* selektiert. Klone, die das nicht-rekombinierte Plasmid, also nur den Donorvektor enthalten, werden über das für *E. coli* toxische Expressionsprodukt des *ccdB* Gens negativ selektiert. Nach der Rekombinationsreaktion werden aus den *attB*- und *attP*-Sequenzen die so genannten *attL*-Sequenzen.

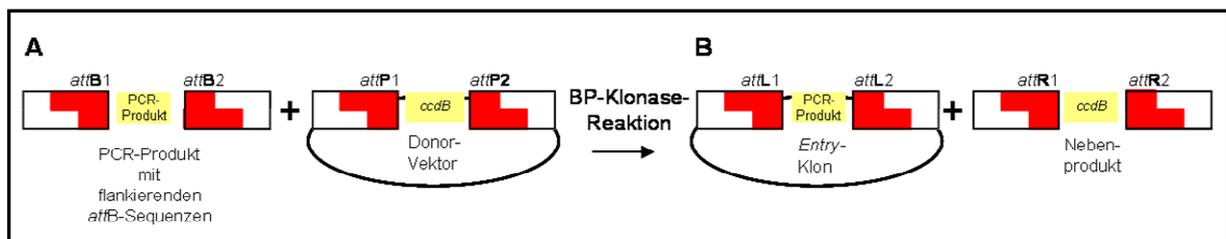


Abbildung 2.0 3: Schematische Darstellung der BP-Klonase-Reaktion (entnommen aus Manual Invitrogen, 2002)

A) zeigt das PCR-Produkt mit flankierenden *attB*-Sequenzen und vereinfacht dargestelltem *Donor*-Vektor mit dem *ccdB*-Gen, flankiert von *attP*-Sequenzen.

B) zeigt die Produkte der BP-Klonase-Reaktion. Der *Entry*-Klon enthält das PCR-Produkt, flankiert von *attL*-Sequenzen. Als toxisches Nebenprodukt entsteht das von den *attR*-Sequenzen flankierte *ccdB*-Gen.

Der korrekte *Entry*-Vektor wird in eine zweite Rekombinationsreaktion, die LR-Klonase-Reaktion (Abbildung 2.0 4) mit dem eigentlichen Zielvektor (*destination vector*) eingesetzt. Der Zielvektor, hier pKGWFS7 (Karimi et al. 2002), enthält die für die Rekombination spezifischen *attR*-Stellen und das *ccdB*-Gen (Abbildung 2.0 1 B). Wie schon erwähnt, enthält auch der LR-Klonase-Enzym-Mix die für die Rekombinationsreaktion

2 Material und Methoden

notwendigen Enzyme und Cofaktoren. Aus der LR-Klonase-Reaktion gehen der eigentliche Expressions-Klon (LR-Plasmid = Zielvektor mit rekombiniertem Gen flankiert von *attB*-Sequenzen) und als toxisches Nebenprodukt das von *attP*-Sequenzen flankierte *ccdB*-Gen hervor (Abbildung 2.0 4 B). Die Selektion der Zielvektoren (LR-Plasmide) erfolgt über eine Spectinomycinresistenz und ebenfalls über das Absterben der Zellen die das *ccdB*-Gen enthalten.

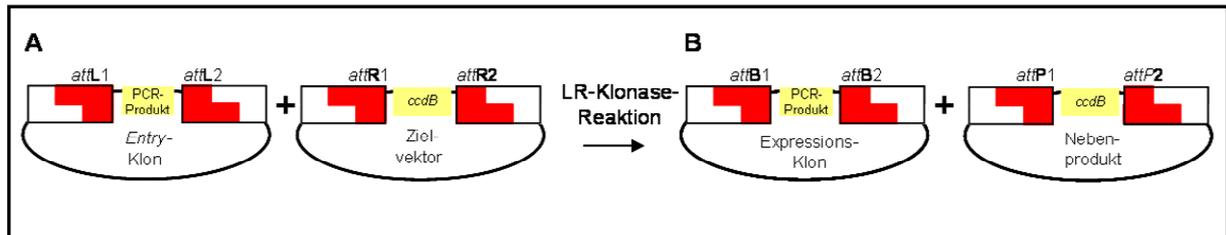


Abbildung 2.0 4: LR-Klonase-Reaktion (entnommen aus: Manual Invitrogen, 2002)

A) zeigt den *Entry*-Klon mit rekombiniertem PCR-Produkt, flankiert von *attL*-Sequenzen und den Zielvektor mit dem von den *attR*-Sequenzen flankierten *ccdB*-Gen.
 B) zeigt schematisch die Produkte der LR-Klonase-Reaktion. Der *Expressions*-Klon enthält das rekombinierte PCR-Produkt, flankiert von den *attB*-Sequenzen. Als Nebenprodukt entsteht ein Vektor mit dem *ccdB*-Gen, flankiert von *attP*-Sequenzen.

Zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionen wurde mit dem NucleoSpin[®]-Plant-Kit von Macherey-Nagel (2.1.8, Tabelle 2. 3) genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und in die PCR mit genspezifischen GATEWAY-Primern (siehe Anhang) eingesetzt. Die GATEWAY-Primer bestehen, wie schon unter 2.2.3 erwähnt, aus genspezifischen Bereichen und den *attP*-Stellen des λ -Phagens (Abbildung 2.0 5). Durch die spezifischen *attP1* und *attP2* Stellen, die mit den *attB1* und *attB2*-Stellen rekombinieren liegt das Konstrukt automatisch in der korrekten Orientierung im Zielvektor vor. Die PCR-Produkte wurden mit dem Gelelutionskit von Eppendorf (2.1.8, Tabelle 2. 3) aufgereinigt und in die BP-Klonase-Reaktion eingesetzt.



Abbildung 2.0 5: Schematische Darstellung des amplifizierten PCR-Produkts, Promotor:GUS-Fusionen

Die flankierenden *attP*-Sequenzen sind als schwarzer Kasten dargestellt, als orangener Kasten werden der genspezifische Promotor und das erste codierende Exon aufgeführt. Der Promotor wurde als die gesamte Sequenz ausgehend vom ersten Codon hinter dem STOP-Codon des davor liegenden Gens definiert.

Die Rekombinationsreaktion erfolgte in der BP-Klonase-Reaktion (Abbildung 2.0 3) mit dem *Entry*-Vektor pDONR221 (Abbildung 2.0 1 A, Abbildung 2.0 6 A). Ein Aliquot des

2 Material und Methoden

Reaktionsansatzes wurde in *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock transformiert (siehe 2.2.2.1) und auf LB-Medium mit Kanamycin selektioniert. Einige Kolonien wurden in Flüssigmedium ÜN angezogen und die Plasmid-DNA nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (siehe 2.2.2.2) isoliert (Birnboim und Doly 1979). Die Verifizierung des korrekten *Entry*-Vektors erfolgte durch Fragmentierung der Plasmid-DNA mittels der Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *EcoRV* (siehe Tabelle 2. 1) und durch Sequenzierung. Die Sequenzierung wurde durch das Unternehmen Macrogen Inc. in Korea durchgeführt. Der korrekte *Entry*-Vektor wurde mit dem Zielvektor pKGWFS7 (Abbildung 2.0 1 B, Abbildung 2.0 6 B) in der LR-Klonase-Reaktion (Abbildung 2.0 4) rekombiniert, und so der entstandene Expressionsklon (LR-Plasmid) ebenfalls durch Fragmentierung und Sequenzierung kontrolliert. Der Expressionsvektor (Zielvektor mit rekombiniertem PCR-Produkt = LR-Plasmid) wurde in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (2.2.2.3). Für die Bestimmung derjenigen *Agrobacterien*-Kolonien, die das LR-Plasmid enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei der Kolonie-PCR wurde in den Standard-PCR-Ansatz anstatt eines DNA-*Templates* mit einem Zahnstocher Zellmaterial einer einzelnen Kolonie in den PCR-Ansatz überführt. Mit dieser Kolonie wurde dann im folgenden Schritt die Flüssig-Kultur zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* angeimpft. Die Herstellung des Expressionsvektors erfolgte über zwei Rekombinationsschritte, da die Rekombinationsreaktion und die Transformation von *E. coli* direkt mit dem Zielvektor zu ineffizient gewesen wäre.

2 Material und Methoden

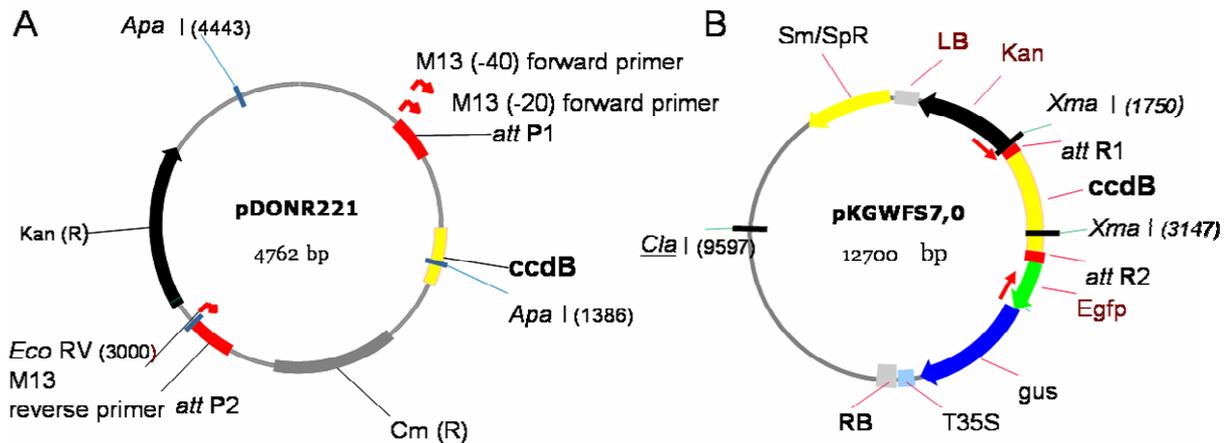


Abbildung 2.0 6: Donorvektor (verändert nach Invitrogen) und Expressionsvektor pKGWFS7 (verändert nach Karimi et al. 2002). Beide Vektorkarten wurden mit dem Programm Vector NTI erstellt.

A) pDONR221 Donorvektor des GATEWAY-Systems: Die *att*-Sequenzen sind als rote Kästen gekennzeichnet, zusätzlich enthält der Vektor eine Kanamycinresistenz, schwarzer Pfeil, und das *ccdB*-Gen (gelber Kasten). Die als grauer Kasten dargestellte Cm Resistenz geht ebenso wie das *ccdB*-Gen bei der Rekombinationsreaktion verloren. Die Bindestellen der für die Sequenzierung verwendeten Primer (M13 (-40) *forward* Primer und M13 *reverse* Primer) sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur die Erkennungsstellen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *ApaI* eingezeichnet.

B) Übersichtskarte des Expressionsvektors pKGWFS7: Der Vektor pKGWFS7 enthält eine Spectinomycinresistenz für die Selektion in *E. coli* (als gelber Pfeil dargestellt), und eine Kanamycinresistenz für die Selektion in der Pflanze (als schwarzer Pfeil dargestellt). Die *att*-Sequenzen sind wie im Donor-Vektor in Form von roten Kästen und das *ccdB*-Gen als gelber Kasten eingezeichnet. Zu den weiteren wichtigen Merkmalen des Vektors gehören die als graue Kästen dargestellten RB- und LB-Sequenzen, die für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* benötigt werden (nähere Erläuterungen im Abschnitt 2.2.4). Das Reportergen *Egfp* ist als grüner und das *uid*-Gen für das Enzym β -Glucuronidase ist als dunkel-blauer Pfeil dargestellt. Der 35S-Terminator ist als hellblauer Kasten gekennzeichnet. Die Bindestellen der für die Sequenzierung verwendeten Primer *attR1* und GFPdo sind durch rote Pfeile dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden ebenfalls nur die Erkennungsstellen für die eingesetzten Restriktionsendonukleasen *XmaI* und *ClaI* eingezeichnet.

2.2.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* durch *Agrobacterium tumefaciens*

Bei der Herstellung transgener Pflanzen soll fremde DNA stabil in das Genom der Pflanze integriert werden. Man macht sich hierbei das natürlich vorkommende Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* zu Nutze. Es befällt die Pflanze an Verwundungsstellen und löst dort durch Umprogrammieren des pflanzlichen Stoffwechsels die Bildung von Tumoren, so genannten Wurzelhalsgallen aus. Der Stoffwechsel der verletzten Pflanzenzelle wird so umprogrammiert, dass sie Phytohormone (Cytokinin, Auxin) produziert, wodurch die Zellen unkontrolliert und undifferenziert wachsen. Gleichzeitig erfolgt die Synthese von Opinen, die nur von dem Bakterium als Nährstoff benutzt werden können. Zu den Opinen gehören unter anderem Nopalin und Octopin (Kempken und Kempken 2004).

2 Material und Methoden

Für die Tumorbildung und die Synthese der Phytohormone sind Plasmide mit einer Größe von 200 bis 800 kb, so genannte **Tumor-induzierende Plasmide (Ti-Plasmid)** verantwortlich. Auf dem **Ti-Plasmid** liegen die Gene für die Opinsynthese und Verwertung, die Erkennung verwundeter Zellen und für die Mobilisierung und den Transfer der so genannten **T-DNA (Transfer-DNA)**. Die Transfer-DNA ist der Bereich des **Ti-Plasmids**, der in die Pflanze übertragen wird. Die **T-DNA** wird von zwei DNA-Sequenzbereichen (Grenzen) flankiert, den so genannten *Right* und *Left Border-Sequenzen* (RB und LB). Sie bestehen aus einer Wiederholung von 25 bp, die die Erkennungssequenz für die Mobilisierung der T-DNA darstellen. Damit *Agrobacterium tumefaciens* die Pflanze befallen kann, muss eine Verwundung vorliegen. Die verwundete Pflanzenzelle bildet als Reaktion auf die Verletzung phenolische Substanzen (z.B. Acetosyringon), die als Erkennungssignal für das Bakterium dienen. Das *Agrobacterium* heftet sich an die Zelle an und die T-DNA wird in die Pflanzenzelle übertragen. Die *vir*-Gene, die für die Erkennung des Acetosyringon und die Anheftung an die Zelle verantwortlich sind, liegen auf der chromosomalen DNA des Bakteriums. Nach der Übertragung der T-DNA, wird die DNA in das pflanzliche Genom integriert (Kempken und Kempken 2004).

Die in der pflanzlichen Gentechnik verwendeten Plasmide wurden modifiziert. Sie enthalten zum Beispiel das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase, das der Pflanze eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin verleiht. Man arbeitet außerdem mit binären Vektorsystemen, bei denen die Funktionen des **Ti-Plasmids** auf zwei Vektoren verteilt vorliegen. Das größere der beiden Plasmide trägt die für die Virulenz notwendigen Sequenzen, die *vir*-Region und ist im Laborstamm des *Agrobacterium*s enthalten. Der Laborstamm enthält meist auch chromosomal eine Antibiotikaresistenz (hier Rifampicin (Koncz und Schell 1986)). Auf dem kleineren Plasmid mit dem im Labor gearbeitet wird, (Expressionsvektor pKGWFS7, Abbildung 2.0 1 B bzw. Abbildung 2.0 6B), liegen die rechte und die linke Grenze der T-DNA (RB und LB), dazwischen liegt das Markergen und die zu analysierende Sequenz in Fusion mit einem Reporter-gen. Außerhalb der T-DNA-Sequenzen liegt ein Markergen für die Selektion in *E. coli*. Die DNA-Sequenz, die zwischen der rechten und der linken Grenze der T-DNA liegt wird in das pflanzliche Genom integriert (Kempken und Kempken 2004).

Der eigentliche Transformationsvorgang zur Herstellung transgener Pflanzen kann durch verschiedene Methoden, z.B. die Infiltration von Protoplasten oder Gewebestücken mit einer *Agrobacterien*-Suspension, erfolgen. Durch Behandlung mit Phytohormonen und unter

2 Material und Methoden

gleichzeitiger Antibiotika-Selektion können so transgene Pflanzen regeneriert werden. Eine weitere Methode ist die biolistische Transformation bei der Zellen oder Gewebestücke mit DNA-beschichteten Partikeln beschossen werden. Unter selektiven Bedingungen kann auch hier eine Pflanze regeneriert werden. Ein Nachteil bei diesen Methoden besteht darin, dass es häufig nur zu einer transienten Expression kommt, das transformierte Gen ist nur zeitweilig aktiv und geht später wieder verloren (Kempken und Kempken 2004). Stabile transgene Linien wurden im Rahmen dieser Dissertation durch die „Floral Dip“-Methode nach Clough und Bent hergestellt, die im Folgenden erläutert werden soll.

2.2.4.1 Die Floral Dip-Methode (Clough und Bent 1998)

Bei der Floral-Dip-Methode werden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen drei Tage vor der Transformation dekapitiert, damit bei der eigentlichen Transformation der Pflanze möglichst viele Blütenansätze vorhanden sind, und um Verwundungsstellen zu erzeugen an denen das *Agrobacterium* die Pflanze befallen kann. Mit den *Agrobacterien* die das Konstrukt tragen wird eine Vorkultur (20 ml YEB-Medium + Gentamycin, Rifampicin, Spectinomycin) angeimpft. Diese wird bei 28 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wird in 200 ml Hauptkultur (YEB-Medium mit Gentamycin, Rifampicin und Spectinomycin) überführt und für 24 h bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 g und bei Raumtemperatur pelletiert, und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wird in 200 ml Infiltrations-Medium mit Benzaminopurin, Saccharose und Silvet-77 resuspendiert. Die Pflanzen werden mit den Blütenansätzen in die Bakteriensuspension eingetaucht und für drei Minuten inkubiert. Silvet-77 erleichtert das Eindringen der Bakterien in die Pflanzenzelle, Benzaminopurin wird für die Regeneration der Pflanze nach der Inkubation in der Bakteriensuspension benötigt (Clough und Bent 1998).

Zwei Pflanztöpfe mit jeweils 4 - 6 Pflanzen wurden pro Konstrukt für 3 x 3 min kopfüber in die Bakteriensuspension gehängt und dann in Wuchsschalen mit wenig Wasser gelegt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und die Pflanzen nach einem Tag wieder aufgestellt und gegossen. Nachdem die ersten Blütenansätze auftraten, wurden die Töpfe mit den Pflanzen einzeln in lichtdurchlässige Pergament-Papiertüten eingepackt und mit Klebeband verschlossen. Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen nicht mehr gegossen und nach weiteren 4 Wochen die Samen geerntet und zur Vernalisation bei 4 °C gelagert.

2.2.5 Sterilisation und Aussaat von Samen

Zur Oberflächensterilisation wurde 1 Spatel Samen mit 1 ml 70 %igem Ethanol versetzt, durch vortexen gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das 70 %ige Ethanol wurde durch 1 ml Natriumhypochlorit (12 % (v/v)) ersetzt, und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden 8 ml H₂O bidest. und 1 ml 20 %iges SDS gegeben. Die Inkubation erfolgte für weitere 45 min bei 25 °C, wobei alle 10 min durch Invertieren gemischt wurde. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die Samen 4 x mit je 1 ml H₂O bidest. gewaschen, um Reste von SDS und Natriumhypochlorit zu entfernen. Unter der Sterilbank wurde der Ansatz auf 1 ml mit H₂O bidest. aufgefüllt und 8 ml 0,1 % Top-Agar dazugegeben. Die Samen wurden durch vorsichtiges Schütteln mit dem Top-Agar gemischt, auf „weiche“ Selektionsplatten (MS weich) mit Kanamycin und Ampicillin ausgeschüttet und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden mit halb offenem Deckel getrocknet, mit Parafilm verschlossen und die Samen unter Langtagsbedingungen inkubiert. Die Selektion der transgenen Keimlinge erfolgte über eine Kanamycinresistenz. Nach ein bis zwei Wochen wurden die Keimlinge auf „harte“ Selektionsplatten (MS hart), und nach weiteren zwei Wochen auf Erde umgesetzt. Aus Rosetten- und Stängelblättern wurde mit dem NucleoSpin[®]-Plant-Kit von Macherey-Nagel (2.1.8 Tabelle 2. 3) genomische DNA isoliert und mittels PCR mit einer Kombination aus vektor- und genspezifischem Primerpaar die Identität der transgenen Pflanze bestimmt.

Zur Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen unter Schwermetallstress wurde das hydroponische System verwendet. Hierzu wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße mit 0,5 x Medium (Siegenthaler und Depéry 1976) und 0,7 % Agarose befüllt. Das untere Drittel des Reaktionsgefäßes wurde abgeschnitten und die Reaktionsgefäße in Spitzenkästen für 1000 µl Spitzen eingesetzt. Die Kästen wurden mit 700 ml destilliertem Wasser gefüllt und mit Klarsichtfolie als Austrocknungsschutz verschlossen. Nach einer Woche wurde das destillierte Wasser durch 0,5 x Medium mit den entsprechenden MgSO₄- bzw. Schwermetall-Konzentrationen ersetzt (Gibeaut et al. 1997, Tocquin et al. 2003).

2.2.6 GUS-Aktivitätsnachweis

Zum Nachweis der Expression eines zu analysierenden Gens, wird das entsprechende Gen mit einem Reporter gen fusioniert. Reportergene sollen in der Pflanze keine endogene Aktivität besitzen, nicht toxisch, leicht nachweisbar und die Aktivität leicht zu dokumentieren sein. Zu den am häufigsten verwendeten Reportergenen gehören das grün fluoreszierende GFP-Protein

(Neidz et al. 1995) aus der Qualle *Aequoria victoria*, das *uid*-Gen für das Enzym β -Glucuronidase aus *Escherichia coli* und das Luciferase-Gen aus der Feuerfliege. Der Nachweis des GFPs erfolgt durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge, die Fluoreszenz des Proteins kann dann mikroskopisch nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erfolgt der Nachweis für die Reporterogenaktivität der Luciferase und der β -Glucuronidase durch den enzymatischen Umsatz eines spezifischen Substrats (Glucuronid bzw. Luciferin) und die Detektion des Katalyse-Produkts, Photonen im Fall der Luciferase (de Ruijter et al. 2003, Gould und Subramani 1988, Jefferson 1989, Neidz et al. 1995).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Expressionsvektor mit den Reporter genen für das grün fluoreszierende Protein und für das Enzym β -Glucuronidase verwendet. Als künstliches Substrat dient hier 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid (X-GlcA). Das X-GlcA wird von der β -Glucuronidase hydrolysiert. Durch Luftoxidation entsteht ein blauer Indigo-Farbstoff (Abbildung 2.0 7). Der Indigofarbstoff verbleibt im Gewebe und kann nach dem Entfernen des Chlorophylls dokumentiert werden (Jefferson et al. 1987).

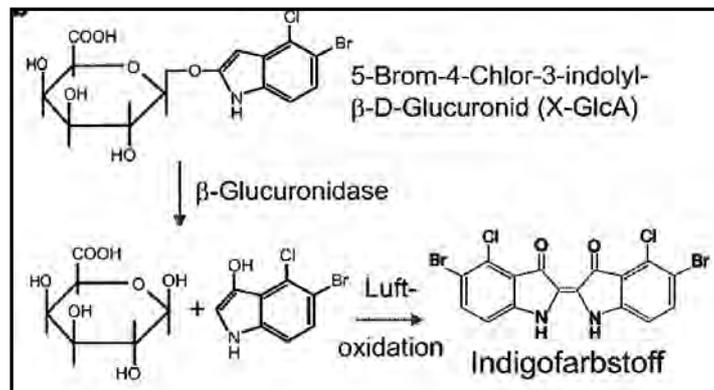
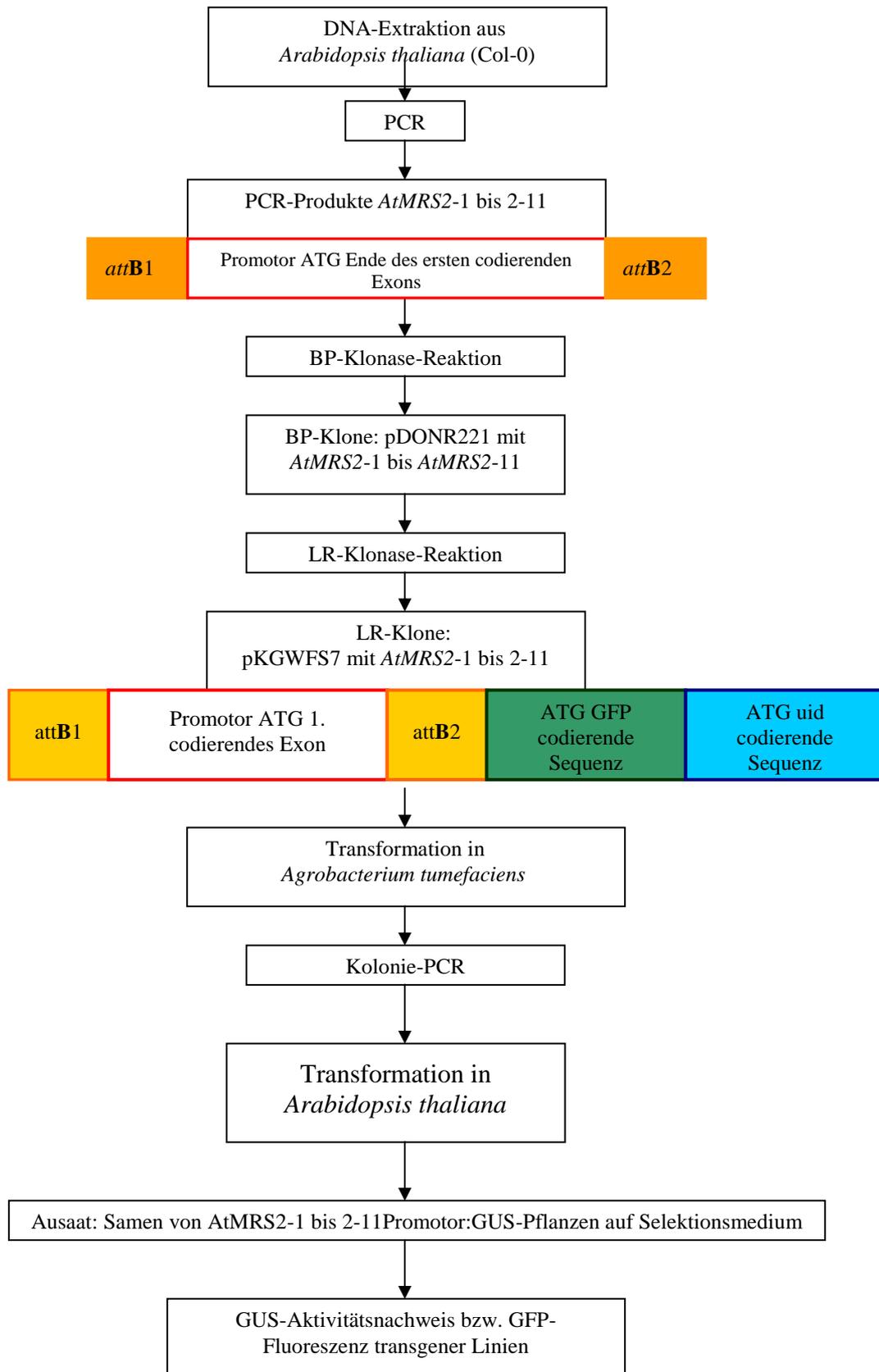


Abbildung 2.0 7: Nachweis-Reaktion der β -Glucuronidase-Aktivität entnommen aus (Kempken und Kempken 2004)

Der Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität erfolgt über die Umsetzung des Substrats 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl β -Glucuronid (X-GlcA). Die β -Glucuronidase spaltet das Substrat X-GlcA hydrolytisch und durch Luftoxidation entsteht ein blauer Farbstoff.

Das Pflanzenmaterial wurde mit X-GlcA-Substratlösung bedeckt. Es folgte eine Vakuumfiltration für 10 min. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte bei 37 °C für 24 h. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt und das Pflanzenmaterial durch das Ethanol für weitere 24 h bei 37 °C entfärbt.

2.2.7 Übersicht über den Klonierungsablauf Promotor:GUS



2.2.8 Herstellung von Semi-Dünnschnitten (*Arabidopsis*-Fixierung für die Elektronenmikroskopie)

Die gefärbten Pflanzenteile wurden in 1 cm x 1 cm große Stücke geschnitten, und unter leichtem Vakuum in Fixierlösung schwimmend für 30 min mit der Fixierlösung infiltriert. Reste der Fixierlösung wurden durch viermaliges waschen für jeweils zehn Minuten mit Waschpuffer entfernt. Die Gewebeteile wurden durch Inkubation in einer Ethanolreihe entwässert (Tabelle 2. 10):

Tabelle 2. 10: Inkubationszeiten und Waschschrte zur Entwässerung in Ethanol

Anzahl der Waschschrte	jeweiligen Inkubationszeit (min)	Konzentration
1	10	75 % Ethanol
3	10	90 % Ethanol
3	10	95 % Ethanol
4	15	Ethanol abs.

Die Einbettung erfolgte über mehrere Schritte mit aufsteigender Konzentration des *Spurr Low-Viscosity* Einbettungsmedium (Tabelle 2. 11):

Tabelle 2. 11: Einbettung, Mischungsverhältnisse von Ethanol und Einbettungsmedium mit Inkubationszeiten

Inkubationsdauer (h)	Mischungsverhältnis	
	Ethanol	Einbettungsmedium
mindestens 4	3	1
mindestens 4	1	1
mindestens 4	1	3
über Nacht		abs.
mindestens 4		abs.

Nach weiteren vier Stunden wurden die Gewebestücke in die Einbettungs-Form gegeben und mit frischem Einbettungsmedium bedeckt. Die Polymerisation des Einbettungsmediums erfolgte für 7,5 Stunden bei 70 °C. Die eingebetteten Gewebeteile wurden mit einem Mikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug 1 - 5 µm.

2.2.9 Arbeiten mit Hefe

2.2.9.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefezellen erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Obrdlik et al. (2004) nach Gietz (Gietz und Woods 2002). Kompetente Hefekolonien werden mit einer Impföse von festem YPD-Medium in 150 ml YPAD-Flüssigmedium überführt und die optische Dichte (OD) bestimmt. Aus dieser Flüssigkultur wird eine Verdünnung in einem zweiten Erlenmeyerkolben mit einer OD von 0,004 angesetzt. Beide Flüssigkulturen werden über Nacht bei 28 °C unter Schütteln bis zu einer OD von 0,7 inkubiert. Die Kultur, die die OD von 0,7 erreicht hat, wird auf sterile Falcons verteilt und durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 2500 g und bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die beiden Pellets in jeweils 5 ml H₂O bidest. resuspendiert. Anschließend wird wie zuvor durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 2500 g (Raumtemperatur) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in je 2,5 ml LiAc/TE-Puffer resuspendiert. Beide Pellets werden vereinigt, erneut durch Zentrifugation wie zuvor beschrieben pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 500 µl - 800 µl LiAc/Te-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die kompetenten Hefezellen auf Eis gelagert.

2.2.9.2 Transformation kompetenter Hefe-Zellen nach Gietz (2002)

Die Transformation kompetenter Hefezellen erfolgte nach der Methode von Gietz (Gietz und Woods 2002). Heringssperma-DNA wird für 3 Minuten aufgekocht und sofort auf Eis abgekühlt. Für die Transformation werden 20 µl DNA/TE-Mix (0,1 -10 µg Plasmid-DNA in 1 x TE-Puffer bzw. linearisierter Vektor und PCR-Produkt im Verhältnis 1:4) mit 20 µl Heringssperma-DNA gut vermischt und mit 4,5 µl LiAc versetzt. Der Transformationsansatz wird gut gemischt und 50 µl kompetente Hefezellen dazugegeben. Zu dem Transformationsansatz werden 300 µl PEG/LiAc-Puffer gegeben, gut gemischt und für 20 Minuten bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Dann wird der Transformationsansatz für 20 Minuten bei 42 °C inkubiert und durch Zentrifugation bei 6000 g für eine Minute pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet in 100 µl sterilem H₂O bidest resuspendiert. Die Zellen werden auf dem entsprechenden Selektionsmedium (SC +A+H+T+U-Medium für die C_{ub}-Fusionen bzw. SC+ A+H+L-Medium für die N_{ub}-Fusionen) mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.9.3 DNA-Extraktion aus Hefe (*lazy-bones* Protokoll)

Eine Hefekolonie wird benutzt um eine 5 ml Flüssigkultur anzuzüpfen. Das Wachstum erfolgt unter Selektion (SC+A+H+T+U-Medium C_{ub}-Fusion bzw. SC+A+H+L-Medium N_{ub}-Fusion) über Nacht rotierend bei 28 °C. 1,5 ml der Flüssigkultur werden durch Zentrifugation bei 5000 g für fünf Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl DNA-Extraktionslösung resuspendiert und mit 200 µl Phenol/Chloroform (24:1) und 300 µl Glasperlen versetzt. Die Inkubation erfolgt für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1000 rpm. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 g wird der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol für mindestens 30 Minuten bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 g wird der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Ethanol verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.10 Grundlagen zum mating based Split-Ubiquitin-System

Das Grundprinzip zur Analyse von Protein-Proteininteraktionen beruht auf der Kopplung zweier zu untersuchender Proteine mit jeweils einem Sensorprotein. Beide Sensorproteine zusammen führen bei einer Protein-Proteininteraktion der zu untersuchenden Proteine zu einer messbaren Reaktion. Der bekannteste Vertreter ist das Yeast-Two-Hybrid-System.

Eine Weiterentwicklung dieses Systems zur Untersuchung von Membranproteinen in der lebenden Zelle stellt das *mating based* Split-Ubiquitin-System (mbSUS) dar. Das Grundprinzip beruht darauf, dass Ubiquitin in eukaryotischen Zellen von ubiquitin-spezifischen Proteasen erkannt und vor der letzten Aminosäure geschnitten wird. Diese Erkennung erfolgt auch dann noch, wenn man das Ubiquitin in eine N-terminale (N_{ub}) und eine C-terminale Hälfte (C_{ub}) teilt, da sich beide Hälften spontan wieder zusammenlagern und so wieder funktionales Ubiquitin bilden (Abbildung 2.0 8).

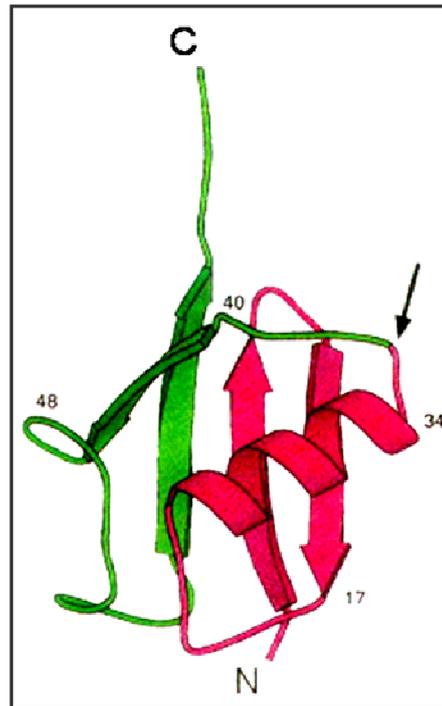


Abbildung 2.0 8 Schematische Darstellung des „geteilten“ Ubiquitins [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)]

Die N-terminale Hälfte (Aminosäuren 1-34) ist in weinrot dargestellt. Die C-terminale Hälfte (Aminosäuren 35 bis 76) ist in grün dargestellt. Der Punkt, an dem das Ubiquitin in zwei Hälften geteilt wird ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Spaltung des Ubiquitins vor der letzten Aminosäure erfolgt auch dann noch, wenn man an die C-terminalen Hälfte (C_{ub}) vor der letzten Aminosäure ein Reportermolekül anhängt (Abbildung 2.0 9 A). Lagern sich beide Hälften zusammen, dann wird Ubiquitin durch die ubiquitin-spezifischen Proteasen erkannt, und das Reportermolekül mit der letzten Aminosäure abgespalten (Abbildung 2.0 9 B).

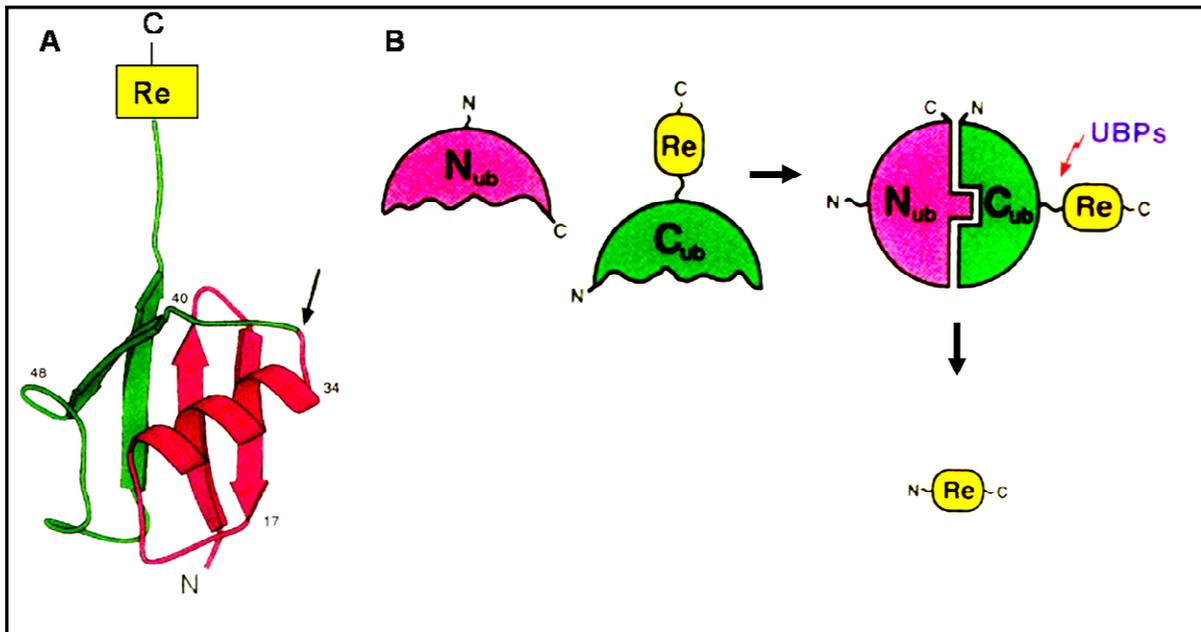


Abbildung 2.0 9 Schematische Darstellung der Zusammenlagerung der beiden Ubiquitinhälften [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)]

A) zeigt die C- und die N-terminale Hälfte des Ubiquitins, der Teilungspunkt des Ubiquitins in zwei Hälften ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. An den C-Terminus wurde vor der letzten Aminosäure ein Reporterprotein eingebaut, dargestellt als gelber Kasten mit der Beschriftung **Re**.

B) zeigt die Zusammenlagerung der N-terminalen Hälfte (N_{ub} weinrot) und der C-terminalen Hälfte (C_{ub} grün mit dem angehängten Reporterprotein Re, gelb). Lagern sich beide Hälften zusammen, dann erkennen ubiquitin-spezifische Proteasen (roter, gezackter Pfeil, UBPs) das Ubiquitin und spalten das Reporterprotein ab.

Da sich beide Hälften spontan wieder zusammenlagern können, wurde das System modifiziert. An Position 13 wurde Isoleucin gegen Glycin ausgetauscht, wodurch die Affinität der N-terminalen Hälfte (N_{ubG}) zur C-terminalen Hälfte (C_{ub}) stark reduziert wird (Abbildung 2.0 10 A, blauer Stern). Beide Hälften können sich nicht oder nur sehr langsam wieder zusammenlagern. Somit erfolgt keine Erkennung mehr durch die ubiquitin-spezifischen Proteasen und das Reporterprotein wird nicht mehr abgespalten (Abbildung 2.0 10 B).

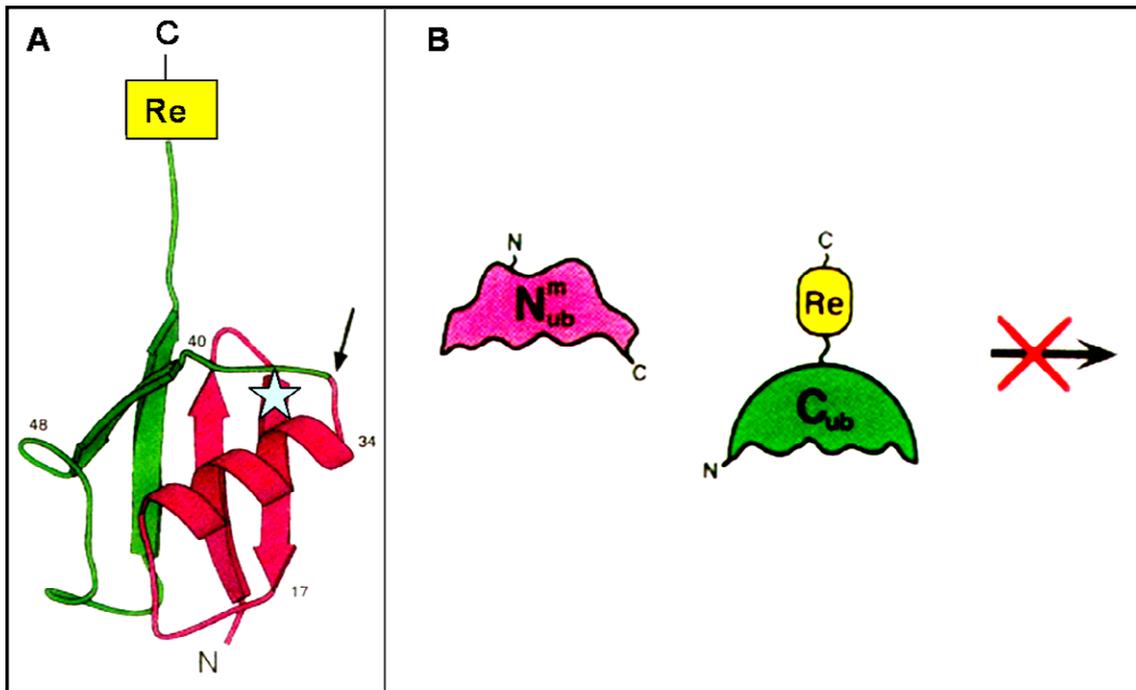


Abbildung 2.0 10 Mutation des Ubiquitins [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)]

A) zeigt die schematische Darstellung des Ubiquitins. Die N-terminale Hälfte N_{ub}^m (N_{ubG}) ist in weinrot dargestellt. Die C-terminale Hälfte (C_{ub}) ist in grün dargestellt. Der Teilungspunkt der beiden Hälften ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. An Position 13 wurde Isoleucin durch Glycin ausgetauscht (hellblauer Stern).

B) zeigt die Folge des Austausches von Isoleucin gegen Glycin an Position 13 (N-terminale Hälfte $N_{ub}^m = N_{ubG}$). Beide Hälften des Ubiquitins können sich nicht mehr spontan zusammenlagern.

Die Zusammenlagerung der beiden Hälften, N_{ubG} mit C_{ub} kann nun nur noch erfolgen, wenn beide Hälften durch einen zusätzlichen „Proteinkontakt“ in räumliche Nähe gebracht werden (Abbildung 2.0 11 A). Dieser „Proteinkontakt“ kann durch die zu untersuchenden Proteine, die jeweils mit der C- bzw. der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert sind, hergestellt werden (Abbildung 2.0 11 B). Interagieren die Proteine P1 und P2 (Abbildung 2.0 11 B), dann können sich die beiden Hälften des Ubiquitins wieder zusammenlagern (Abbildung 2.0 11 C). Es entsteht wieder funktionales Ubiquitin, das durch ubiquitinspezifische Proteasen erkannt und geschnitten wird (Abbildung 2.0 11 C). Ubiquitin spezifische Proteasen schneiden das Reportermolekül an der C_{ub} -Hälfte ab (Abbildung 2.0 11 D) und die Protein-Proteininteraktion kann nachgewiesen werden (Johnsson und Varshavsky 1994, Stagljar et al. 1998).

In einer Weiterentwicklung des System wurde das Reportermolekül durch den künstlichen Transkriptionsfaktor für das Protein A, Lex-A-VP16 (PLV) ersetzt (Abbildung 2.0 11 E). Es wird zudem ein Hefestamm verwendet, der die Reportergene *X-Gal* und *His3* nur bei Aktivierung des *lexA* Promotors exprimiert (Abbildung 2.0 11 E). PLV wird bei einer Protein-

2 Material und Methoden

Proteininteraktion abschnitten und wandert in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression der LexA gekoppelten Reportergene, *His3* und *LacZ* aktiviert (Abbildung 2.0 11 E). Der verwendete Hefestamm kann Histidin nicht synthetisieren. Die Protein-Proteininteraktion kann dann durch Wachstum auf Nährmedium ohne Histidin, und durch eine Überschichtung mit X-Gal-Lösung (Blaufärbung der Hefekolonien) nachgewiesen werden. Der Hefestamm kann Histidin wieder selbst synthetisieren, wenn bei einer Protein-Proteininteraktion der Transkriptionsfaktor PLV abgespalten wird (Abbildung 2.0 11 D, E) und die *lexA*-gekoppelte Transkription von *His3* aktiviert (Obrdlik et al. 2004, Stagljär et al. 1998).

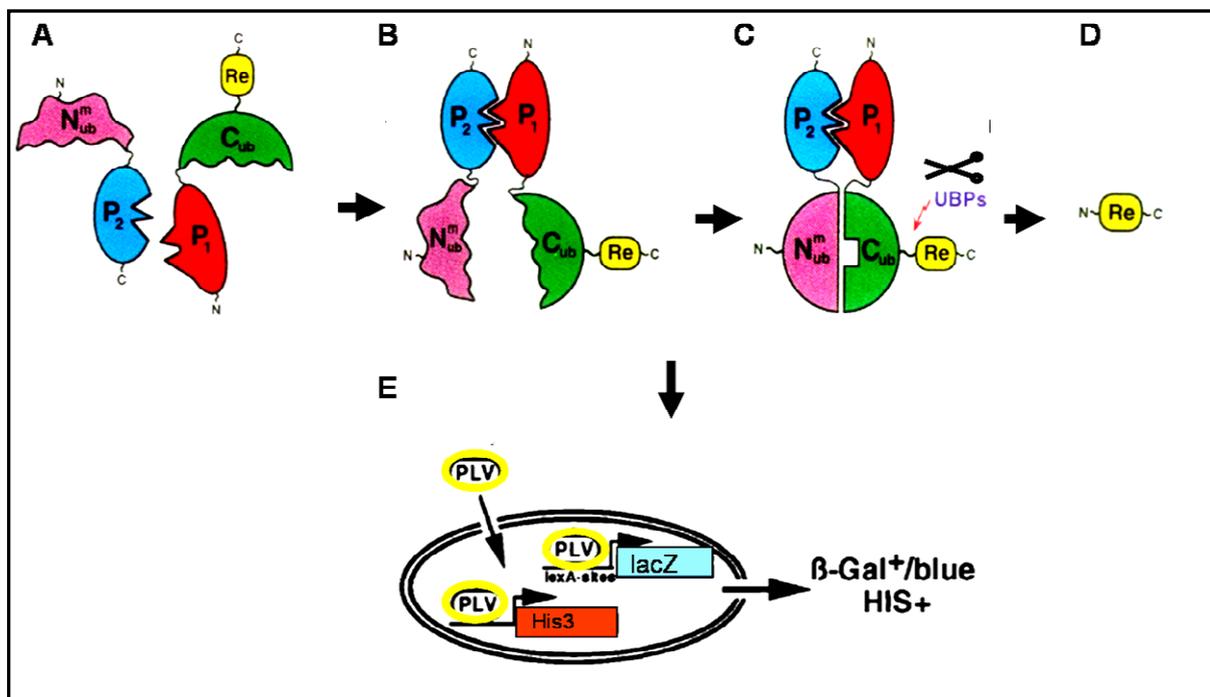


Abbildung 2.0 11: Schematische Darstellung zum Prinzip des *mating based* Split-Ubiquitin-Systems (Johnsson und Varshavsky 1994, Obrdlik et al. 2004, Stagljär et al. 1998)

A) zeigt die mutierte N-terminale Hälfte ($N_{ub}^m = N_{ubG}$, flügelartig) fusioniert mit Protein (Chérel et al. 2002) und die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (C_{ub} , grün) mit dem Reportermolekül (Re, gelb) vor der letzten Aminosäure, N-terminal fusioniert mit dem Protein 1 (P1, rot) Beide Hälften werden in einer Zelle coexprimiert.

B) zeigt schematisch die Protein-Proteininteraktion von Protein1 und Protein2.

C) zeigt die Zusammenlagerung der C- und der N-terminalen Hälften des Ubiquitins, die Protein-Proteininteraktion von Protein P1 mit Protein P2 und resultierend aus der Interaktion, die Erkennung des Ubiquitins durch ubiquitinspezifische Proteasen (UBPs, roter gezackter Pfeil).

D) zeigt als Resultat der Protein-Proteininteraktion das abgespaltene, freie Reporter-molekül (Re= PLV).

E) zeigt die Wanderung des Reporter-moleküls PLV (gelber Rand) in den Zellkern, wo es als künstlicher Transkriptionsfaktor die Transkription der Reportergene *lacZ* und *His3* aktiviert. Diese Transkription und somit die Protein-Proteininteraktion kann durch Wachstum auf Medium ohne Histidin und durch den Nachweis β -Galactosidaseaktivität dokumentiert werden.

In dem System von Obrdlik wurde zusätzlich zu den Reportergenen *His3* und β -Glucuronidase noch als Reportergen *Ade2* eingesetzt. Der verwendete Hefestamm kann außer

Histidin auch Adenin nicht mehr selbst synthetisieren, da das Enzym AIR-Carboxylase fehlt. 5-Phospho-ribosyl-amino-imidazol wird mit 5-Phospho-ribosyl-amino-imidazol-carboxylat zu einem roten Pigment oxidiert wodurch sich die Hefe rot färbt (Obrdlik et al. 2004).

2.2.10.1 Herstellung der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktions-Analysen

Zur Herstellung der Konstrukte für die Protein-Proteininteraktions-Analysen wurde mit dem NucleoSpin[®]-RNA Plant Kit von Macherey-Nagel (2.1.8, Tabelle 2. 3), RNA aus dem Organ der Pflanze isoliert, in dem der entsprechende Transporter exprimiert wird. Die cDNA wurde mit der unter 2.1.8 angegebenen Reversen Transkriptase von Fermentas entsprechend der Angaben des Herstellers synthetisiert und in die PCR eingesetzt. Mit genspezifischen Primern (siehe Primer-Tabelle im Anhang) wurden PCR-Produkte für alle Mitglieder der Genfamilie, außer den beiden Pseudogenen *AtMRS2-8* und *AtMRS2-9*, amplifiziert und mit dem Gel-Extraktionskit von Eppendorf (2.1.8, Tabelle 2. 3) aufgereinigt. Die verwendeten Primer sind ähnlich aufgebaut, wie die bereits unter 2.2.2 beschriebenen GATEWAY-Primer. Sie bestehen aus einem genspezifischen Bereich und den **B**-Sequenzen, die gegenüber den *attB*-Sequenzen aus *E. coli* leicht verändert wurden. Die resultierenden PCR-Produkte werden von **B**-Sequenzen flankiert und können so auch über die BP-Klonase-Reaktion sowohl mit dem Donorvektor als auch mit den Hefevektoren rekombinieren.

pMetYCgate wurde für die Fusion mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins (C_{ub}) und der Vektor pNXgate33-3HA für die Fusion mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (N_{ubG}) verwendet (Abbildung 2.0 12). pMetYCgate ist ein low-copy Vektor, der unter anderem den *Met25*-Promotor (Methionin-reprimierbarer Promotor), die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (C_{ub}) und das Gen für die Synthese von Leucin enthält. Durch Methionin im Medium kann die Expressionsstärke des C_{ub} -Fusions-Proteins und die Reporterogenaktivität reguliert werden. Für die Herstellung der Konstrukte wurde pMetYCgate mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *HindIII* geschnitten, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Vektorbande mit dem unter 2.1.8 aufgeführten Gelelektrophoresekit von Eppendorf (Tabelle 2. 3) entsprechend der Anleitung des Herstellers aus dem Gel eluiert. Der linearisierte Vektor wurde für das so genannte *in vivo cloning* (2.2.8.2) zur Hefetransformation verwendet.

Bei dem Vektor pNXgate33-3HA handelt es sich ebenfalls um ein low-copy Plasmid (Abbildung 2.0 12). Das N_{ubG} befindet sich unter Kontrolle des *ADH*-Promotors der Hefe und enthält zusätzlich das Gen für die Biosynthese von Tryptophan. Für die Herstellung der

2 Material und Methoden

Fusionskonstrukte wurde der Vektor zunächst mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SmaI* geschnitten und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Vektorbande wurde mit dem Gelelutionskit von Eppendorf (2.1.8, Tabelle 2. 3) entsprechend der Anleitung des Herstellers aus dem Gel eluiert und in die Hefe transformiert (2.2.8.2).

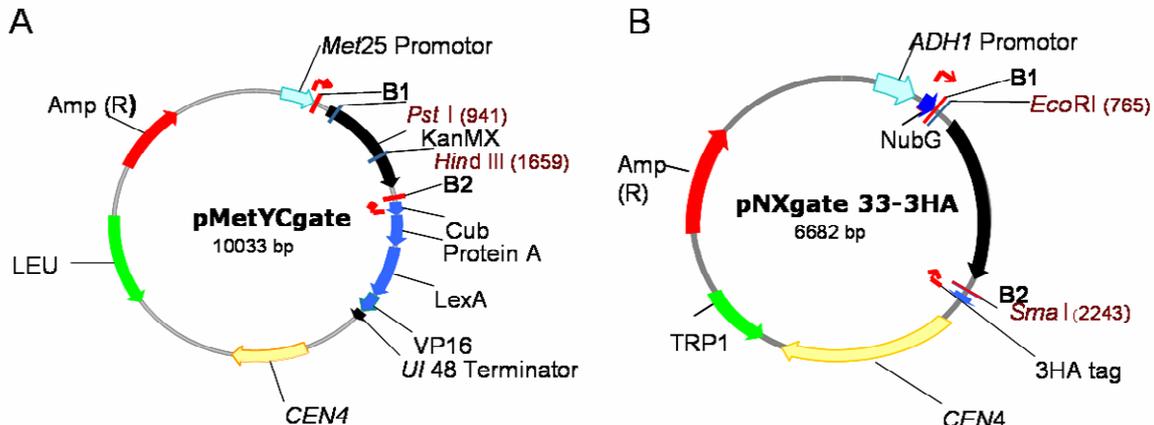


Abbildung 2.0 12: Vektorkarten für den Hefevektor pMetYCgate zur Herstellung der Cub-Fusionen und Vektorkarte für den Hefevektor pNXgate33-3HA zur Herstellung der N_{ubG}-Fusionen. Die Angaben zu den Vektoren wurden der Anleitung von P. Obrdlik entnommen und die Vektorkarten mit dem Programm VectorNTI erstellt (Obrdlik et al. 2004).

A) Vektorkarte des Hefevektor pMetYCgate: Die für die Rekombination essentiellen B1 und B2 –Stellen sind durch rote Striche gekennzeichnet. Der Methionin-reprimierbare Promotor p*Met25* ist als hellblauer Blockpfeil dargestellt, der Terminator *term* als schwarzer Blockpfeil. Die C-terminale Hälfte des Ubiquitins, C_{ub} ist als dunkelblauer Blockpfeil dargestellt, ebenso der künstliche Transkriptionsfaktor PLV für *lexA* gekoppelte Reportergene, bestehend aus dem Protein A, LexA und VP16. Der low-copy-Hefepromotor *CEN4* (*origin of replication*) ist als gelber Blockpfeil dargestellt. Das Gen für die Biosynthese von Leucin ist als grüner Blockpfeil dargestellt. Ein weiteres wichtiges Element des Vektors ist die Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli* bei der Verifizierung der Konstrukte, dargestellt als roter Pfeil. Die Kanamycinresistenz, die bei der Rekombination gegen die codierende Sequenz des jeweiligen *AtMRS2*-Gens ausgetauscht wird, ist in Form eines schwarzen Kastenpfeils dargestellt. Die Bindestellen für die bei der Sequenzierung verwendeten Primer p*MET25* im Methionin-reprimierbaren Promotor und C_{ub} (C-terminalen Hälfte des Ubiquitins) sind durch rote eckige Pfeile gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur die Erkennungsstellen für die tatsächlich verwendeten Restriktionsendonukleasen *PstI* und *HindIII* eingezeichnet.

B) Vektorkarte des Hefevektors pNXgate33-3HA: Essentielle Elemente des Vektors sind der Promotor für die Alkoholdehydrogenase aus Hefe, p*ADH1* dargestellt als hellblauer Blockpfeil und die mutierte N-terminale Hälfte des Ubiquitins, NubG, dargestellt als dunkelblauer Blockpfeil, sowie das HA-Tag, dargestellt als blauer Blockpfeil. Wie in der Vektorkarte für den Vektor pMetYCgate sind hier ebenfalls die Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli* als roter Blockpfeil und der *CEN4* *origin of replication* als gelber Blockpfeil dargestellt. Das Gen für die Biosynthese von Tryptophan ist als grüner Blockpfeil dargestellt. Ebenso sind die Bindestellen der für die Sequenzierung verwendeten Primer als eckige rote Pfeile in der N-terminalen Hälfte (N_{ubG}) und dem HA-Tag gekennzeichnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde auch in der Vektorkarte nur die Position der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *EcoR I* und *Sma I* eingezeichnet.

Die eluierten PCR-Produkte wurden zusammen mit dem linearisierten, aus dem Gel eluierten Vektor für die C_{ub}- bzw. N_{ubG}-Fusionen nach Gietz (Gietz und Woods 2002) in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert (2.2.8.2). Die Hefe sollte dann über so genanntes *in vivo cloning* das PCR-Produkt mit dem Vektor rekombinieren, da sie die für die unter 2.3 als

2 Material und Methoden

BP-Klonase-Reaktion beschriebenen Rekombinationsreaktion notwendigen Proteine und Enzyme enthält. Aufgrund der schlechten Ausbeute an rekombinierten Vektoren wurden schließlich der linearisierte Vektor und das PCR-Produkt über die BP-Klonase-Reaktion rekombiniert, sequenziert und die Plasmid-DNA in die Hefe transformiert. Die so erhaltenen C_{ub} - bzw. N_{ubG} -Fusions-Konstrukte wurden zur Analyse der Protein-Proteininteraktion in den jeweiligen Hefe-Stamm transformiert.

Für die C_{ub} -Fusionen wurde der Hefestamm THY.AP4 verwendet (Abbildung 2.0 13). Der Hefe-Stamm THY.AP4 enthält eine Mutation in den Genen für die Enzyme der Synthese von Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil. Zusätzlich enthält der Hefestamm die Reporter-Gene *Ade2*, *His3* und *lacZ* unter Kontrolle des *lexA*-Promotors. Die Selektion des transformierten Hefestamms erfolgte auf Selektionsmedium mit Adenin, Histidin, Tryptophan und Uracil, da die Biosynthese von Leucin durch die Aufnahme des Vektors wieder möglich sein sollte (SC+A+H+T+U).

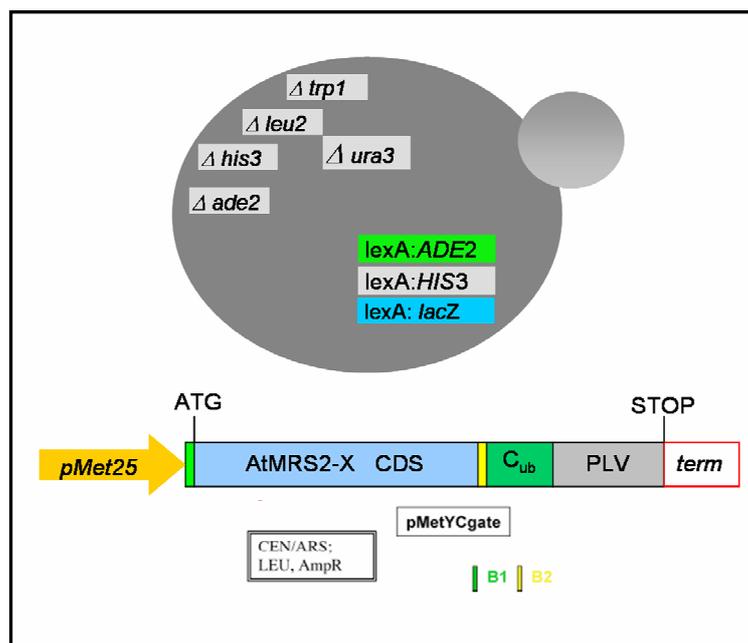


Abbildung 2.0 13 Schematische Darstellung des Hefestamms THY.AP4 und eines Ausschnitts des Vektors *pMetYCgate* für die C_{ub} -Fusion

Der Hefestamm THY.AP4 enthält Mutationen in verschiedenen Schritten zur Biosynthese von Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil. Somit muss dem Medium Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil zugegeben werden, damit die Hefe wachsen kann. Im unteren Bereich der Abbildung ist der relevante Ausschnitt des für die C_{ub} -Fusionen verwendeten Vektors *pMetYCgate* dargestellt. Gezeigt ist von links nach rechts der Methionin-reprimierbare Promotor *pMet25*, die B1-Sequenz, gefolgt vom ATG der codierenden Sequenz des jeweiligen *AtMRS2*-Gens und der B2-Sequenz. Daran schließt sich die C-terminale Hälfte des Ubiquitins und der künstliche Transkriptionsfaktor PLV, gefolgt von der Terminatorsequenz an. Im grauen Kasten unterhalb des Ausschnitts befinden sich weitere relevante Angaben zum Vektor: CEN steht für low copy-Vektor, LEU für ein an der Biosynthese von Leucin beteiligtes Enzym und AmpR für die Ampicillinresistenz bei der Selektion in *E. coli*. Durch die Aufnahme des Vektors kann die Hefe wieder Leucin synthetisieren. Somit wird dem Selektionsmedium nur Adenin, Histidin, Tryptophan und Uracil zugesetzt (SC+A+H+T+U).

2 Material und Methoden

Der Hefestamm THY.AP5 enthält eine Mutation in der Synthese von Adenin, Histidin und Leucin. Die Selektion der Hefe-Kolonien mit enthaltenem Plasmid, erfolgt bei den N_{ubG} -Fusionen über Medium mit Adenin, Histidin und Leucin (Abbildung 2.0 14). Durch die Aufnahme des Plasmids sollte die Hefe Tryptophan wieder selbst synthetisieren können.

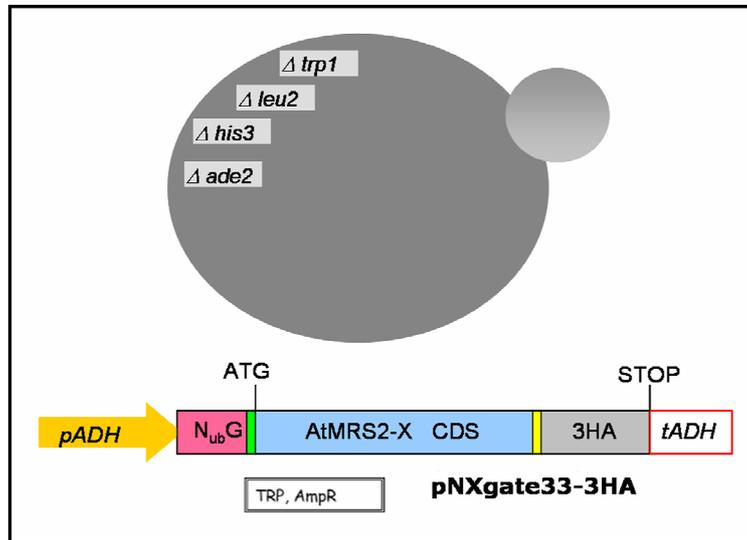


Abbildung 2.0 14 Hefestamm THY.AP5 und Ausschnitt des Vektors pNXGate33-3HA für die N_{ub} - und N_{ubG} -Fusionen

Der Hefestamm THY.AP5 enthält Mutationen an verschiedenen Punkten der Biosynthese von Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan. Dem Medium muss Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil zugegeben werden, damit die Hefe wachsen kann. Im unteren Bereich der Abbildung ist der relevante Ausschnitt des für die N_{ubG} -Fusionen verwendeten Vektors pNXgate33-3HA dargestellt. Gezeigt ist von links nach rechts der Alkoholdehydrogenase Promotor *pADH*, N_{ubG} , die B1-Sequenz, gefolgt von der codierenden Sequenz des jeweiligen *AtMRS2*-Gens und der B2-Sequenz. Daran schließt sich das 3HA-Tag, ein STOP-Codon und die Terminatorsequenz an. Im grauen Kasten unterhalb des Ausschnitts befinden sich weitere relevante Angaben zum Vektor: „TRP“ für ein an der Biosynthese von Tryptophan beteiligtes Enzym und „AmpR“ für die Ampicillinresistenz bei der Selektion in *Es. coli*. Durch die Aufnahme des Vektors kann die Hefe wieder Tryptophan synthetisieren. Somit wird dem Selektionsmedium nur Adenin, Histidin und Leucin zugesetzt (SC+A+H+L).

2.2.10.2 Mating und Nachweis der Protein-Proteininteraktion

Fünf Hefe-Kolonien von jeweils einem C_{ub} bzw. N_{ubG} - Transformationsansatz wurden in 100 μ l H_2O bidest. Resuspendiert mit und 20 – 100 μ l der 100 μ l eine 5 ml Flüssigkultur (SC+A+H+T+U für C_{ub} -Fusionen und SC+A+H+L für die N_{ubG} -Fusionen) angeimpft. An dieser Stelle sollten alle Flüssigkulturen eine ähnliche OD haben. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht in einem rotierenden Schüttler bei 28 °C inkubiert. Je nachdem wie stark die C_{ub} - und die N_{ubG} -Flüssigkulturen gewachsen waren, wurden Aliquots, bzw. die gesamte Kultur durch Zentrifugation bei Raumtemperatur pelletiert und in 200 μ l (für 13 Kreuzungen) YPD-Medium resuspendiert. Alle Ansätze sollten für die Kreuzungen die gleiche OD aufweisen. Als Negativ-Kontrollen dienten jeweils die leeren Vektoren pMetYCGate bzw.

2 Material und Methoden

pNXgate33-3HA. Als Positiv-Kontrolle wurde der Vektor pNubWTXgate verwendet, dieser enthält die N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation und sollte immer interagieren. In je eine Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden die jeweils 4 μ l C_{ub} - und 4 μ l N_{ubG} -Hefesuspension gemischt, und ein 4 μ l Aliquot auf eine YPD-Platte aufgetropft und getrocknet. Diese Platte wurde ÜN bei 28 °C inkubiert, um diploide Zellen zu erhalten.

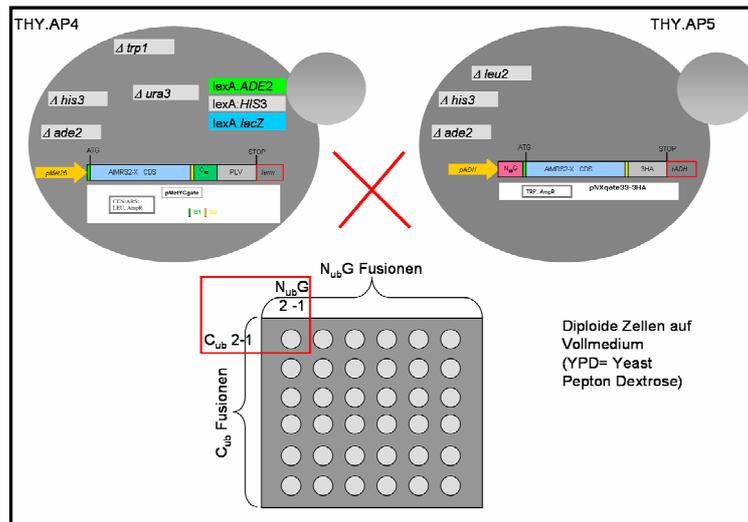


Abbildung 2.0 15 Schematische Darstellung der Kreuzung

In der oberen Hälfte der Abbildung ist links der Hefestamm THY.AP4 mit der C_{ub} -Fusion dargestellt. Der Hefestamm THY.AP4 weist nach der Aufnahme des Plasmids nur noch einen Defekt in der Biosynthese von Adenin, Tryptophan und Uracil auf. In der oberen Hälfte der Abbildung ist rechts der Hefestamm THY.AP5 mit der N_{ubG} -Fusion dargestellt. Durch die Aufnahme des Plasmids kann die Hefe Tryptophan wieder selbst synthetisieren und benötigt im Medium nur noch Adenin, Histidin und Leucin. In der unteren Hälfte der Abbildung ist schematisch das Auftropfschema der gemischten C_{ub} - und N_{ubG} -Fusions-Hefekulturen dargestellt. Die gekreuzten Hefestämme werden auf YPD-Vollmedium über Nacht inkubiert um so diploide Hefezellen zu erhalten, da die C_{ub} - und N_{ubG} -Fusionen in einer Zelle coexpressiert werden müssen.

Von dieser Platte wurden die Hefe-Kolonien durch einen Stempel auf SC+A+H Medium übertragen und für zwei Tage bei 28 °C weiter inkubiert. Auf diesem Medium sollte für alle Hefen wieder ein Wachstum möglich sein, da die diploiden Hefezellen Leucin, Tryptophan und Uracil wieder selbst synthetisieren können.

Die Protein-Proteininteraktion wurde durch Überimpfen der diploiden Hefezellen von SC+A+H-Festmedium auf selektives Medium ohne Aminosäuren (SD-Medium mit Methionin) dokumentiert. Es wurde selektives Medium mit verschiedenen Methionin-Konzentrationen für die Wachstums-Analysen verwendet, um die Menge des C_{ub} -Proteins zu titrieren und so eine Hintergrundaktivität auszuschließen. Bei einer Protein-Proteininteraktion sollte der künstliche Transkriptionsfaktor PLV abgespalten werden, in den Zellkern wandern und dort die Expression der unter Kontrolle des *lexA*-Promotors vorliegenden Reportergene

2 Material und Methoden

Ade2, *Hist3* und *lacZ* aktivieren (Abbildung 2.0 11). Die Hefe benötigt dann keinen Zusatz von Adenin und Histidin im Medium. Es können somit nur die Hefezellen wachsen, die die C_{ub} - und N_{ubG} -Fusionsproteine in einer Zelle coexprimieren und bei denen eine Interaktion der AtMRS2-Proteine vorliegt (Abbildung 2.0 16). Die sensitivere Methode, die Proteininteraktion durch Wachstum auf selektivem Medium zu testen, wurde durch Überimpfen auf SD-Medium ohne Adenin und Histidin analysiert. Durch eine aufsteigende Methionin-Reihe kann die Reporter-Aktivität des C_{ub} -Fusionsproteins reprimiert werden, um so falsch positive Signale bzw. eine Hintergrundaktivität zu erkennen.

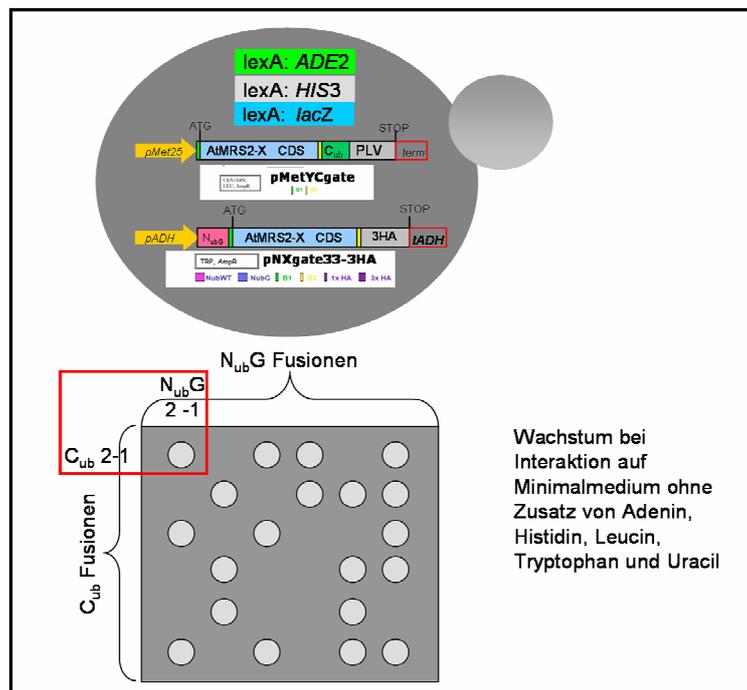


Abbildung 2.0 16 Schematische Darstellung der Interaktion durch Wachstum auf Medium ohne Aminosäurezusatz

Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die beiden Hefestämme THY.AP4, der das C_{ub} -Fusionsprotein exprimiert und THY.AP5, der das N_{ubG} -Fusionsprotein exprimiert. Durch Kreuzen beider Hefestämme werden die jeweiligen C_{ub} - und N_{ubG} -Fusionen coexprimiert. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt das Wachstum bei einer Protein-Proteininteraktion. Interagieren beide Proteine miteinander, dann erfolgte die Aktivierung der *lexA* gekoppelten Reportergene *Ade2*, *His3* und *lacZ*, wodurch ein Wachstum auf Medium ohne Adenin, Histidin möglich ist.

Die Protein-Proteininteraktion wurde außerdem durch Überschichtung der SC+A+H-Platte mit X-Gal-Lösung dokumentiert. Beide Nachweismethoden der Proteininteraktion kommen durch das Abspalten des künstlichen Transkriptionsfaktors PLV von der C_{ub} -Hälfte des interagierenden Fusionsproteins zustande, der in der Hefe-Zelle die Transkription der *lexA* gekoppelten Reportergene *Ade2*, *His3* und *lacZ* aktiviert. Die Aktivierung von *lacZ* kann durch Überschichtung mit X-Gal-Lösung nachgewiesen werden. Bei einer Interaktion färbt

2 Material und Methoden

sich die Hefekolonie blau (Abbildung 2.0 17 untere Hälfte). Zur Herstellung des Überschichtungs-Mediums wird zunächst 0,5 g Agarose in 100 ml Z-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 40 °C wird dem Medium X-Gal-Lösung (Endkonzentration 1,4 mg/ml) und SDS (Endkonzentration 2 %) zugegeben. Die Lösung wird auf die SC+A+H Platte gegossen und gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der überschichteten Platten erfolgt über Nacht bei 37 °C.

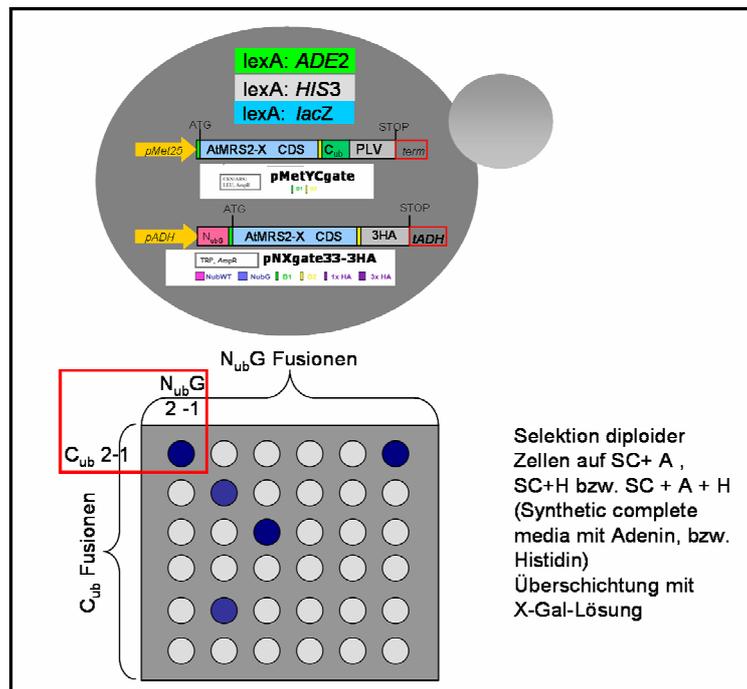
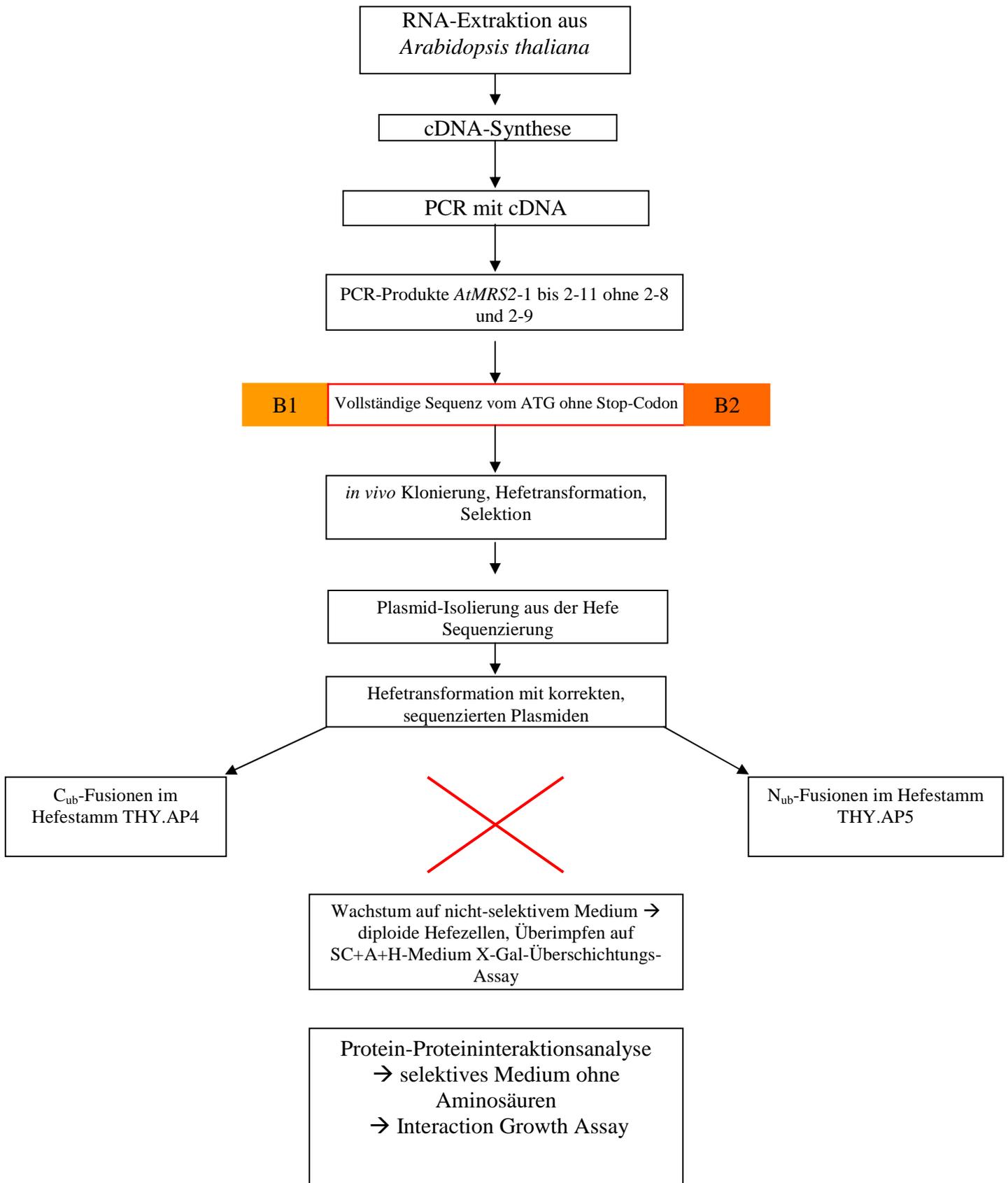


Abbildung 2.0 17 Schematische Darstellung der Interaktion durch Überschichtung mit X-Gal-Medium

In der oberen Hälfte der Abbildung sind die beiden Hefestämme (THY.AP4, *C_{ub}*-Fusionsprotein) und THY.AP5, *N_{ubG}*-Fusionsprotein) dargestellt. Durch Kreuzen beider Hefestämme werden die jeweiligen *C_{ub}*- und *N_{ubG}*-Fusionen in einer Zelle coexprimiert. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt schematisch eine Expression des *lexA* gekoppelten Reportergens für das Enzym β -Galactosidase. Bei einer Protein-Proteininteraktion der zu analysierenden Proteine erfolgt die Aktivierung der *lexA* gekoppelten Reportergene *Ade2*, *His3* und *lacZ*. Die Interaktion kann dann durch Überschichtung der Hefekolonien mit X-Gal-Medium nachgewiesen werden.

2.2.11 Übersicht über den Klonierungsablauf: Das mating based Split-Ubiquitin-System



3 Ergebnisse

Über den pflanzlichen Magnesiumtransport und dessen Regulationsmechanismen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Der bisher am besten charakterisierte Magnesiumtransporter in *Arabidopsis thaliana* ist der AtMHX-Transporter, der mit stärkerer Intensität im vaskulären Gewebe exprimiert wird, aber auch in allen anderen Geweben der Pflanze vorkommt (Shaul et al. 1999, Shaul 2002). Über die Aufnahme von Magnesium über die Wurzel, den Transport durch das vaskuläre hin zum photosynthetisch aktiven Gewebe oder in die Blüte bzw. Schoten fehlen bisher Informationen. Erste Untersuchungen zur Lokalisation der AtMRS2-Proteine durch eine Fusion mit dem GFP, zeigten für AtMRS2-1 und AtMRS2-2 keine eindeutigen Ergebnisse (Schock et al. 2000), für AtMRS2-6 wurde eine mitochondriale Lokalisation vermutet (unveröffentlichte Daten (Schock 2000)). AtMRS2-1 konnte mit der mitochondrialen Lokalisationssequenz der Hefe eine $\Delta mrs2$ Mutante komplementieren (Schock et al. 2000). Kurze Zeit später wurden Ergebnisse über die Expression in *Landsberg erecta* veröffentlicht. Die dort publizierten RT-PCR-Analysen zeigten eine ubiquitäre Expression für alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie, außer *AtMRS2-6* (Li et al. 2001). Für AtMRS2-10 wurde in Fusion mit dem GFP eine Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt. AtMRS2-10 konnte eine *Salmonella*-Mutante, der die Magnesiumtransportsysteme MgtA/B und CorA fehlen, komplementieren. Es wurde außerdem gezeigt, dass AtMRS2-10 außer Magnesium in *Salmonella* auch andere divalente Kationen wie Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} und Mn^{2+} transportieren kann, allerdings außerhalb der physiologisch relevanten Konzentrationen. Aufgrund früherer Analysen zum Einfluss von Aluminium auf den Magnesiumtransport (Rengel und Robinson 1989), wurde hierzu der Einfluss auf AtMRS2-1 in Hefe und AtMRS2-10 in *Salmonella* untersucht. Beide zeigten eine Inhibition unter physiologisch relevanten Bedingungen (Li et al. 2001). Eine Überexpression von AtMRS2-10 in *Nicotiana benthamiana* verlieh der Pflanze eine Toleranz gegen Aluminium (Deng et al. 2006). Die neuesten Ergebnisse zeigen für alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie eine Komplementation in Hefe. GFP-Fusion und Promotor:GUS-Fusionen zeigten für AtMRS2-11 eine Lokalisation im Chloroplasten und eine Expression im chlorophyllhaltigen Gewebe und den Stomata (Drummond et al. 2006). Unveröffentlichte Daten zeigen außerdem, dass AtMRS2-5 das Wachstum der *mrs2*-Mutante komplementieren und den Transport von Magnesium vermitteln kann (M. Gebert, unveröffentlichte Daten; (Weghuber et al. 2006)).

3.1 Expressionsanalyse der *AtMRS2*-Genfamilie

Um eine mögliche Funktion der am Magnesiumtransport beteiligten Gene und deren Expressionsort zu untersuchen, verwendet man Reportergene. Das GUS-Reportergensystem ist hier optimal, da die Pflanze keine endogene Aktivität besitzt. Das Enzym β -Glucuronidase besitzt eine hohe Stabilität und wirkt nicht schädigend auf die Pflanze. Das Nachweisprodukt ist in der Pflanze sehr stabil, so dass sich die Blaufärbung gut dokumentieren lässt (Gilissen et al. 1998, Jefferson et al. 1987, Jefferson 1989).

Zur Expressionsanalyse der einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie wurde jeweils der stromaufwärts liegende, nicht codierende Bereich, bestehend aus dem Sequenzbereich des jeweilig stromaufwärts liegenden Gens, einschließlich des ersten Exons des jeweiligen *AtMRS2*-X-Gens, vor die Reportergene *EGFP* und *uidA* (β -Glucuronidase) kloniert. Wird das zu analysierende Gen exprimiert, so erfolgt gleichzeitig die Expression der Reportergene *EGFP* und des Enzyms β -Glucuronidase, die beide leicht nachgewiesen werden können. Die Klonierungen erfolgten mit der Gateway^R-Technologie der Firma Invitrogen in dem Expressions-Vektor pKGWFS7 (Karimi et al. 2002).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Größe der stromaufwärts liegenden Sequenzbereiche und des ersten Exons der jeweiligen *AtMRS2*-Gene.

Tabelle 3. 1: Größe der PCR-Produkte zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionen

Konstrukt	Größe der stromaufwärts liegenden Sequenz (bp)	Größe der Sequenz des 1. Exons (bp)	Größe des PCR-Produkts (bp) mit 58 bp att-Sequenzen
<i>AtMRS2</i> -1	1082	580	1720
<i>AtMRS2</i> -2	789	245	1092
<i>AtMRS2</i> -3	460	174	692
<i>AtMRS2</i> -4	1195	336	1589
<i>AtMRS2</i> -5	1062	440	1560
<i>AtMRS2</i> -6	1422	287	1767
<i>AtMRS2</i> -7	550	251	859
<i>AtMRS2</i> -8	837	230	1125
<i>AtMRS2</i> -10	1251	590	1899
<i>AtMRS2</i> -11	706	392	1156

3 Ergebnisse

In der Diplomarbeit wurde bereits mit der Herstellung und Analyse der Promotor:GUS-Fusionskonstrukte begonnen, aufgrund eines Fehlers beim Primerdesign war nur das Konstrukt für *AtMRS2-11* funktional. Der Aufbau der Konstrukte ist in Abbildung 3.0 1 schematisch dargestellt. Die Amplifikation erfolgte aus genomischer DNA.

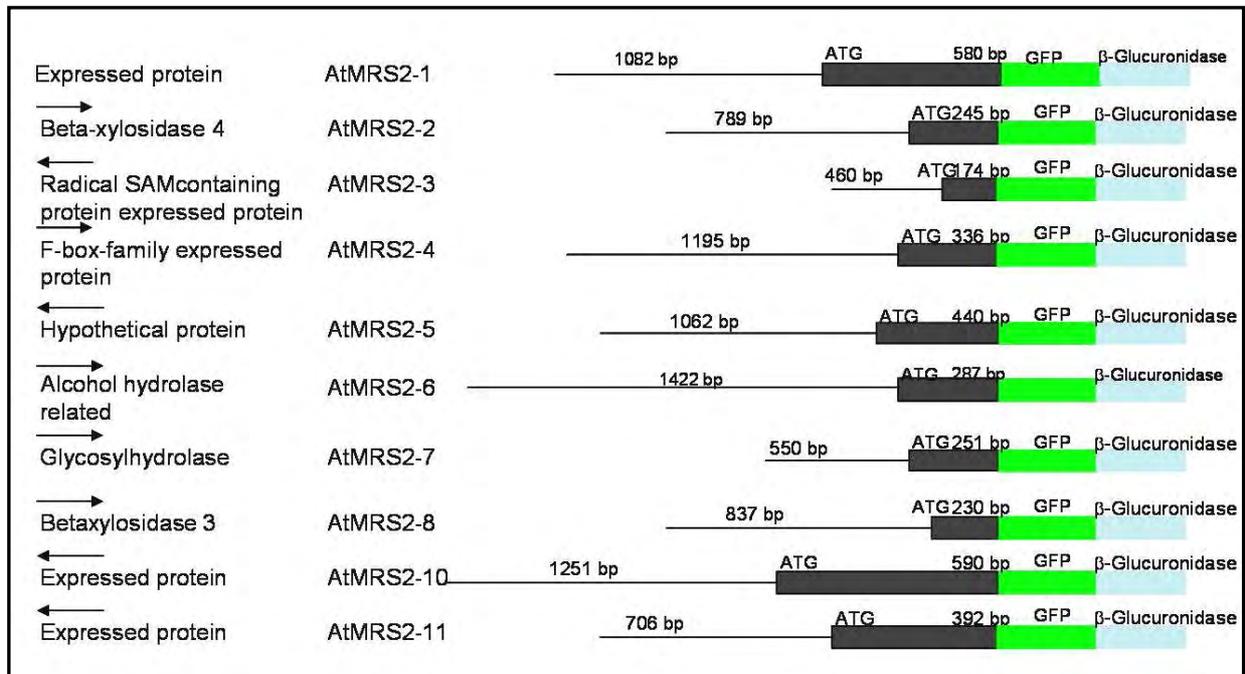


Abbildung 3.0 1: graphische Darstellung der Größenverhältnisse von Promotor und erstem Exon in den Promotor:GUS-Fusionen mit den in 5' angrenzenden Genen

Die Promotorsequenz ist als schwarze Linie dargestellt. Das erste Exon ist als schwarzer Kasten, das GFP als grüner Kasten und die Sequenz für das *uid* Gen (für das Enzym β -Glucuronidase) als blauer Kasten dargestellt. Zusätzlich sind die stromaufwärts gelegenen, an den Promotor grenzenden Gene eingezeichnet.

Die Konstrukte wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Nach der Transformation wurden die Samen geerntet und auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert. Aus Blattmaterial wurde DNA isoliert und mittels PCR mit gen- und vektorspezifischen Primern die Identität der transgenen Pflanzen verifiziert. Pro Transporter wurden mindestens zehn Linien untersucht, um Artefakte, die durch Positionseffekte entstehen können, auszuschließen. Betrachtet wurden auskeimende ein Tage (d) alte Samen, drei, sieben und vierzehn Tage alte Keimlinge, sowie vegetative und reproduktive Pflanzenteile älterer Pflanzen. Dokumentiert wurde die GUS-Färbung, da diese bessere Ergebnisse lieferte als die nur sehr schwache GFP-Fluoreszenz, die zum Teil nicht eindeutig zu erkennen war.

3.1.1 Analyse der GUS-Färbung unter Standardbedingungen

Im auskeimenden Samen traten bei *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5*Promotor:GUS-Samen eine Blaufärbung im gesamten sichtbaren Bereich der Keimlingswurzel auf (Abbildung 3.0 2 A bzw. B). Für *AtMRS2-10* wurde im Vergleich zur ubiquitären Expression von *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* eine spezifische Wurzelexpression in den Wurzelhaaren, der Rhizodermis und im Zentralzylinder aber nicht in der Wurzelspitze und der meristematischen Zone beobachtet (Abbildung 3.0 2 C, 3.03 H, I). Im bereits sichtbaren Teil des Hypocotyls wurde für *AtMRS2-10* keine Promotoraktivität detektiert (Abbildung 3.0 2 C).

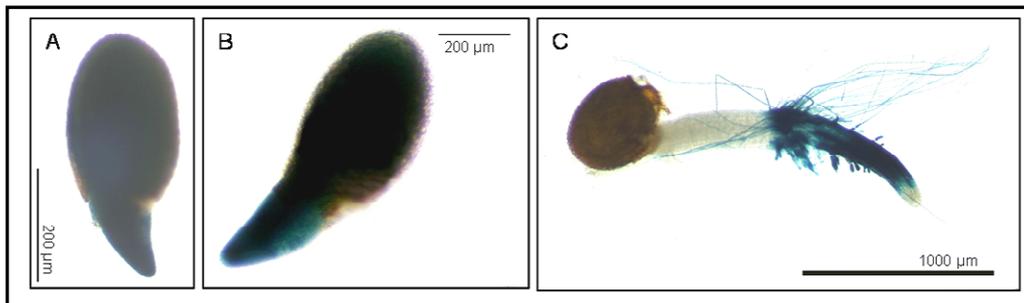


Abbildung 3.0 2: Expressionsmuster von *AtMRS2-1*, 2-5 und 2-10 im ein bzw. zwei Tage alten auskeimenden Samen

Dokumentiert wurde die Promotoraktivität im ein bzw. zwei Tage alten auskeimenden Samen. Das Auskeimen der Samen erfolgte auf mit Standardmedium beschichteten Objektträgern in Petrischalen. Die Petrischalen wurden mit destilliertem Wasser gegen Austrocknung gefüllt, und unter Standardbedingungen für zwölf Stunden inkubiert. Die Objektträger wurden mit X-GlcA-Substratlösung bedeckt und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die GUS-Färbereaktion wurde durch Austausch der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt und die Promotoraktivität dokumentiert.

A und B zeigen die Promotoraktivität von *AtMRS2-1* (A) und *AtMRS2-5* (B) in ein Tage alten, auskeimenden Samen. Beide Transporter zeigen eine GUS-Färbung in der Keimlingswurzel (Größenstandard 200 µm).

C) Dokumentiert wird die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* im zwei Tage alten Promotor:GUS-Keimling. Für *AtMRS2-10* wurde eine Promotoraktivität in den Wurzelhaaren und in der Keimlingswurzel detektiert, aber nicht in der Wurzelspitze (Größenstandard 1000 µm).

In drei, sieben und vierzehn Tage alten Keimlingen, wurde eine Promotoraktivität in der Wurzel bei insgesamt drei weiteren Mitgliedern detektiert. Die GUS-Färbung trat zum Teil sehr spezifisch bei *AtMRS2-3* in der meristematischen Zone, wahrscheinlich den Cortex/Endodermis-Initialzellen (Taiz und Zeiger 2002) und im Zentralzylinder auf (Abbildung 3.0 3 D, Pfeil). Im Zentralzylinder wurde auch eine Promotoraktivität von *AtMRS2-2* festgestellt (Abbildung 3.0 3 C). *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* wiesen eine Färbung in der gesamten Wurzel, mit etwas stärkerer Intensität der Färbung im Zentralzylinder auf (Abbildung 3.0 3 A bzw. E). Durch einen Wurzelquerschnitt einer sieben Tage alten Wurzel konnte das gefärbte Gewebe für *AtMRS2-1* dem Zentralzylinder zugeordnet werden (Abbildung 3.0 3 B, Pfeil). Für *AtMRS2-7* (Abbildung 3.0 3 F, G) und *AtMRS2-10*

3 Ergebnisse

(Abbildung 3.0 3 H, I) wurde eine Expression in den Wurzelhaaren und der Rhizodermis beobachtet. *AtMRS2-7* zeigte eine GUS-Färbung in der meristematischen Zone, mit stärkerer Intensität im ruhenden Zentrum (Abbildung 3.0 3 F, Pfeil). Im Längsschnitt zeigte sich die GUS-Färbung in der Rhizodermis, im Bereich der meristematischen Zone (Abbildung 3.0 3 G Pfeil). Im Gegensatz dazu wurde *AtMRS2-10* nicht in der meristematischen Zone exprimiert, hier konnte eine GUS-Färbung in der Elongationszone beobachtet werden (Abbildung 3.0 3 H, I).

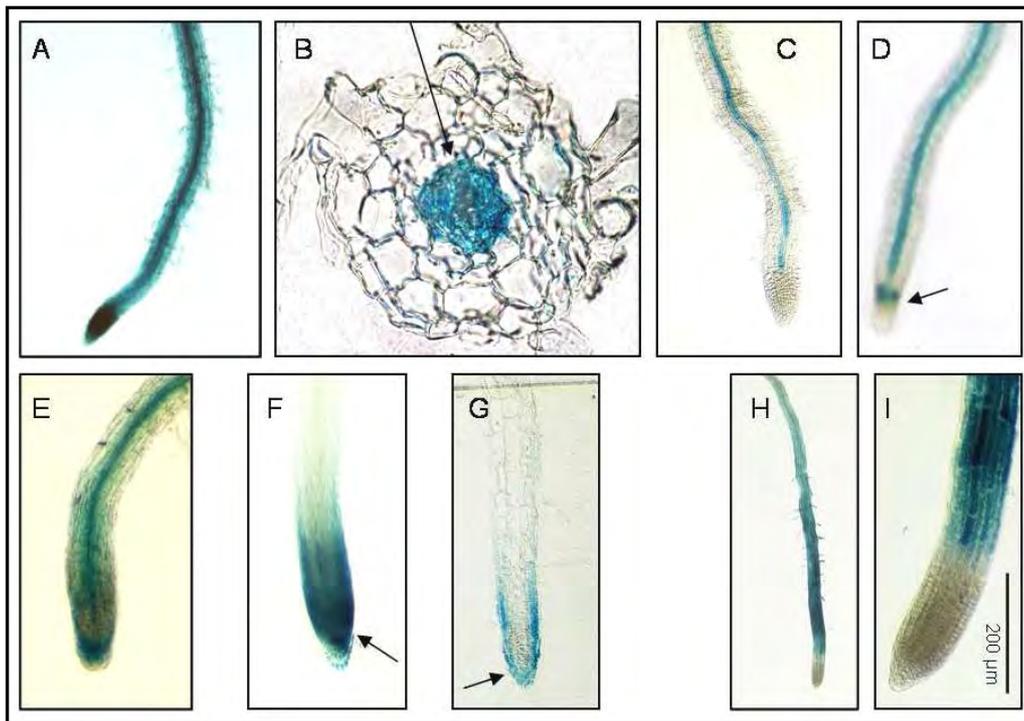


Abbildung 3.0 3: Wurzelexpression sieben Tage alter Promotor:GUS-Keimlinge

Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Standardbedingungen auf MS-Medium angezogen und die Promotoraktivität nach sieben Tagen durch Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase analysiert. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für alle Keimlinge für 18 Stunden. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt

A) *AtMRS2-1* zeigt eine Promotoraktivität in der gesamten Wurzel eines sieben Tage alten Keimlings

B) Kryo-Dünnschnitt, Querschnitt von A) mit einer Schnittdicke von 30 μm . Die GUS-Färbung tritt im Bereich des Zentralzylinders auf.

C) zeigt die Wurzelexpression eines sieben Tage alten *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimlings. Eine *AtMRS2-2* Promotoraktivität wird im Zentralzylinder der Wurzel nachgewiesen.

D) *AtMRS2-3* zeigt eine Promotoraktivität in der meristematischen Zone und im Zentralzylinder der Wurzel im sieben Tage alten Keimling.

E) In der Wurzel eines sieben Tage alten *AtMRS2-5*Promotor:GUS-Keimlings kann eine Promotoraktivität im Zentralzylinder und in der Wurzelspitze nachgewiesen werden.

F) *AtMRS2-7*, sieben Tage alter Promotor:GUS-Keimling: Eine GUS-Färbung tritt für *AtMRS2-7* im Bereich der meristematischen Zone und der Wurzelspitze auf.

G) Im Semi-Dünnschnitt mit einer Schnittdicke von 4 μm von F) kann man die GUS-Aktivität in der Rhizodermis und Kalyptra (Pfeil) beobachten.

H) Im sieben Tage alten *AtMRS2-10*Promotor:GUS-Keimling tritt die Promotoraktivität in der Reifungs- und Streckungszone auf.

I) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der meristematischen Zone und der Wurzelspitze von H), in E) ist keine GUS-Färbung in der meristematischen Zone und der Wurzelspitze zu beobachten (Größenstandard 200 μm)

3 Ergebnisse

Im Gegensatz zum Expressionsmuster im Keimling von *AtMRS2-1*, *2-2*, *2-3*, *2-5* und *2-10*, zeigten *AtMRS2-4* (Abbildung 3.0 4 A) und *AtMRS2-11* (Abbildung 3.0 4 C) keine Expression in der Wurzel. Für beide wurde eine auf die Kotyledonen begrenzte Promotoraktivität nachgewiesen (Abbildung 3.0 4 A, B, *AtMRS2-4*; C, D, *AtMRS2-11*). Für *AtMRS2-11* wurde außerdem eine Expression in den Stomata beobachtet (Abbildung 3.0 4, D Hypocotyl, Abbildung 3.0 7 K Detailaufnahme Stomata der Epidermis).

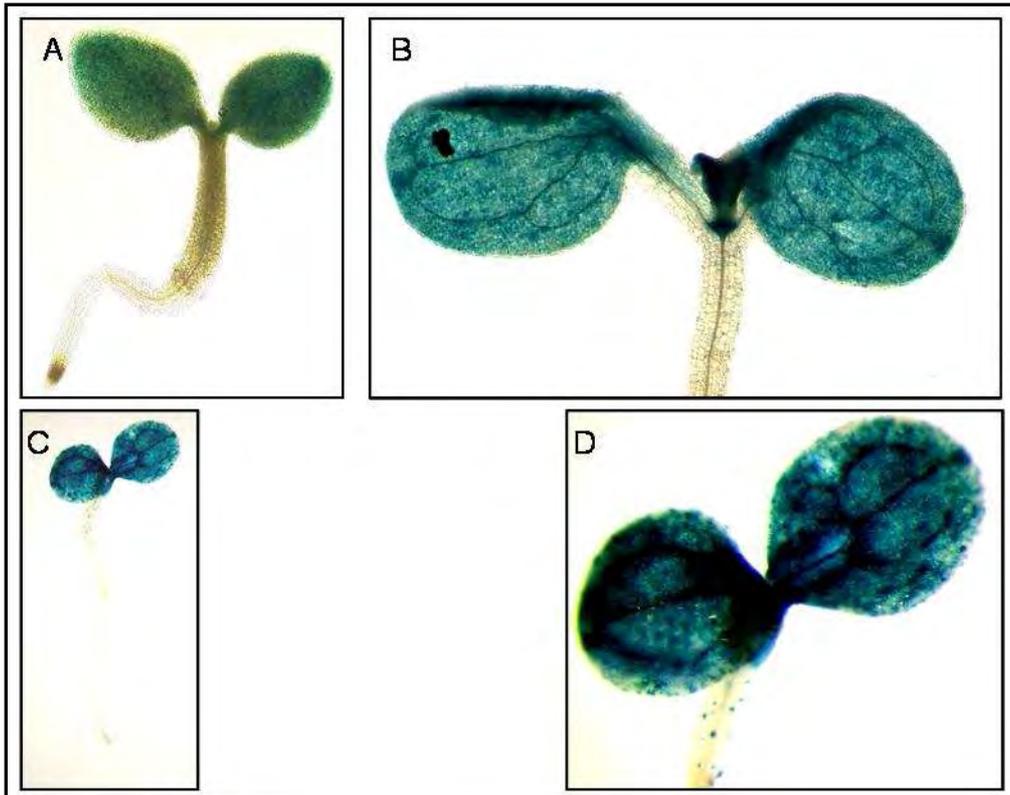


Abbildung 3.0 4: Keimlingsexpressionsmuster von *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* Promotor:GUS-Keimlingen

Dargestellt ist das Expressionsmuster drei bzw. sieben Tage alter Promotor:GUS-Keimlinge für die Magnesiumtransporter *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen für drei bzw. sieben Tage. Der Nachweis des *uid*-Reportergens erfolgte nach Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung für 18 Stunden. Die GUS-Färbereaktion wurde durch einen Austausch der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt und die Promotoraktivität über den Nachweis des Reaktionsprodukts dokumentiert.

A und B: *AtMRS2-4* A) zeigt einen drei Tage alten Keimling mit einer Promotoraktivität für *AtMRS2-4* in den Kotyledonen. B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Kotyledonen eines zehn Tage alten Keimlings. *AtMRS2-4* zeigt eine Promotoraktivität in den Kotyledonen.

C und D: *AtMRS2-11* C) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* im sieben Tage alten Keimling in den Kotyledonen. D) vergrößerte Aufnahme der Kotyledonen von C) zeigt eine GUS-Färbung in den Kotyledonen und in den Stomata des Hypocotyls.

Abbildung 3.0 5 zeigt Keimblätter und im Ausschnitt eine vergrößerte Aufnahme des Epicotyls sieben Tage alter Keimlinge. In Keimblättern trat bei *AtMRS2-1* und für *AtMRS2-5*-Promotor:GUS-Pflanzen eine GUS-Färbung in der gesamten Blattfläche, mit stärkster Intensität in den Blattadern auf (Abbildung 3.0 5 A, *AtMRS2-1* und D, *AtMRS2-5*). Im

3 Ergebnisse

Längsschnitt zeigte sich für *AtMRS2-1* eine Färbung im ersten Folgeblattpaar im Palisadenparenchym (Abbildung 3.0 5 C, Längsschnitt). Untersuchungen zur Expression in den Keimblättern bei *AtMRS2-10* erbrachten hier eine spezifische Färbung in den Hydathoden (Abbildung 3.0 5 G). *AtMRS2-5* und *AtMRS2-10* zeigten eine Färbung im Epicotyl, im apikalen Sprossmeristem (Abbildung 3.0 5 E, *AtMRS2-5*; H, *AtMRS2-10*). Bei *AtMRS2-5* und *AtMRS2-10* trat außerdem auch eine Färbung im Trichom auf (Abbildung 3.0 5 F, *AtMRS2-5*; I, *AtMRS2-10*).

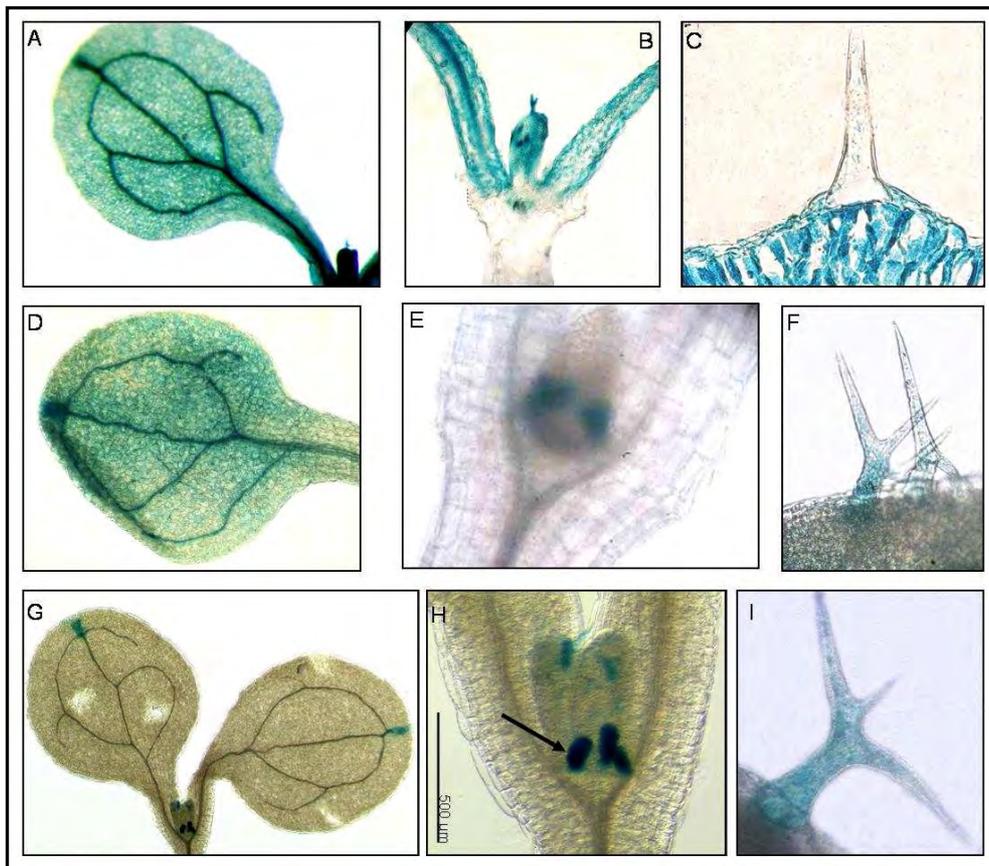


Abbildung 3.0 5: Promotoraktivität in den Kotyledonen sieben Tage alter Promotor:GUS-Keimlinge

Dokumentiert wird die Aktivität des Promotors von *AtMRS2-1*, *2-5* und *2-10* in sieben Tage alten Keimlingen unter Standardbedingungen nach 18 stündiger Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung. Die Färbereaktion wurde durch Austausch der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A-C sieben Tage alter *AtMRS2-1*Promotor:GUS-Keimling: A) zeigt im Ausschnitt ein Keimblatt mit dokumentierter GUS-Färbung in der Blattfläche und stärkster Intensität in den Blattadern B) zeigt eine Promotoraktivität von *AtMRS2-1* im Palisadenparenchym, im Längsschnitt. Die Schnittdicke beträgt 30 µm, C) Querschnitt von A), zeigt ein Keimblatt mit Trichom im Längsschnitt (Schnittdicke 30 µm). Dokumentiert wird eine Promotoraktivität im Palisadenparenchym;

D-F zeigen einen sieben Tage alten Keimling (*AtMRS2-5*): D) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Keimblatts mit nachgewiesener Promotoraktivität in der Blattfläche und den Blattadern. E) zeigt im Ausschnitt das Epicotyl mit einer Promotoraktivität von *AtMRS2-5* im Apikalmeristem, F) zeigt die vergrößerte Aufnahme eines gefärbten Trichoms.

G - I sieben Tage alter *AtMRS2-10*Promotor:GUS-Keimling: G) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in den Hydathoden. H) zeigt eine vergrößerte Aufnahme des Epicotyls von G). Im Epicotyl tritt eine Promotoraktivität von *AtMRS2-10* im apikalen Sprossmeristem (Pfeil) auf (Größenstandard 500 µm). I) Promotoraktivität von *AtMRS2-10* im Trichom.

3 Ergebnisse

Untersuchungen zur Expression im Keimlingsstadium, zeigten eine Färbung im vaskulären Gewebe des Hypocotyls für *AtMRS2-2* und *AtMRS2-3* (Abbildung 3.0 6 A bzw. B). Die spezifische Färbung in der Stele und im Leitgewebe des Hypocotyls von *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Pflanzen trat auch in den Adern der Kotyledonen auf (Abbildung 3.0 6 A, B). In der adulten Pflanze setzte sich die Expression im vaskulären Gewebe fort (Abbildung 3.0 6 E, F Spross, Abbildung 3.0 7 A, B Blüte bzw. Schote). Hierzu wurden Spross-Querschnitte durchgeführt um das Gewebe genauer zu identifizieren. Die Spross-Querschnitte wurden mit Safranin-Lösung gefärbt und mit Ethanol entfärbt. Da Safranin spezifisch verholzte Zellwände wie das Xylem färbt, wurde so eine Differenzierung zur genauen Bestimmung des blaugefärbten Gewebes erreicht. Querschnitte der Sprossachse zeigten eine auf das Phloem begrenzte Färbung im Leitgewebe für *AtMRS2-2* (Abbildung 3.0 6 E, F) und auch für *AtMRS2-4* (Abbildung 3.0 6 G). Im Gegensatz dazu trat eine Färbung im Xylem bei *AtMRS2-5* auf (Abbildung 3.0 6 H).

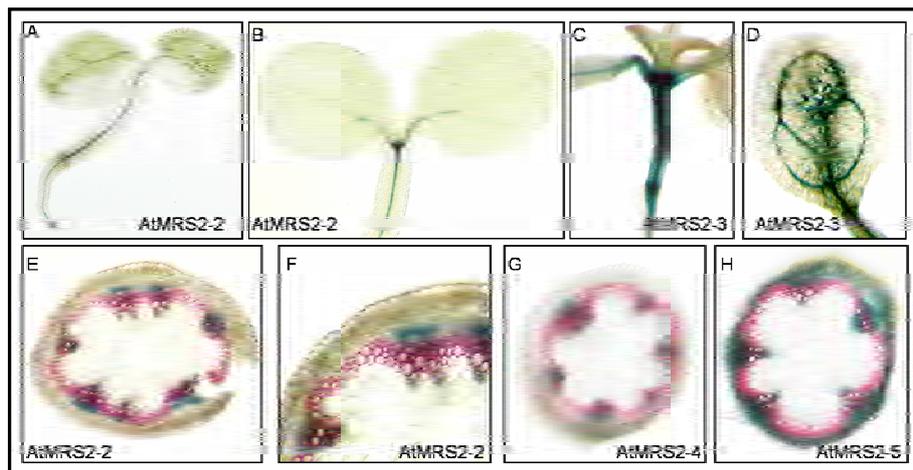


Abbildung 3.0 6: Promotoraktivität im Leitgewebe von *AtMRS2-2*, 2-3, 2-4 und 2-5

Dokumentiert wurde die GUS-Färbung in sieben Tage alten *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimlingen und vierzehn Tage alten *AtMRS2-3* Promotor:GUS-Keimlingen, sowie die Expression im Spross durch Sprossquerschnitte 21 Tage alter *AtMRS2-2*, 2-4 und 2-5Promotor:GUS-Pflanzen. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen. Bei den Keimlingen wurde die Promotoraktivität nach 18 stündiger Inkubation in X-GlcA-Substratlösung dokumentiert. Die Sprossquerschnitte wurden für 18 Stunden in X-GlcA-Substratlösung und für fünf Minuten in Safranin-Lösung inkubiert. Überschüssige Safraninlösung wurde durch Waschen mit absolutem Ethanol entfernt und die Promotoraktivität durch die blaue GUS-Färbung und die Gegenfärbung des Xylems (rot) dokumentiert. A, B) drei Tage alter *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimling: A) zeigt eine Promotoraktivität von *AtMRS2-2* im Leitgewebe von Wurzel, Hypocotyl und Kotyledonen. B) vergrößerte Aufnahme von A) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-2* in den Adern der Kotyledonen.

C und D zeigen die Promotoraktivität von *AtMRS2-3* im vierzehn Tage alten *AtMRS2-3*Promotor:GUS-Keimling im Hypocotyl (C) und in den Blattadern (D).

E - H: Sprossquerschnitte, Handschnitte von 21 Tage alten *AtMRS2-2* (E,F), 2-4 (G) und 2-5Promotor:GUS-Pflanzen (H). Das Xylem wird durch Safraninlösung rot angefärbt, die Promotoraktivität wird durch die blaue GUS-Färbung angezeigt, überlappende Bereiche zeigen eine violette Färbung.

E, F) zeigen eine Promotoraktivität von *AtMRS2-2* im Phloem, das Xylem ist rot gefärbt.

G) dokumentiert die Aktivität des *AtMRS2-4*Promotors im Phloem durch Blaufärbung. Das Xylem ist rot gefärbt. In H) wird eine *AtMRS2-5*Promotoraktivität im Phloem und im Xylem (rot) gezeigt. Überlappende Bereiche sind violett gefärbt.

3 Ergebnisse

Fasst man die Expression im Keimlingsstadium zusammen, so zeigten *AtMRS2-1*, 2-2, 2-3, 2-5, 2-7 und 2-10 eine zum Teil sehr spezifische Promotoraktivität in der Wurzel. *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* zeigten eine ubiquitäre Wurzelexpression, *AtMRS2-7* und *AtMRS2-10* in den Wurzelhaaren und der Rhizodermis. Die detektierte Promotoraktivität von *AtMRS2-3* trat in der meristematischen Zone auf. *AtMRS2-7* zeigte ebenfalls eine Promotoraktivität in der meristematischen Zone. *AtMRS2-2* und *AtMRS2-3* zeigte eine auf den Zentralzylinder begrenzte Promotoraktivität. *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* zeigten keine Promotoraktivität in der Wurzel. Für *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* wurde eine Promotoraktivität in den Kotyledonen beobachtet. Fasst man die Expression in den Kotyledonen sieben bis vierzehn Tage alter Keimlinge zusammen, so wurde eine Promotoraktivität in den Keimblättern außer für *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* auch für *AtMRS2-1*, 2-2, 2-3, 2-5 und 2-10 (Abb. 3.03, 3.04, 3.05) nachgewiesen. Auch im photosynthetisch-aktiven Gewebe zeigten *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* eine ubiquitäre Expression (Abbildung 3.0 4 A, *AtMRS2-1*; D, *AtMRS2-5*): Bei *AtMRS2-2* und *AtMRS2-3* war die Expression auf das vaskuläre Gewebe der Kotyledonen beschränkt (Abbildung 3.0 6 B bzw. D). Für *AtMRS2-7* wurde keine Expression in den Kotyledonen beobachtet. Sprossquerschnitte junger Pflanzen zeigten eine GUS-Färbung für *AtMRS2-2* und *AtMRS2-4* im Phloem, für *AtMRS2-5* im Xylem.

Weitere Untersuchungen in der adulten Pflanze erbrachten eine Färbung in den Rosetten- und Stängelblättern für die Mitglieder *AtMRS2-1*, 2-2-, 2-3, 2-4, 2-5, 2-7, 2-10 und 2-11. Auch hier zeigten *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* wie schon im Keimlingsstadium eine ubiquitäre Expression in der gesamten Blattfläche mit stärkster Intensität in den Blattadern (Abbildung 3.0 7 C bzw. D). Im Gegensatz dazu trat eine auf die Leitbahnen begrenzte Färbung bei *AtMRS2-2* und *AtMRS2-10* auf (Abbildung 3.0 7 B bzw. E). Eine Färbung in der gesamten Blattfläche mit stärkerer Intensität in den Blattadern wurde auch für *AtMRS2-4* in den Rosettenblättern und *AtMRS2-11* in den Stängelblättern beobachtet (Abbildung 3.0 7 F bzw. I, J). Im Querschnitt eines Rosettenblattes wurde für *AtMRS2-4* eine Promotoraktivität in den Chloroplasten und um die Leitbündel (Abbildung 3.0 7 G) detektiert. In Protoplasten von Rosettenblättern von *AtMRS2-4*Promotor:GUS exprimierenden Pflanzen, bzw. Stängelblättern bei *AtMRS2-11*, wurde eine Färbung in den Chloroplasten beobachtet (Abbildung 3.0 7 H bzw. L). Bei *AtMRS2-11* trat außerdem eine spezifische Färbung in den Stomata auf (Abbildung 3.0 7 K), die man auch schon im Hypocotyl von Keimlingen beobachten konnte (Abbildung 3.0 5 D). Wie auch schon im Keimlingsstadium (Abbildung 3.0 4 I) zeigte sich

3 Ergebnisse

auch auf den Folgeblättern für *AtMRS2-10* eine Färbung in den Trichomen (Abbildung 3.0 7 E).

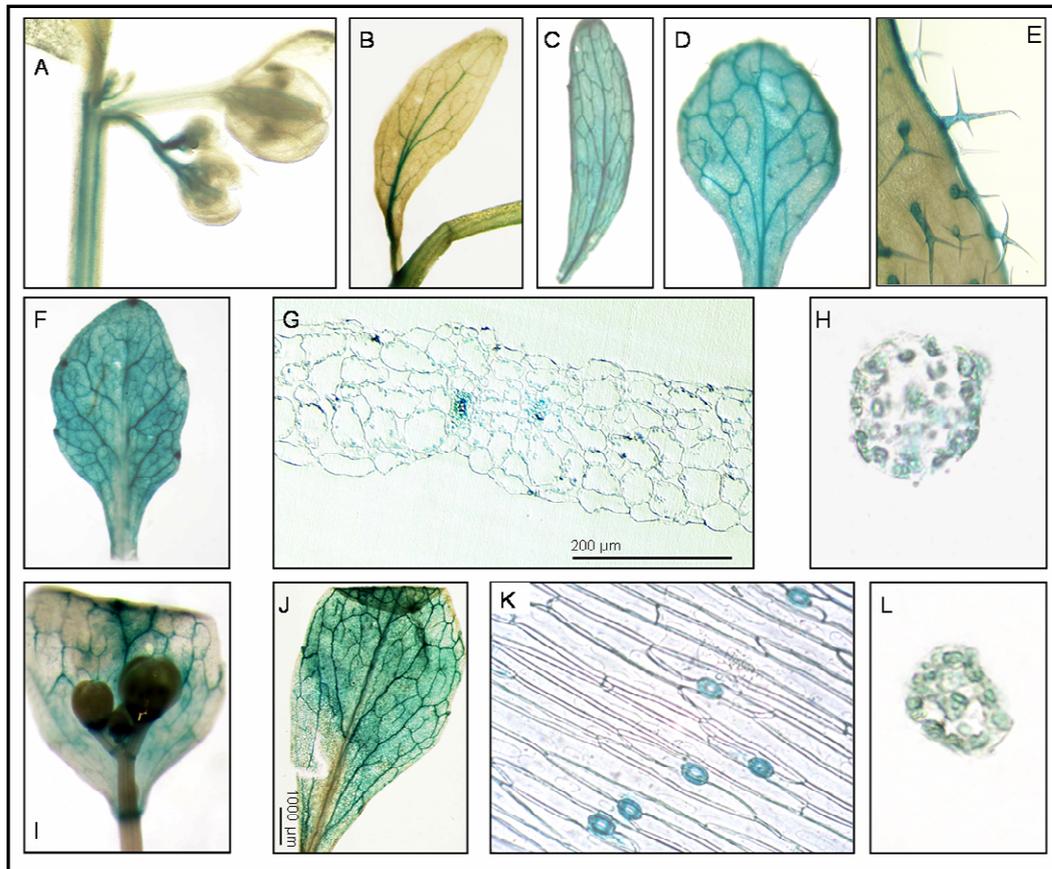


Abbildung 3.0 7: Promotoraktivität in Folgeblättern adulter Pflanzen von *AtMRS2-1*, *2-2*, *2-4*, *2-10* und *2-11*

30 Tage alte Promotor:GUS-Pflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Expression in vegetativen Pflanzenteilen, Rosetten- und Stängelblättern durch den Nachweis der Promotoraktivität über die GUS-Färbung dokumentiert. Zur Analyse der Expression in den Stomata (K) wurden Epidermisstreifen von Sprossstücken abgezogen. Die Inkubation der vegetativen Pflanzenstücke und der Epidermisstreifen in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A,B) dokumentiert die *AtMRS2-2*Promotoraktivität im vaskulären Gewebe von Spross, Knospen und Stängelblatt.

C) zeigt die Aufnahme eines Stängelblatts einer *AtMRS2-1*Promotor:GUS-Pflanze. Die Promotoraktivität kann in der Blattfläche des Stängelblatts mit stärkster Intensität der Färbung in den Blattadern nachgewiesen werden. D) zeigt die Promotoraktivität von *AtMRS2-5* in der Blattfläche mit stärkster Intensität der Blaufärbung im vaskulären Gewebe eines Rosettenblatts.

E) dokumentiert die *AtMRS2-10*Promotoraktivität in den Trichomen, gezeigt an einer vergrößerten Aufnahme eines Rosettenblatts, einer 21 Tage alten *AtMRS2-10*Promotor:GUS-Pflanze.

F - H) zeigt die Promotoraktivität von *AtMRS2-4* im Rosettenblatt (F) einer *AtMRS2-4*Promotor:GUS-Pflanze in der Blattfläche und mit stärkster Intensität in den Blattadern. Im Querschnitt (G) mit einer Schnittdicke von 2 µm zeigt sich die Promotoraktivität von *AtMRS2-4* in den Chloroplasten und in den Leitbündeln (Größenstandard 200 µm). Durch Protoplastieren eines Rosettenblatts (H) kann eine Promotoraktivität von *AtMRS2-4* in den Chloroplasten nachgewiesen werden.

I - L) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* in den Blattadern und im Bereich der Abszissionszone von Stängelblättern und Knospensansätzen. In J) wird in einer vergrößerten Aufnahme eines Stängelblatts von I) die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* in den Blattadern dokumentiert (Größenstandard 1000 µm). K) zeigt einen Epidermisstreifen einer *AtMRS2-11*Promotor:GUS-Pflanze mit detektierter Promotoraktivität in den Schließzellen der Stomata. Durch Protoplastieren des Stängelblatts einer *AtMRS2-11*Promotor:GUS-Pflanze (L) kann die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* in den Chloroplasten dokumentiert werden.

3 Ergebnisse

Im Blütenstadium setzte sich die bereits in den Keimlingen für *AtMRS2-4* beobachtete Expression im photosynthetisch aktiven Gewebe fort. *AtMRS2-4* zeigte eine Färbung in den Sepalen und im Griffel (Abbildung 3.0 8 H). Im Gegensatz dazu konnte für *AtMRS2-1* eine Färbung in den Sepalen, im Leitgewebe der Petalen und in den Antherenfilamenten, sowie im Stigma beobachtet werden (Abbildung 3.0 8 A).

AtMRS2-3 und *AtMRS2-10* zeigten im Blütenstadium ein eher spezifisches Expressionsmuster. In der Blüte trat bei *AtMRS2-3* und bei *AtMRS2-10* eine auf die Antherenfilamente begrenzte Expression auf (Abbildung 3.0 8 F bzw. O). *AtMRS2-2* zeigte eine blaue Färbung in den Antherenfilamenten, in den Samenanlagen und in der Narbe (Abbildung 3.0 8 C, E). Für *AtMRS2-7* konnte eine Färbung im Blütenboden, der Samenanlage und in den Antheren beobachtet werden (Abbildung 3.0 8 K). *AtMRS2-5* zeigte eine auf die Antheren begrenzte Expression (Abbildung 3.0 8 J). Für *AtMRS2-6* trat eine spezifische Färbung ausschließlich in den Antheren auf (Abbildung 3.0 8 L, M durch ein „A“ gekennzeichnet). Der in den Abbildung 3.0 8 M und N gezeigte Blütenquerschnitt grenzt die für *AtMRS2-6* beobachtete Färbung auf die Pollenkörner in den Antheren ein („A“ und Pfeil in Abbildung 3.0 8 M, N). Das noch schwach erkennbare Kelchblatt mit „S“ in Abbildung 3.0 8 M gekennzeichnet und das Gynoceum („G“ in Abbildung 3.0 8 M, N) bleiben ungefärbt.

Untersuchungen zur Schotenexpression zeigten eine Färbung für *AtMRS2-11* (Abbildung 3.0 8 P, Pfeil) und *AtMRS2-3* (Abbildung 3.0 8 G) im Bereich der Schotenbasis. Für *AtMRS2-1* wurde eine auf die Leitbahnen der Schotenhülle begrenzte Expression der β -Glucuronidase beobachtet (Abbildung 3.0 8 B). *AtMRS2-4* zeigte eine ubiquitäre Expression in der Schote und im Schotenstängel (Abbildung 3.0 8 I). *AtMRS2-2* zeigte auch hier, wie schon in den Samenanlagen in der Blüte angedeutet, eine lokal auf die Samen begrenzte blaue Färbung (Abbildung 3.0 8 D, E Pfeil).

3 Ergebnisse

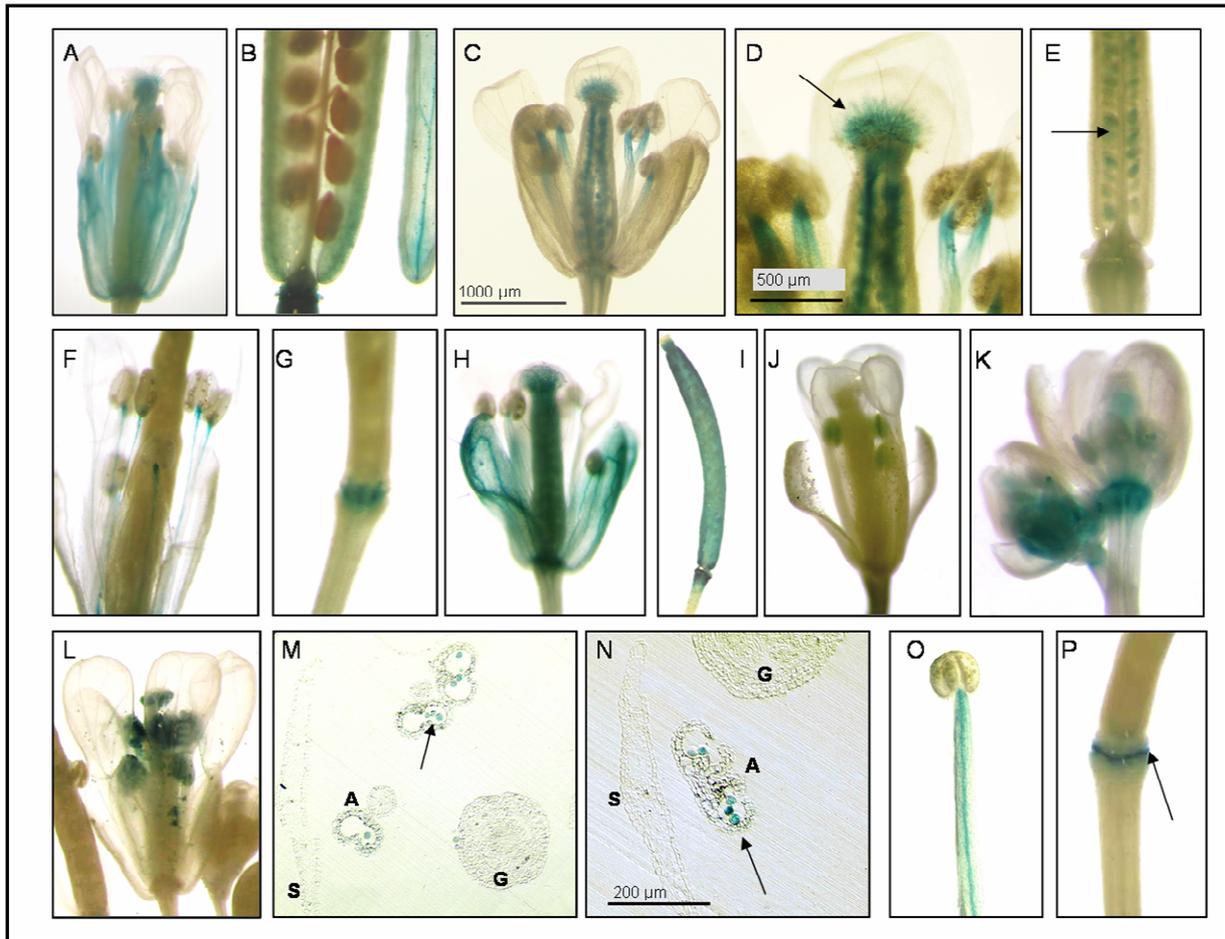


Abbildung 3.0 8: Expression im reproduktiven Gewebe und in den Schoten adulter *AtMRS2*Promotor:GUS-Pflanzen

Adulte *Arabidopsis thaliana* Promotor:GUS-Pflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Promotoraktivität für die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie im reproduktiven Gewebe und in den Schoten dokumentiert. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Die Färbereaktion wurde durch einen Austausch der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A, B) *AtMRS2-1* zeigt eine Promotoraktivität in den Sepalen, den Antherenfilamenten und der Narbe einer befruchteten Blüte. In der Schote (B) kann die Promotoraktivität in den Adern der Schotenhülle nachgewiesen werden.

C - E) Für *AtMRS2-2* wird eine Promotoraktivität in der befruchteten Blüte (C) in den Antherenfilamenten, der Samenanlage und der Narbe (Größenstandard 1000 µm) beobachtet. Eine vergrößerte Aufnahme (D) dokumentiert die Promotoraktivität in der Narbe (Pfeil) und der Samenanlage. In E) wird die Aktivität des *AtMRS2-2*Promotors im Bereich der Samen dokumentiert (Pfeil).

F und G) dokumentieren die *AtMRS2-3* Promotoraktivität in den Antherenfilamenten (F) einer befruchteten Blüte und in der Abszissionszone der Schotenbasis (G).

H, I) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-4* in den Sepalen und der Narbe der Blüte (H). In der Schote (I) kann eine Promotoraktivität in der gesamten Schote und dem oberen Bereich des Schotenstängels beobachtet werden.

J) dokumentiert die für *AtMRS2-5* detektierte Promotoraktivität in den Antheren.

K) zeigt die Blüte einer *AtMRS2-7*Promotor:GUS-Pflanze mit dokumentierter Promotoraktivität in der Blütenbasis und dem Gynoceum.

L - N) dokumentiert die nachgewiesene Promotoraktivität von *AtMRS2-6* in den Antheren L) der Blüte. Im Querschnitt durch die Blüte einer *AtMRS2-6*Promotor:GUS-Pflanze (M), 2 µm Schnittdicke, kann die Promotoraktivität auf die Pollenkörner in den Theken der Antheren „A“ näher eingegrenzt werden. In den Sepalen „S“ und dem Gynoceum „G“ tritt keine Promotoraktivität von *AtMRS2-6* auf. N) zeigt eine vergrößerte Aufnahme einer Anthere von M). Die GUS-Färbung tritt in den Pollenkörnern aber nicht in Gynoceum und den Sepalen auf:

O) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* im Blütenstadium, im Antherenfilament.

P) dokumentiert die *AtMRS2-11*Promotoraktivität in der Abszissionszone der Schotenbasis.

3.1.2 Einfluss von Licht auf die Expression der chloroplastidär lokalisierten Magnesiumtransporter *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*

Die chloroplastidären Magnesiumtransporter *AtMRS2-4* (Abbildung 3.0 4 A, B) und *AtMRS2-11* zeigten unter Standardbedingungen eine Promotoraktivität in den Keimblättern (Abbildung 3.0 4 C, D) und in den Folgeblättern (Abbildung 3.0 7 G-H bzw. I-L). In einem zweiten Versuchsansatz wurden *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*Promotor:GUS-Pflanzen im Dunkeln angezogen und nach vierzehn Tagen gefärbt. *AtMRS2-4* zeigte, wie unter Standardbedingungen, eine Promotoraktivität in den Kotyledonen des etiolierten Keimlings (Abbildung 3.0 9 A-C). Im Gegensatz dazu trat für *AtMRS2-11* im etiolierten Keimling nur noch eine auf die Stomata begrenzte Promotoraktivität auf. Nach Inkubation des etiolierten Keimlings im Licht für 1,5 h bzw. 3,5 h wurde eine zunehmende GUS-Färbung in den Kotyledonen nachgewiesen (Abbildung 3.0 9 G, 1,5 h und H, 3,5 h).

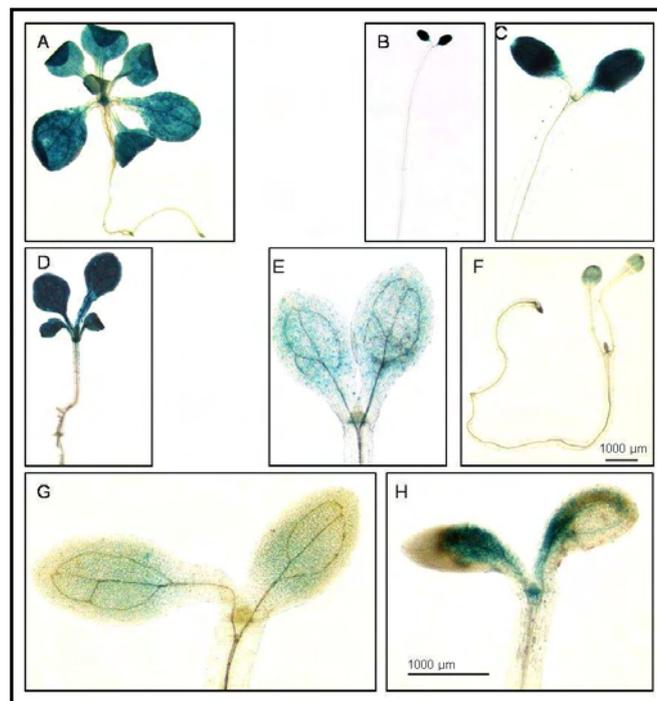


Abbildung 3.0 9: Untersuchungen zum Einfluss von Licht auf die Expression der chloroplastidären Magnesiumtransporter *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*

Parallel wurden Keimlinge im Kontrollansatz unter Standardbedingungen bzw. zur Analyse des Lichteinflusses im Dunkeln für 14 Tage angezogen. Die Inkubation der Keimlinge erfolgte für alle Ansätze für 18 Stunden in der Färbelösung. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A – C) dokumentiert die nachgewiesene Promotoraktivität von *AtMRS2-4* unter Kontrollbedingungen (A) und im etiolierten Keimling (B) in den Kotyledonen. C) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Kotyledonen von (B). D – H) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* unter Standardbedingungen (D) in den Kotyledonen. In E) wird eine vergrößerte Aufnahme der Kotyledonen eines 14 Tage alten Keimlings nach Anzucht im Dunkeln mit Promotoraktivität in den Stomata gezeigt. F) dokumentiert die Promotoraktivität im etiolierten Keimling nach 1,5 h Inkubation im Licht. G) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Keimblätter nach 1,5 h Inkubation im Licht von F). H) zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Keimblätter eines etiolierten Keimlings nach 3,5 h Inkubation im Licht mit nachgewiesener Promotoraktivität in den Kotyledonen.

3.1.3 Expression der *AtMRS2*-Magnesiumtransporter unter Einfluss von Schwermetallen

Da für das bakterielle homologe CorA-Transportsystem außer dem Transport von Magnesium auch ein Transport von anderen divalenten Kationen wie Kobalt, Cadmium und Nickel nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob diese Kationen einen Einfluss auf das Expressionsmuster der Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie haben. Hierzu wurden Keimlinge im hydroponischen System auf Flüssigmedium mit knapp toxischen Konzentrationen von Cadmium, Kobalt, Kupfer oder Nickel angezogen und nach sieben bzw. vierzehn Tagen gefärbt. Diese Experimente wurden auf festem Nährmedium mit gleichen Schwermetall-Konzentrationen wiederholt. Beide unabhängigen Ansätze lieferten das gleiche Ergebnis.

Da die Schwermetallaufnahme über die Wurzel in die Pflanze erfolgt, wurde in diesem Versuchsansatz speziell die Veränderung der GUS-Färbung in der Wurzel untersucht. Bei den beiden chloroplastidär lokalisierten Transportern *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* wurde das vegetative Gewebe untersucht, da ebenfalls bekannt ist, dass Schwermetalle die Photosynthese negativ beeinflussen können (Krupa et al. 1988). *AtMRS2-6* wurde in die Untersuchungen nicht mit einbezogen.

Einige Mitglieder der Genfamilie wie *AtMRS2-2*, *2-4*, *2-7*, *2-10* und *2-11* zeigten eine Sensibilität gegenüber Schwermetallen, während die anderen Mitglieder keine signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster aufwiesen.

AtMRS2-2 zeigte im Keimlingsstadium eine Expression im vaskulären Gewebe von Wurzeln, im Hypocotyl und in den Kotyledonen (Abbildung 3.0 3 C, Abbildung 3.0 6 A und B). Unter Cadmium- und Kupferstress trat eine Reduktion der Färbung im Leitgewebe der Wurzel auf (Abbildung 3.0 10 B bzw. D). Ein vollständiges Verschwinden der blauen Färbung in der Wurzel trat unter Kobalt- und Nickelstress auf (Abbildung 3.0 10 C bzw. E).

3 Ergebnisse

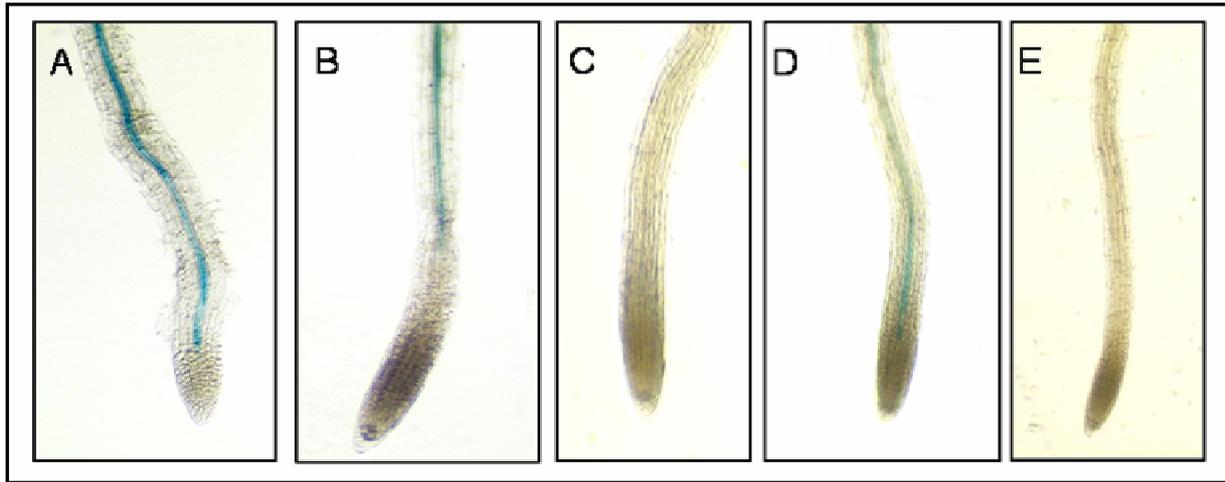


Abbildung 3.0 10: Untersuchungen zum Einfluss von Schwermetallen auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-2*

*AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Schwermetallstress bzw. im Kontrollansatz unter Standardbedingungen angezogen und die Expression nach sieben Tagen untersucht. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung zum Nachweis der Promotoraktivität erfolgte für alle Ansätze für 18 Stunden. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Färbelösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-2* im vaskulären Gewebe der Wurzel ohne zusätzliche Schwermetalle im Medium.

B) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-2* unter Zusatz von 30 µM Cadmiumchlorid im Medium. Es tritt eine reduzierte Promotoraktivität im Zentralzylinder in der meristematischen- und Elongationszone der Wurzel auf.

C) dokumentiert die stark reduzierte *AtMRS2-2*Promotoraktivität mit 50 µM Kobaltnitrat im Medium in der Wurzel.

D) dokumentiert die Promotoraktivität im *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimling mit 25 µM Kupfersulfat im Medium. Es tritt eine reduzierte GUS-Färbung im Zentralzylinder in der Reifungszone der Wurzel auf.

E) dokumentiert die *AtMRS2-2*Promotoraktivität im sieben Tage alten *AtMRS2-2*Promotor:GUS-Keimling unter Zusatz von 40 µM Nickelsulfat im Nährmedium. Es tritt eine reduzierte Promotoraktivität im Zentralzylinder in der gesamten Wurzel auf.

3 Ergebnisse

Der *AtMRS2-4*-Transporter zeigte in der Pflanze eine chloroplastidäre Lokalisation und eine Promotoraktivität im photosynthetisch aktiven Gewebe (Abbildung 3.0 11 A). Unter Kupferstress trat in der Blattfläche eine reduzierte GUS-Färbung auf (Abbildung 3.0 11 B), wohingegen die intensive GUS-Färbung in den Blattadern erhalten blieb (Abbildung 3.0 11 C). Keimlinge, die Nickelstress ausgesetzt wurden, zeigten ebenfalls gegenüber dem Versuchsansatz ohne Schwermetalle eine reduzierte Promotoraktivität (Abbildung 3.0 11 D, E). Im Gegensatz zur reduzierten Promotoraktivität von *AtMRS2-4*, konnte bei *AtMRS2-5* unter Kupfer- und Nickelstress in den Kotyledonen eine stärkere Promotoraktivität beobachtet werden (Abbildung 3.0 11 G, H). Die GUS-Färbung der Wurzel zeigte keine Veränderungen unter Schwermetallstress (Daten nicht gezeigt).

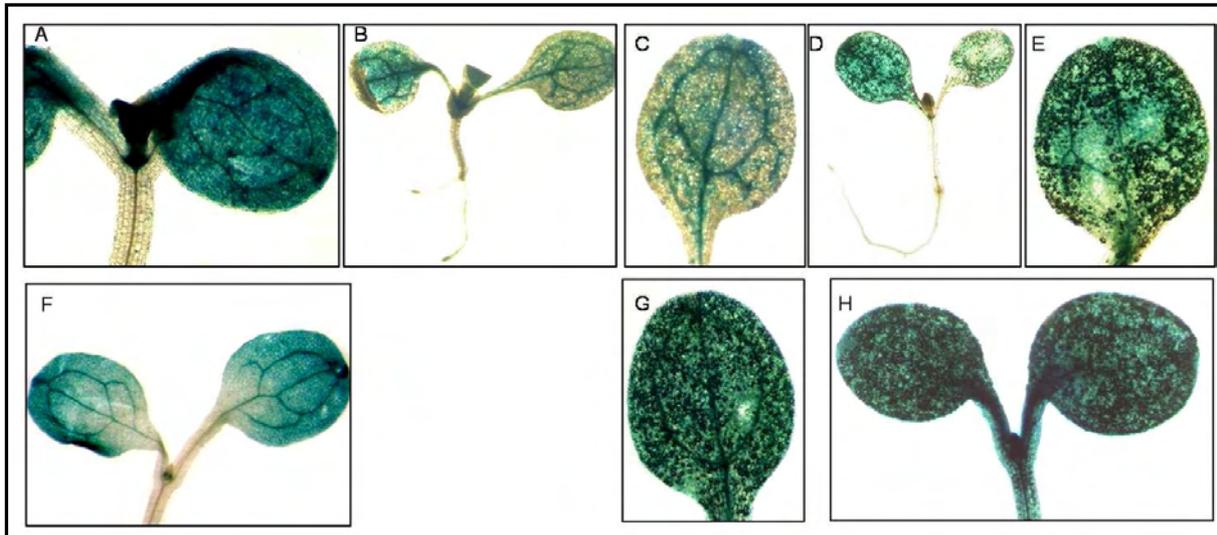


Abbildung 3.0 11: Promotoraktivität von *AtMRS2-4* und *AtMRS2-5* in den Kotyledonen sieben Tage alter Keimlinge unter Schwermetallstress

AtMRS2-4 und *AtMRS2-5*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Kupfer- und Nickelstress angezogen. Nach sieben Tagen wurde die Promotoraktivität durch Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase dokumentiert. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für 18 Stunden für alle Ansätze. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A – E) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-4*. A) unter Standardbedingungen ohne Schwermetallzusatz tritt eine Promotoraktivität in den Kotyledonen und dem ersten Blattpaar auf. Die Promotoraktivität ist bei Zusatz von 25 μ M Kupfersulfat (B) in der Blattfläche der Kotyledonen reduziert. C) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Keimblatts von (B) mit reduzierter Promotoraktivität von *AtMRS2-4* in der Blattfläche unter Kupferstress. In D) wird die Promotoraktivität von *AtMRS2-4* mit zusätzlich 40 μ M Nickelsulfat im Medium dokumentiert. Es tritt eine leicht reduzierte Promotoraktivität in der Blattfläche auf. E) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Keimblatts von (D) mit reduzierter Promotoraktivität in der Blattfläche. F – H) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-5*. Im Kontrollansatz (F) tritt eine Promotoraktivität in der Blattfläche, den Blattadern der Kotyledonen und dem apikalen Sprossmeristem ohne Schwermetallzusatz im Medium auf. G) dokumentiert die Promotoraktivität im Keimblatt eines sieben Tage alten *AtMRS2-5*Promotor:GUS-Keimlings mit 25 μ M Kupfersulfat. Es tritt eine stärkere Promotoraktivität als im Kontrollansatz in der Blattfläche und den Blattadern auf. H) dokumentiert die stärkere Promotoraktivität von *AtMRS2-5* in den Kotyledonen, dem apikalen Sprossmeristem und dem Hypocotyl unter Zusatz von 40 μ M Nickelsulfat im Nährmedium.

3 Ergebnisse

AtMRS2-7 zeigte im Keimlingsstadium eine wurzelspezifische Expression im Bereich der meristematischen Zone mit stärkster Intensität im ruhenden Zentrum (Abbildung 3.0 3 F, G; Abbildung 3.0 12 A). Unter Cadmiumstress verstärkte sich die Intensität der Färbung und wurde unspezifischer im Bereich der Wurzel (Abbildung 3.0 12 B). Diese stärkere Färbung trat auch unter Kobaltstress auf (Abbildung 3.0 12 C). Unter Einfluss von Kupfer zeigte sich eine Reduktion der Färbung in der Wurzel (Abbildung 3.0 12 D). Auch unter Nickelstress trat eine unspezifischere Färbung im Vergleich zum Kontrollansatz auf (Abbildung 3.0 12 E).

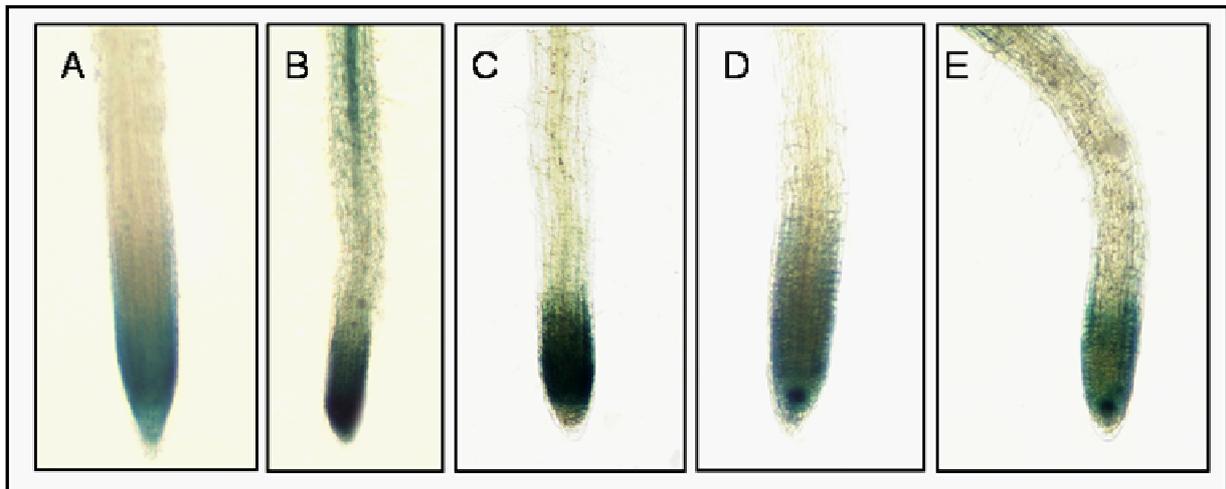


Abbildung 3.0 12: Wurzelexpression von *AtMRS2-7* unter Schwermetallstress

*AtMRS2-7*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Zusatz von Cadmiumchlorid, Kobaltnitrat, Kupfersulfat bzw. Nickelsulfat angezogen und nach sieben Tagen die Promotoraktivität in der Wurzel untersucht. Die Inkubation zum Nachweis der Promotoraktivität erfolgte in allen Ansätzen für 18 Stunden in der X-GlcA-Substratlösung. Die Färbereaktion wurde durch einen Austausch der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A) dokumentiert die Expression von *AtMRS2-7* im sieben Tage alten *AtMRS2-7*Promotor:GUS-Keimling in der meristematischen Zone und Wurzelspitze in der Wurzel unter Kontrollbedingungen ohne Schwermetallzusatz im Medium.

B) zeigt eine verstärkte Promotoraktivität von *AtMRS2-7* unter Zusatz von 30 µM Cadmiumchlorid im Nährmedium im Zentralzylinder.

C) dokumentiert die Promotoraktivität unter Zusatz von 50 µM Kobaltnitrat im Nährmedium. Es wird eine stärkere Promotoraktivität von *AtMRS2-7* in der meristematischen Zone beobachtet.

D) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-7* bei Zusatz von 25 µM Kupfersulfat im Nährmedium. Es tritt eine stark reduzierte Promotoraktivität in der Reifungszone in der Wurzel in der meristematischen Zone und dem ruhenden Zentrum auf.

E) dokumentiert die *AtMRS2-7*-Promotoraktivität unter Zusatz von 40 µM Nickelsulfat im Nährmedium. Es tritt eine stärkere *AtMRS2-7*-Promotoraktivität in der meristematischen Zone auf.

3 Ergebnisse

Für *AtMRS2-8*, einem der Pseudogene, wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Unter Standardbedingungen konnte keine Expression beobachtet werden (Abbildung 3.0 13 A). Da bei Magnesiummangel zum Teil eine leichte, nicht eindeutige, Induktion für die Transporter *AtMRS2-3* und *AtMRS2-7* beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde auch für *AtMRS2-8* ein Einfluss auf die Expression untersucht. Für *AtMRS2-8* konnte eine starke Färbung in der Wurzel unter Magnesiummangel beobachtet werden (Abbildung 3.0 13 B). Eine Färbung wurde auch unter Cadmiumstress in der Wurzel unter Kobalt-, Kupfer- und Nickelstress beobachtet (Abbildung 3.0 13 C, D, E).

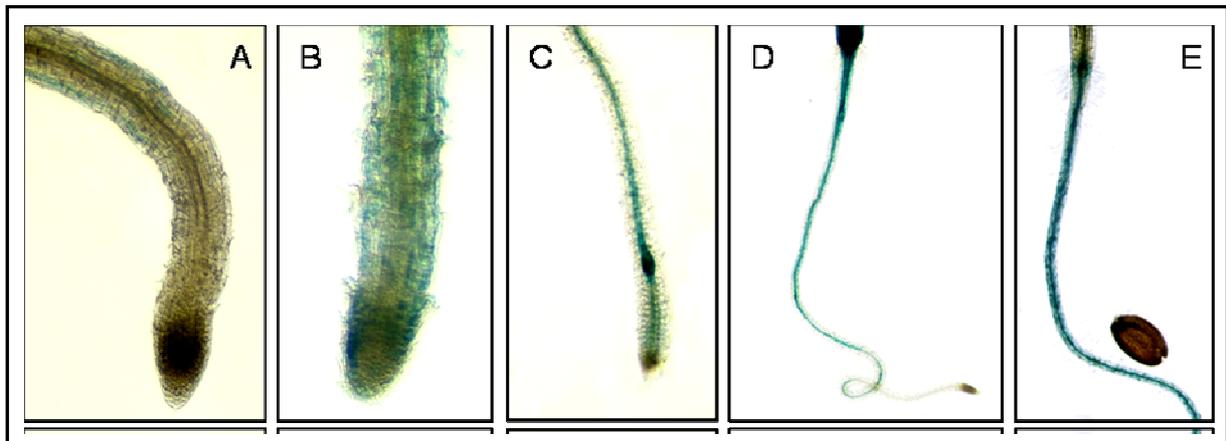


Abbildung 3.0 13: *AtMRS2-8*Promotoraktivität in der Wurzel unter Magnesiummangel und Schwermetallstress

*AtMRS2-8*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Schwermetallstress und Magnesiummangel angezogen und die Promotoraktivität in der Wurzel nach sieben Tagen untersucht. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Die Nachweisreaktion wurde durch Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A) dokumentiert die Wurzelexpression von *AtMRS2-8* unter Standardbedingungen mit 1,5 mM $MgSO_4$, ohne Schwermetall-Zusatz. Es tritt keine Promotoraktivität in der Wurzel auf.

B) dokumentiert die Keimlingsexpression von *AtMRS2-8* unter Magnesiummangel (50 μM Magnesiumsulfat im Nährmedium) in der gesamten Wurzel, in einer vergrößerten Aufnahme der Wurzel in der Rhizodermis und der meristematischen Zone .

C) zeigt die Promotoraktivität von *AtMRS2-8* im Zentralzylinder der Wurzel, bei Zusatz von 50 μM Kobaltnitrat im Nährmedium wird eine stärkere Promotoraktivität von *AtMRS2-8* in der gesamten Wurzel beobachtet.

D) Bei Zusatz von 25 μM Kupfersulfat im Nährmedium kann eine Promotoraktivität von *AtMRS2-8* im Zentralzylinder in der Reifungszone nachgewiesen werden.

E) *AtMRS2-8* zeigt bei Zusatz von 40 μM Nickelsulfat im Nährmedium eine verstärkte Promotoraktivität in der gesamten Wurzel.

3 Ergebnisse

AtMRS2-10 zeigte unter Standardbedingungen eine Färbung im Keimling in den Hydathoden der Kotyledonen, dem Epicotyl und in der Wurzel in den Wurzelhaaren, der Wachstums- und der Streckungszone (Abbildung 3.0 14 A, E, J). Unter Cadmiumstress trat eine deutlich stärkere GUS-Färbung in den Wurzelhaaren (Abbildung 3.0 14 F) und eine stärkere Färbung der Wurzel bis in die meristematische Zone (Abbildung 3.0 14 K) auf. Diese stärkere Expression konnte auch unter Kobaltstress beobachtet werden (Abbildung 3.0 14 L). Es traten zudem verstärkt Wurzelhaare auf. Die Färbung im Epicotyl wurde hingegen unspezifischer (Abbildung 3.0 14 B), im Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypocotyl trat außerdem eine stärkere Färbung im Bereich des vaskulären Gewebes auf (Abbildung 3.0 14). Unter Kupferstress traten ebenfalls mehr Wurzelhaare mit intensiverer Färbung auf (Abbildung 3.0 14 M). Im Gegensatz dazu wurde die Färbung im Epicotyl stärker und trat auch im Apikalmeristem und im Hypocotyl auf, wo unter Kontrollbedingungen keine Expression zu beobachten war (Abbildung 3.0 14C, H). Durch Nickelstress dagegen wurde die Wurzelfärbung beeinflusst (Abbildung 3.0 14 N), die GUS-Färbung im Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypocotyl wurde jedoch auf einen schmalen Streifen reduziert und in Wurzelhaaren wurde nur eine schwache Färbung beobachtet (Abbildung 3.0 14 I). Zusätzlich zeigte sich eine Färbung der Blattadern der Kotyledonen, sowie des ersten Folge-Blattpaares (Abbildung 3.0 14 D). Auf die Färbung in den Trichomen zeigten die Schwermetalle keinen Einfluss.

3 Ergebnisse

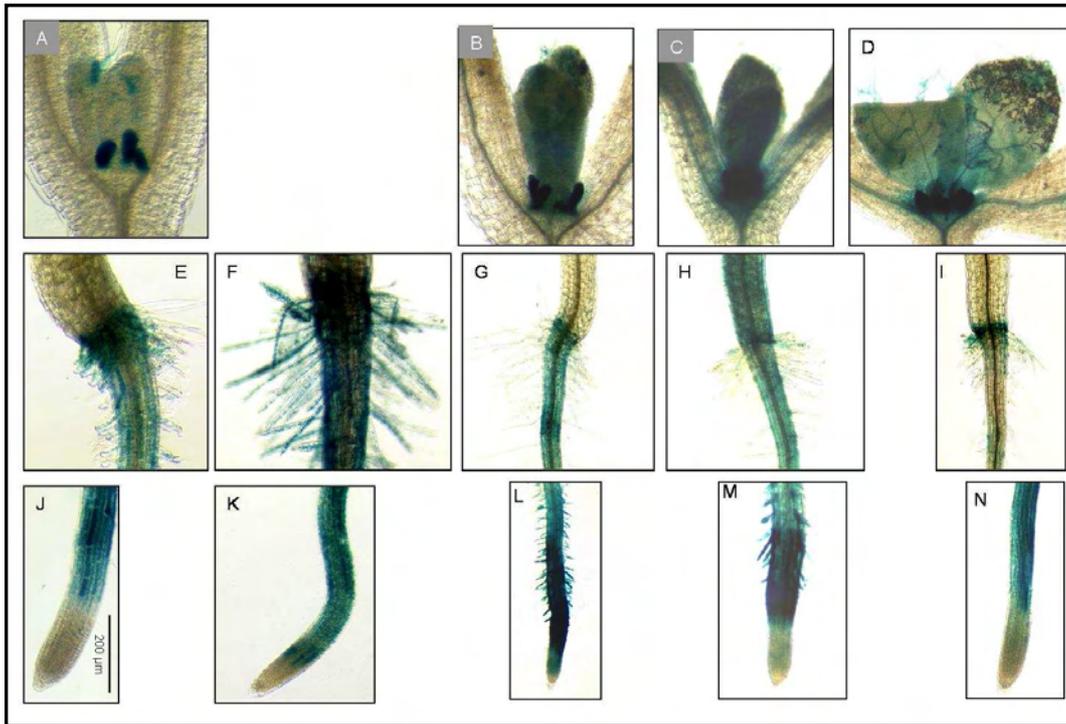


Abbildung 3.0 14: Einfluss von Schwermetallen auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* im Keimling

*AtMRS2-10*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Schwermetallstress und im Kontrollansatz unter Standardbedingungen angezogen. Nach sieben bis acht Tagen wurde die Promotoraktivität im Keimling durch Nachweis der Aktivität der β -Glucuronidase dokumentiert. Die Inkubation in der X-GlcA-Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Durch ein Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol wurde die Nachweisreaktion abgestoppt.

A), E) und J) dokumentieren die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in der Elongationszone (J), in der Reifungszone in der Rhizodermis und den Wurzelhaaren (E), in den Blattprimordien, den Blattansätzen und den Trichomen auf den Blattprimordien (A) unter Standardbedingungen ohne Schwermetallzusatz im Medium, Größenstandard (J) 200 μ m.

F) und K) dokumentieren die Promotoraktivität unter Zusatz von 30 μ M Cadmiumchlorid im Nährmedium. Es tritt eine verstärkte Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in der Elongationszone (K) und in der Reifungszone in der Rhizodermis, den Wurzelhaaren und dem Übergang zwischen Wurzel und Hypocotyl (F) auf.

B), G) und L) dokumentieren die Auswirkungen des Zusatzes von 50 μ M Kobaltnitrat im Nährmedium auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-10*. Der Zusatz von Kobalt führt zu einer verstärkten Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in der meristematischen Zone, der Elongationszone und den durch den Kobaltstress in der Elongationszone auftretenden Wurzelhaare (L), sowie im vaskulären Gewebe in der Reifungszone (G) und in den Blattprimordien mit den Trichomen und den Blattansätzen (B).

C), H) und M) dokumentieren die Promotoraktivität von *AtMRS2-10* unter Zusatz von 25 μ M Kupfersulfat im Nährmedium. Es tritt eine verstärkte Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in der Elongationszone (M), im vaskulären Gewebe der Reifungszone, den Wurzelhaaren und im Hypocotyl (H) auf. Zusätzlich kann eine sehr starke Promotoraktivität in den Blattprimordien, den Blattansätzen und den Trichomen (C) beobachtet werden.

D), I) und N) dokumentieren den Einfluss von 40 μ M Nickelsulfat im Nährmedium. Es wird eine Promotoraktivität von *AtMRS2-10* in der Elongationszone, aber keine Promotoraktivität in der Reifungszone (N) und nur noch eine auf den Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypocotyl (I) begrenzte Promotoraktivität nachgewiesen. Die Promotoraktivität im vaskulären Gewebe der Kotyledonen, den Blattprimordien und den Trichomen (D) tritt verstärkt auf.

Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-5-* (Abbildung 3.0 15 A, B) und *AtMRS2-10*Prom:GUS-Keimlingen zeigten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.0 15 C, D) eine reduzierte Promotoraktivität unter Aluminium bei

3 Ergebnisse

gleichzeitigem Magnesiummangel (Abbildung 3.0 15 E, bzw. F-H), die für *AtMRS2-5* unabhängig von der Versorgung mit Magnesium auftrat (Abbildung 3.0 15 I, bzw. J-L).

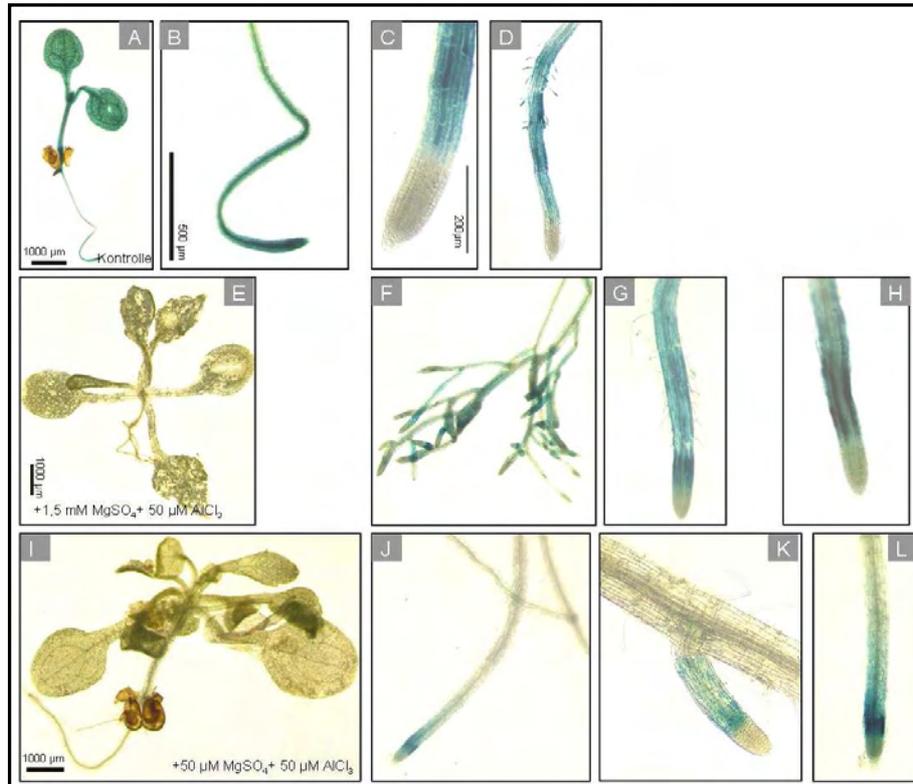


Abbildung 3.0 15: Einfluss von Aluminium auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-5* und *AtMRS2-10*

AtMRS2-5 und *AtMRS2-10*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Standardbedingungen (Kontrollansatz), unter Aluminiumstress mit Standardmagnesiumkonzentrationen und unter Aluminiumstress mit gleichzeitigem Magnesiummangel angezogen. Nach sieben Tagen (Kontrollen) bzw. 21 Tagen (Aluminiumstress) wurde die Promotoraktivität über den Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase dokumentiert. Die Nachweisreaktion erfolgte durch Inkubation in der Substratlösung für 18 Stunden. Die Färbereaktion wurde durch Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A– D) dokumentieren die Expression unter Kontrollbedingungen ohne Aluminiumchlorid-Zusatz mit 50 μ M $MgSO_4$ im Nährmedium.

A, B) dokumentieren die Promotoraktivität von *AtMRS2-5* in der gesamten Wurzel (B), dem Hypocotyl (A) und den Kotyledonen (A).

C, D) zeigen die Wurzel eines sieben Tage alten *AtMRS2-10*Promotor:GUS-Keimlings. Es tritt eine Promotoraktivität in der Elongationszone (C) und der Rhizodermis und den Wurzelhaaren in der Reifungszone (D) auf.

E, I) dokumentieren die Promotoraktivität von *AtMRS2-5* unter Aluminiumstress. Es tritt keine Promotoraktivität mehr unter Aluminiumstress bei normalen Magnesiumkonzentrationen (E) und unter Magnesiummangel (I) auf.

F, G, H) dokumentieren die Wurzelexpression von *AtMRS2-10* in der Elongations- und der Reifungszone (F Überblick, G und H als vergrößerte Aufnahme) unter Aluminiumstress mit Standardmagnesiumkonzentrationen, 1,5 mM $MgSO_4$ und 50 μ M $AlCl_3$.

J, K, L) dokumentieren eine reduzierte *AtMRS2-10*Promotoraktivität in der Elongationszone (J, K), starke Aktivität in der meristematischen Zone (L vergrößerte Aufnahme der Wurzel) bei Anzucht unter gleichzeitigem Aluminiumstress und Magnesiummangel (50 μ M $MgSO_4$ und 50 μ M $AlCl_3$).

Bei den beiden chloroplastidär lokalisierten Mitgliedern der Genfamilie *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* trat eine deutlich schwächere Färbung der Keimblätter unter Aluminiumstress

3 Ergebnisse

auch bei normaler Magnesium-Versorgung auf, bei *AtMRS2-11* trat bei gleichzeitigem Magnesiummangel keine Färbung mehr auf (Abbildung 3.0 16).

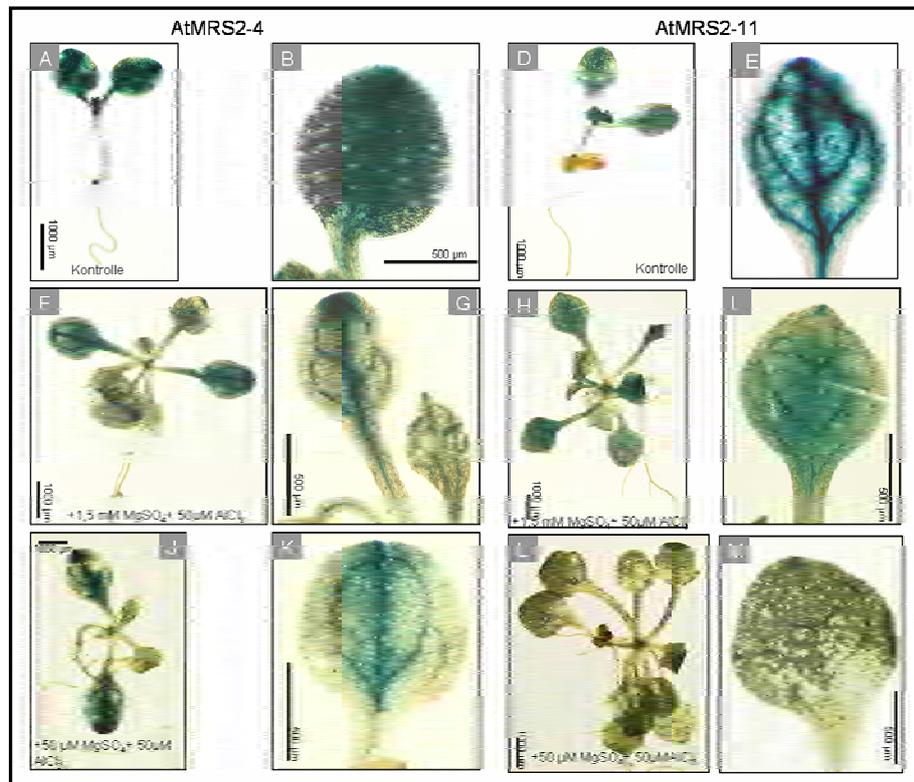


Abbildung 3.0 16: Einfluss von Aluminium auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*

AtMRS2-4 und *AtMRS2-11*Promotor:GUS-Keimlinge wurden unter Standardbedingungen (Kontrollansatz), unter Aluminiumstress mit Standardmagnesiumkonzentrationen und unter Aluminiumstress mit gleichzeitigem Magnesiummangel angezogen. Nach sieben Tagen (Kontrollen) bzw. 21 Tagen (Aluminiumstress) wurde die Promotoraktivität über den Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase analysiert. Die Inkubation in der Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Die Nachweisreaktion wurde durch Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt.

A – F) zeigen die Kontrollansätze ohne Aluminium im Medium $50 \mu\text{M MgSO}_4$ pH5,4.

A) dokumentiert die Promotoraktivität im sieben Tage alten *AtMRS2-4*Promotor:GUS-Keimling in den Kotyledonen und den Blattprimordien (Größenstandard $1000 \mu\text{m}$). B) zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Keimblatts mit starker Promotoraktivität im gesamten Keimblatt (Größenstandard $500 \mu\text{m}$).

C) dokumentiert in einer Übersichtsaufnahme eines sieben Tage alten *AtMRS2-11* Promotor:GUS-Keimlings unter Standardbedingungen die nachgewiesene Promotoraktivität von *AtMRS2-11* in den Kotyledonen und den Folgeblättern (Größenstandard $1000 \mu\text{m}$). In D) wird in einer vergrößerten Aufnahme eines Keimblatts von C) die Promotoraktivität von *AtMRS2-11* in den Adern und in der Blattfläche des Keimblatts dokumentiert.

G – H) dokumentieren die Ergebnisse des Versuchsansatzes mit $1,5 \text{ mM MgSO}_4$ und $50 \mu\text{M AlCl}_3$ bei pH4,3. G und H) dokumentieren die unter Aluminiumstress auf die Blattadern reduzierte *AtMRS2-4*Promotoraktivität (Größenstandard in G) $1000 \mu\text{m}$, in H) $500 \mu\text{m}$).

I, J) dokumentieren die *AtMRS2-11*Promotoraktivität unter Aluminiumstress. Die Promotoraktivität in der Blattfläche ist leicht reduziert (Größenstandard in I $1000 \mu\text{m}$, in J $500 \mu\text{m}$).

K – L) zeigen den Einfluss von Aluminiumstress bei gleichzeitigem Magnesiummangel ($50 \mu\text{M MgSO}_4$ und $50 \mu\text{M AlCl}_3$, pH4,3). Die *AtMRS2-4*-Promotoraktivität ist in der Blattfläche reduziert (Größenstandard in K $1000 \mu\text{m}$, in L $500 \mu\text{m}$)

N, O) zeigen den Einfluss von Aluminium bei gleichzeitigem Magnesiummangel auf die *AtMRS2-11*Promotoraktivität. Die Promotoraktivität in der Blattfläche ist unter Aluminiumstress fast nicht mehr nachweisbar (Größenstandard in N $1000 \mu\text{m}$, in M $500 \mu\text{m}$).

Die anderen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie zeigten keine eindeutige Veränderung der Färbung unter Schwermetallstress. *AtMRS2-6* wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen.

3.1.4 Einfluss von Verwundungen auf die Promotoraktivität

Magnesium besitzt eine wichtige Funktion bei der Stabilisation von Membranen und als Cofaktor für eine Vielzahl von Enzymen. Tritt eine Verwundung auf, dann müssen die Zellen an der Verwundungsstelle stabilisiert und repariert werden. Es tritt eine erhöhte Enzymaktivität auf.

Untersuchungen zum Einfluss von Verwundungen auf die Promotoraktivität wurden für alle Transporter durchgeführt. Veränderungen im Vergleich zur Promotoraktivität im unverletzten Blatt wurden nur für *AtMRS2-1* beobachtet. Die anderen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie zeigten keine eindeutigen Unterschiede. Im unverletzten Stängelblatt wurde eine Promotoraktivität in den Blattadern und in der Blattfläche beobachtet (Abbildung 3.0 17 A). Das verletzte Stängelblatt das sofort in die GUS-Substratlösung überführt wurde, zeigte eine auf die Blattadern begrenzte Promotoraktivität (Abbildung 3.0 17 B). Die Promotoraktivität von *AtMRS2-1* konnte sechs Stunden nach der Verletzung im Gewebe das die Verwundungsstelle umgibt, nachgewiesen werden (Abbildung 3.0 17 C, Pfeil). Eine verstärkte Promotoraktivität von *AtMRS2-1* wurde ebenfalls an Bruchstellen des Sprosses beobachtet (Abbildung 3.0 17 D)

3 Ergebnisse

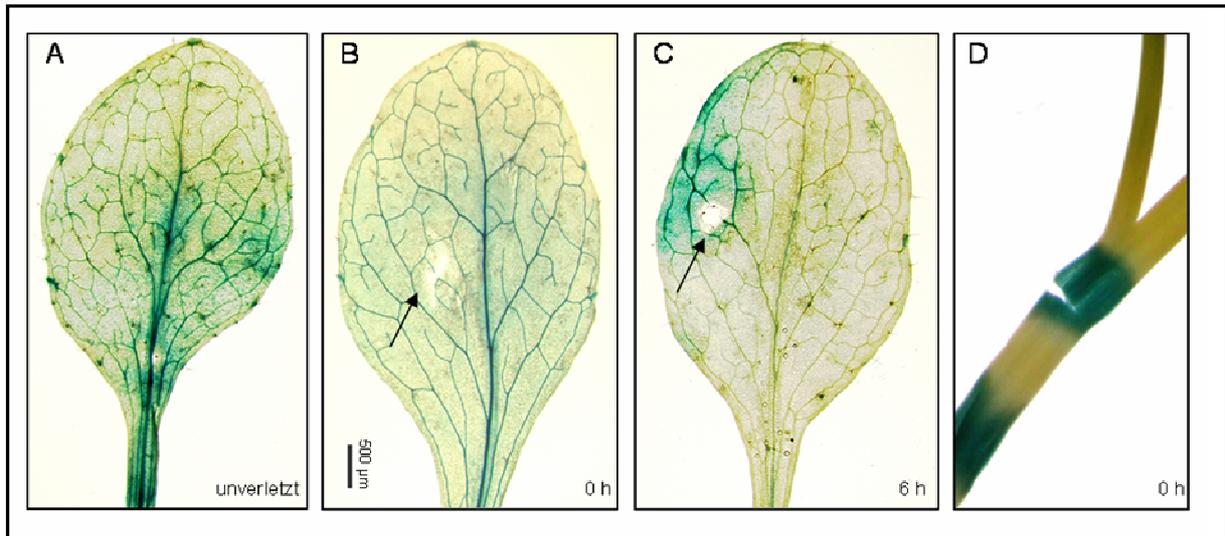


Abbildung 3.0 17 Einfluss von Verwundungen auf die Promotoraktivität von *AtMRS2-1*

Stängelblätter einer unter Standardbedingungen angezogenen *AtMRS2-1*Promotor:GUS-Pflanze wurden mit einer Pinzette verletzt. Ein Stängelblatt wurde sofort in X-GlcA-Substratlösung überführt, ein zweites wurde sechs Stunden nach der Verwundung in Substratlösung überführt. Die Promotoraktivität wurde über den Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase analysiert. Die Inkubation in der Substratlösung erfolgte für 18 Stunden. Die Nachweisreaktion wurde durch Austauschen der Substratlösung gegen 70 %iges Ethanol abgestoppt

- A) dokumentiert die Promotoraktivität von *AtMRS2-1* im unverletzten Stängelblatt in den Blattadern.
- B) zeigt die *AtMRS2-1*Promotoraktivität in den Blattadern 0 h nach der Verletzung im Stängelblatt.
- C) dokumentiert die *AtMRS2-1*Promotoraktivität in dem die Verletzungsstelle umgebenden Gewebe nach 6 h. Die Verletzungsstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
- D) zeigt die *AtMRS2-1*Promotoraktivität in verletzten Spross.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

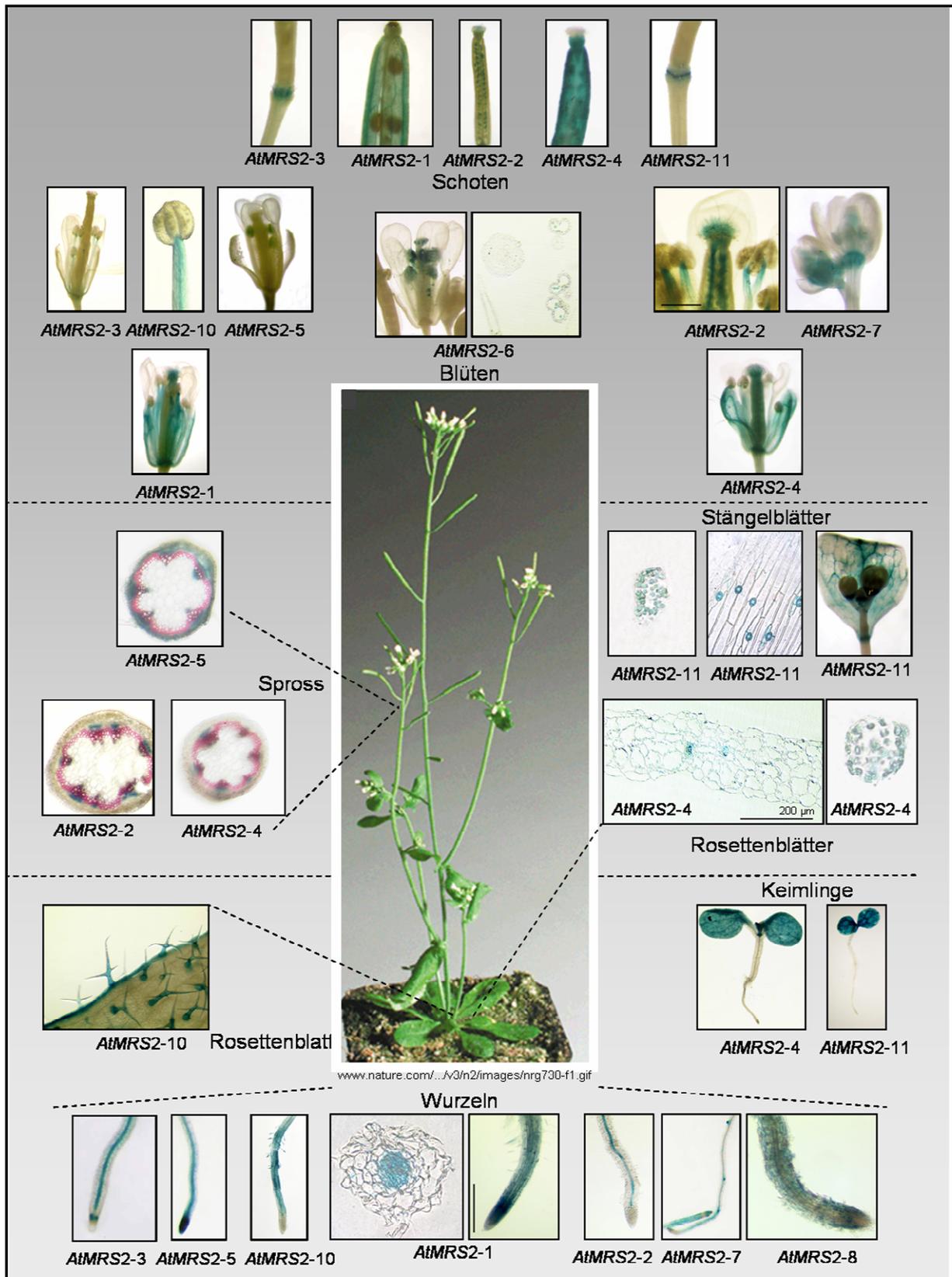


Abbildung 3.0 18: zusammenfassende Dokumentation der Promotoraktivitäten für die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie unter Standardbedingungen

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse der Promotoraktivität

Für die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie konnte durch Promotor-GUS-Fusionen zum Teil eine entwicklungspezifische Expression beobachtet werden. *AtMRS2-6* wurde z.B. während der gesamten Entwicklung der Pflanze nur in den Pollenkörnern exprimiert. Sechs Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie zeigten eine Expression in der Wurzel, z.B. *AtMRS2-2* und *AtMRS2-3* sehr spezifisch im vaskulären Gewebe, *AtMRS2-7* und *AtMRS2-10* in Rhizodermis und Wurzelhaaren, aber auch ubiquitär für *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5*. Überlappende Expressionsmuster in der Wurzel konnten vor allem im Bereich der meristematischen Zone, dem ruhenden Zentrum und dem vaskulären Gewebe beobachtet werden. Die beiden Magnesiumtransporter *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* zeigten im Keimling eine spezifische, überlappende Expression in den Kotyledonen. Beide Transporter zeigen auch auf subzellulärer Ebene eine überlappende Lokalisation in den Chloroplasten. Diese Überlappung im Expressionsmuster setzte sich auch in der adulten Pflanze fort, im Leitgewebe des Sprosses bei *AtMRS2-2*, *2-4* und *2-5*, den Folgeblättern bei z.B. *AtMRS2-1* und *AtMRS2-4*, sowie in den einzelnen Geweben der Blüte und in der Schote.

Die folgende Tabelle fasst das Expressionsmuster für alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie zusammen:

3 Ergebnisse

Tabelle 3. 2: Expressionsmuster der *AtMRS2*-Genfamilie unter Standard-Bedingungen

	1 d	3-14 d	Wurzel	Hypocotyl	Kotyledonen	Epicotyl	Primärblatt	Rosettenblatt	Spross	Stängelblatt	Blüte	Schote
AtMRS 2-1	Keimlings-Wurzel	+	ges. Wurzel	+	+	+	+	+	+	-	Blütenboden, Antherenfilament, Petalen	Adern Schotenhülle
AtMRS 2-2		+	Stele	+	+	+	+	+	+		Samenanlage, Antherenfilament	Samen
AtMRS 2-3		+	merist. Zone, Stele	+	+	+	+	+	-		Antherenfilament	Abzissionszone
AtMRS 2-4		+	-	-	+	+	+	+	+		Sepalen, Blütenboden, Griffel	ges. Schote
AtMRS 2-5	Keimlings-Wurzel	+	ges. Wurzel ohne Kalyptra	+	Blatt und Trichom	+	+	+	+	+	Sepalen, Antheren	+
AtMRS 2-6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pollenkörner	-
AtMRS 2-7		+	Ruhendes Zentrum, Stele, Rhizodermis	Stomata	-	-	-	-	+	+	Antheren	-
AtMRS 2-8		+	ind. ges. Wurzel	ind.	ind.	-	-	-	-	-	ind. Anthere	-
AtMRS 2-9		+	Wurzelspitze	-	-	-	-	-	-	-	Pollenkörner	-
AtMRS 2-10	Wurzelhaare, Rhizodermis	+	Wurzelhaare, Rhizodermis	-	Hydathoden, Trichom	+	-	Trichom, Blattadern	-	-	Antherenfilament	-
AtMRS 2-11		+	-	Stomata	+	+	+	-	Stomata	Stomata	Abszissionszone	Abszissionszone

+: Promotoraktivität vorhanden

-: keine Promotoraktivität

Unter Kupfer- und Nickelstress zeigte *AtMRS2-4* eine reduzierte Färbung in den Kotyledonen (Abbildung 3.0 11), *AtMRS2-5* und *AtMRS2-10* Promotor:GUS-Keimlinge zeigten im Gegensatz dazu eine stärkere Färbung in Kotyledonen und Epicotyl unter Einfluss von Kupfer (Abbildung 3.0 11), *AtMRS2-10* zeigte auch eine schwächere Färbung unter Nickelstress. *AtMRS2-4*, *2-5*, *2-10* und *2-11* zeigten eine reduzierte Färbung unter Aluminiumeinfluss (Abbildung 3.0 15, Abbildung 3.0 16).

3.2 Analysen von Protein-Protein-Wechselwirkungen über das *mating-based* Split-Ubiquitin-System in Hefe

Untersuchungen zur Struktur des bakteriellen homologen CorA-Proteins zeigten in *Salmonella typhimurium* eine Pentamerstruktur. Da in Bakterien nur eine Kopie des Gens vorliegt, handelt es sich folglich um eine Homopentamerstruktur (Eshaghi et al. 2006). Aufgrund des Auftretens einer Genfamilie von neun funktionalen Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* eröffnet sich hier die Möglichkeit zur Bildung von sowohl homo- als auch hetero-oligomeren Kanälen. Das *mating-based* Split Ubiquitin System (mbSUS) bietet die Möglichkeit, durch heterologe Expression in der Hefe zu untersuchen, ob eine Interaktion zweier Membranproteine möglich ist und ob Homo-Oligomere, bzw. Hetero-Oligomere gebildet werden (Obrdlik et al. 2004). Die Expressionsanalysen durch Promotor:GUS-Fusionen zeigten z.B. für *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* eine überlappende Expression im vegetativen Gewebe. Beide zeigen außerdem eine Lokalisation in den Chloroplasten. Hier wäre es interessant zu sehen, ob beide Proteine auch miteinander interagieren und somit als Hetero-Oligomer einen funktionalen Magnesiumkanal ausbilden könnten.

Das Prinzip des mbSUS beruht auf der Spaltung des Ubiquitins in zwei Hälften eine C-terminale und eine N-terminale Hälfte, die jeweils mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert werden. Am Ende der C-terminalen Hälfte wurde vor der letzten Aminosäure zusätzlich ein künstlicher Transkriptionsfaktor als Reportermolekül eingefügt. Beide Fusions-Proteine werden dann in einer Hefe-Zelle coexprimiert. Bei einer Interaktion der Fusionspartner kommen die beiden Hälften des Ubiquitins wieder in räumliche Nähe, es entsteht funktionales Ubiquitin und dieses wird durch ubiquitin-spezifische Proteasen erkannt. Ubiquitin spezifische Proteasen schneiden vor der letzten Aminosäure. Das Reportermolekül wird abgeschnitten und wandert in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von Reportergenen aktiviert. Die Produkte können nachgewiesen und somit eine Interaktion detektiert werden (Abbildung 2.0 11).

3.2.1 Methodischer Ablauf zur Herstellung der Konstrukte für das *mating based Split-Ubiquitin-System*

Durch die Expressionsanalysen mittels Promotor:GUS-Fusion der einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie und den Expressionsdaten aus Array-Hybridisierungen die aus der Datenbank „Genevestigator“ abgerufen werden können (<http://www.genevestigator.de>) (Zimmermann et al. 2004), konnten die Gewebe der Pflanze identifiziert werden, in denen die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie exprimiert werden. Ausgehend von diesen Daten wurde für *AtMRS2*-1, 2-2, 2-3, 2-5, 2-7 und 2-10 Gesamt-RNA mit dem Kit von Machery-Nagel (2.1.8) aus Wurzeln isoliert. Bei *AtMRS2*-4 und *AtMRS2*-11 wurde aus Keimlingen, Stängel- bzw. Rosettenblättern RNA extrahiert. Für *AtMRS2*-6 wurde Gesamt-RNA aus Blüten isoliert. Durch gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Qualität und Quantität der Gesamt-RNA bestimmt, und die RNA-Konzentration für die cDNA-Synthese abgeschätzt. Die cDNA-Synthese erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers mit der Reversen Transkriptase von Fermentas (2.1.8). Die cDNA wurde in eine PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt, die zusätzlich spezifische Sequenzbereiche zur Klonierung mit dem Split-Ubiquitin-System trugen. Die erhaltenen PCR-Produkte für die einzelnen Mitglieder wurden aus dem Gel aufgereinigt und durch gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert. Für die Synthese des *AtMRS2*-6-PCR-Produkts wurden zunächst die hintere und die vordere Hälfte des Gens getrennt amplifiziert. Beide überlappenden Hälften wurden dann in eine PCR-Reaktion eingesetzt, um das vollständige PCR-Produkt zu erhalten. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erwartete Größe der PCR-Produkte.

Tabelle 3. 2: Sequenzgrößen in bp für die cDNA-PCR-Produkte zur Herstellung der C_{ub}- und N_{ubG}-Fusionen ohne att-Sequenzen

Konstrukt	Sequenzgröße (bp)	Gewebe zur RNA-Extraktion
<i>AtMRS2</i> -1	1329	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -1ΔN (mutiert)	1150	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -2	1185	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -3	1455	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -3* (mutiert)	1455	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -4	1311	Keimlinge/Rosettenblätter
<i>AtMRS2</i> -5	1266	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -5* (mutiert)	1266	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -6	1227	Blüten adulter Pflanzen
<i>AtMRS2</i> -7	1161	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -10	1332	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>AtMRS2</i> -11	1376	Keimlinge/ Stängelblätter
<i>At2g04305</i>	1380	Wurzeln 7 d alter Keimlinge
<i>ALR1</i>	2577	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lpe10</i>	1240	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>MRS2</i>	1410	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

3.2.2 *in vivo* Klonierung in der Hefe

Die Vektoren pNXgate 33-3HA bzw. pMetYCgate für die Fusion mit der N- bzw. C-terminalen Hälfte des Ubiquitins wurden laut Anleitung von Obrdlik (2004) linearisiert und die Vektorbanden aus dem Gel eluiert. In die *in vivo*-Klonierungs-Reaktion wurden 100 ng linearisierter Vektor und 400 ng PCR-Produkt eingesetzt, in die Hefe co-transformiert und auf dem entsprechenden Medium selektiert. Einige Hefekolonien wurden in Flüssigmedium über Nacht kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmid-DNA aus der Hefe wurde in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock transformiert und aus diesen die Plasmid-DNA isoliert. Durch Restriktionsspaltung wurden die Fragmentgrößen bestimmt und Plasmide mit der korrekten Größe sequenziert. Korrekte, sequenzierte Plasmide wurden in die Hefe transformiert und die Interaktionsanalysen wiederholt.

Da die Effizienz der *in vivo*-Klonierung für die C_{ub}- bzw. N_{ubG}-Fusionen nur sehr gering war, wurden hier die PCR-Produkte über einen BP-Klonase-Reaktions-Ansatz in die Hefe-Vektoren pMetYCgate für die C_{ub}-Fusionen bzw. pNXgate33-3HA für die N_{ubG}-Fusionen eingebracht und durch Hitzeschock in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Einige vereinzelte Kolonien wurden in flüssigem LB-Medium über Nacht kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Durch Schneiden mit dem Enzym *PvuII* (C_{ub}-Fusionen) bzw. den Enzymen *BamHI* und *XhoI* (N_{ubG}-Fusionen) wurden die Vektoren fragmentiert. Es sollten hier jeweils zwei Fragmente entstehen, ein Fragment mit einer konstanten Größe der Vektorbande, und ein variables Fragment entsprechend der Größe des PCR-Produkts mit Resten des Vektors. Plasmide mit der korrekten Größe wurden auch hier von dem Unternehmen Macrogen Inc. (Korea) sequenziert.

In allen möglichen Kombinationen wurden die Hefestämme mit den C_{ub}- bzw. N_{ubG}-Fusionen gekreuzt und auf Vollmedium (YPD-Medium) inkubiert. Die Analyse der Protein-Proteininteraktion erfolgt nach Überimpfen auf selektives Medium durch Wachstum bzw. nicht-selektives Medium durch Nachweis der β -Galactosidaseaktivität.

3.2.3 Ergebnisse der Protein-Proteininteraktions-Analysen mit dem *mating based Split-Ubiquitin-System*

Erste Ergebnisse zu Interaktionen der AtMRS2-Proteine wurden bereits in der Dissertation von K. Weyand in Kooperation mit P. Obrdlik erzielt (Weyand 2006). Es konnte eine Interaktion für C_{ub} bzw. N_{ubG}AtMRS2-1 und C_{ub} bzw. N_{ubG}AtMRS2-10 als Homo- und als Hetero-Oligomere gezeigt werden. Eine Mutation des GMN-Motifs zu einem AMN-Motif zeigte in diesem Ansatz keine Auswirkungen auf die Interaktion.

Im Anschluss daran wurden in meiner Dissertation nun neue C_{ub}- und N_{ubG}-Fusionen für AtMRS2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, und AtMRS2-11 hergestellt. Es wurden außerdem C_{ub}- und N_{ubG}-Fusionen für ein weiter entferntes Mitglied der *AtMRS2*-Genfamilie, At2g04305 und die Hefe-Homologen ALR1, LPE10 und MRS2 hergestellt und in die Protein-Proteininteraktionsanalyse mit einbezogen. Zusätzlich wurden neue C_{ub}- und N_{ubG}-Fusionskonstrukte mit Mutationen analysiert, darunter ein N-terminal verkürztes Konstrukt für AtMRS2-1 (C_{ub}2-1Δ1-83 bzw. N_{ubG}Δ1-83) und für AtMRS2-3 und AtMRS2-5 wurde jeweils ein Konstrukt mit einer Mutation in der *coiled coil*-Domäne hergestellt (C_{ub}2-3# bzw. N_{ubG}2-3# und C_{ub}2-5# bzw. N_{ubG}2-5#). Hier sollte untersucht werden, ob auch bei den AtMRS2-Proteinen Mutationen der *coiled coil*-Domäne Auswirkungen auf die Protein-Proteininteraktion zeigen (1.2.1).

Abbildung 3.0 19 zeigt ein gleichmäßiges Wachstum der Hefekolonien auf Vollmedium (YPD-Medium). Die Hefekolonien sollten das C_{ub}- und das N_{ubG}-Fusionsprotein co-exprimieren. Ein gleichmäßiges Wachstum der Hefekolonien war an dieser Stelle wichtig, da im weiteren Versuchsverlauf auf selektives Medium überimpft wurde und der Nachweis der Interaktion durch Wachstum eindeutig auswertbar ist, wenn bereits im vorherigen Schritt kein gleichmäßiges Wachstum der Hefekolonien erfolgte.

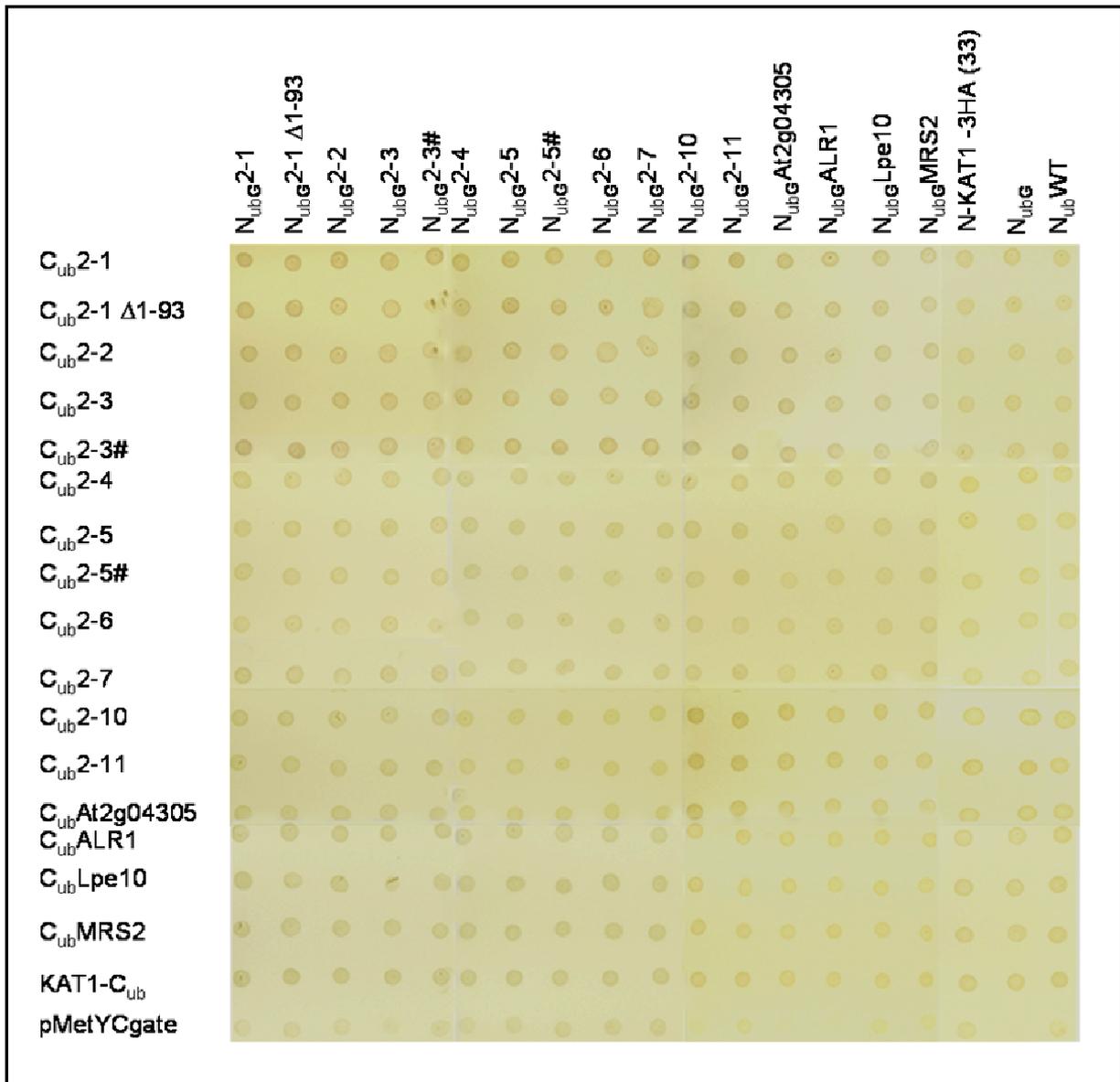


Abbildung 3.0 19: Dokumentation des Hefewachstums auf Vollmedium (YPD) nach dem Kreuzen für alle funktionalen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie

Dokumentiert wird das Wachstum der Hefezellen nach dem *Mating*. Die jeweiligen Hefekulturen mit den N_{ubG} bzw. C_{ub}-Fusionen wurden gekreuzt und auf Vollmedium aufgetropft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C, bis alle Hefe-Kolonien das gleiche Wachstumsniveau erreicht hatten.

C_{ub}: Fusion des zu analysierenden Proteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins und dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV.

MetYCgate enthält die C-terminale Hälfte des Ubiquitins in Fusion mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV: Der leere Vektor sollte keine Interaktion mit den N_{ubG}-Fusionen und dem Vektor N-KAT1-3HA zeigen. N_{ubG}: Fusion des zu analysierenden Proteins mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins NubWT: N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation. Dieser Ansatz (Spalte ganz rechts) diene als Positiv-Kontrolle.

KAT1C_{ub} und N-KAT1-3HA (33) stellen die interne Kontrolle des Systems dar, da für KAT1 eine Homooligomerbildung gezeigt wurde.

C_{ub} bzw. N_{ubG} 2-3# bzw. 2-5# bezeichnen die Konstrukte mit der mutierten *coiled coil*-Domäne. N_{ubG} bzw. C_{ub}2-1 Δ1-93 bezeichnet das N-terminal verkürzte AtMRS2-1 Protein.

Von der YPD-Platte wurden die Hefekolonien auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und

3 Ergebnisse

Uracil (SC+A+H-Medium) überimpft. Auf SC+A+H-Medium sollten nur diploide Hefezellen wachsen können, da diese durch Aufnahme des C_{ub^-} und N_{ubG^-} -Plasmids Tryptophan und Leucin, sowie Uracil (THY.AP4) wieder selbst synthetisieren können. Für den Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum wurden die Hefekolonien mit einem Stempel von dem SC+A+H-Medium auf Medium ohne Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil (SD-Medium) überimpft. Durch den Zusatz unterschiedlicher Methioninkonzentrationen konnte die Signalstärke des C_{ub^-} -Fusionsproteins reguliert werden. Dargestellt wird nur das Wachstum auf SD+ 0 μ M Methionin und SD+ 150 μ M Methionin nach drei bzw. sieben Tagen Wachstum, da auf SD-Medium mit 75 μ M Methionin ein identisches Wachstumsmuster wie bei SD-Medium ohne Methionin auftrat. Bei 400 μ M Methionin erfolgte kein Wachstum der Hefe mehr.

Ein erster Nachweis der Interaktion erfolgte durch Überschichtung der SC+A+H -Platte mit X-Gal-Lösung. Diploide Hefezellen coexprimieren die C_{ub^-} und N_{ubG^-} bzw. N_{ub^-} -Fusionsproteine, wodurch eine auftretende Protein-Proteininteraktion durch Aktivierung der Transkription des Reportergens *X-Gal* nachgewiesen werden kann. Die sensitivere Nachweismethode für die Protein-Proteininteraktion erfolgte durch Überimpfen der Hefekolonien mit einem Stempel auf Medium ohne Adenin und Histidin (Interaktionsnachweis) und Leucin, Tryptophan und Uracil (Wachstum diploider Hefezellen).

Abbildung 3.0 20 zeigt die Ergebnisse der Protein-Proteininteraktionsanalysen über den Nachweis des Reportergens X-Gal. Als Positivkontrolle diente die N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation (ohne Austausch des Isoleucins gegen Glycin an Position 13 = N_{ubWT}). Die N-terminale Hälfte des Ubiquitins lagert sich spontan wieder mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins zusammen, wodurch eine Erkennung und Spaltung des Ubiquitins durch ubiquitin-spezifische Proteasen erfolgt. Die Interaktion kann durch die Reportergene *Ade2*, *His3* und *X-Gal* nachgewiesen werden. Beim Nachweis der Protein-Proteininteraktion sollten somit alle C_{ub^-} -Fusionen mit dem Vektor $pN_{ubWTXgate}$ (N_{ubWT}) interagieren, und sich die Hefekolonien dementsprechend bei Überschichtung mit X-Gal-Medium blau färben. Eine Interaktion mit der Positivkontrolle ist die Voraussetzung für die Auswertbarkeit, da hier ein Ausbleiben der Interaktion auf ein fehlerhaftes Konstrukt hinweist und eine Freisetzung des künstlichen Transkriptionsfaktors PLV nicht möglich ist. Die Auswertung der Nachweisreaktion des Reportergens *X-Gal* zeigte eine Interaktion mit dem Vektor $pNubWTxgate$ mit Ausnahme von $C_{ub^-}2-1\Delta 1-83$, $C_{ub^-}2-2$, $C_{ub^-}2-4$, $C_{ub^-}2-5\#$, LPE10 und MRS2, für alle AtMRS2- C_{ub^-} -Fusionen und sind somit auswertbar (Abbildung 3.0 20, blauer

3 Ergebnisse

Kreis). Eine Blaufärbung der Hefekolonien nach Überschichtung mit X-Gal-Lösung konnte für C_{ub}-2-1, 2-3, 2-5, 2-6, 2-7, 2-10, 2-11 und At2g04305 mit N_{ubG}-2-1, 2-3, 2-5, 2-6, 2-7, 2-10, 2-11 und At2g04305 beobachtet werden (Abbildung 3.0 20, blauer Kasten). Somit scheint eine Bildung von Homo-Oligomeren prinzipiell möglich zu sein.

Für die Untersuchung zur Hetero-Oligomerbildung, wurden sämtliche Kombinationen von C_{ub}- und N_{ubG}-Fusionsproteinen getestet. In diesem Ansatz zeigten die meisten Fusionsproteine ebenfalls eine Blaufärbung der Hefekolonie mit weiteren AtMRS2-Fusionsproteinen, z.B. C_{ub}AtMRS2-3 und N_{ubG}AtMRS2-1, 2-5, 2-6, 2-7, oder etwas schwächer mit N_{ubG}-AtMRS2-10 und 2-11 (Abbildung 3.0 20, blaues Dreieck). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Bildung von Hetero-Oligomeren hin. Im Gegensatz dazu zeigte C_{ub}At2g04305 nur eine Interaktion mit N_{ubG}At2g04305.

Ein Vergleich der Interaktion über den Nachweis des Reportergens X-Gal für das N-terminal verkürzte AtMRS2-1 Protein zeigte hier eine leicht reduzierte Blaufärbung der Hefekolonie. Ein ähnliches Ergebnis kann man bei den mutierten AtMRS2-3 und AtMRS2-5-Fusionsproteinen beobachten. Vergleicht man das Ergebnis der Nachweisreaktion für das C_{ub}AtMRS2-3-Fusionsprotein mit N_{ubG}-AtMRS2-3 und C_{ub}AtMRS2-3# mit N_{ubG}AtMRS2-3 bzw. AtMRS2-3#, dann zeigte sich hier eine deutlich schwächere Blaufärbung der Hefekolonien. Für die Interaktion von C_{ub}AtMRS2-5 mit N_{ubG}2-5# bzw. C_{ub}2-5# mit N_{ubG}2-5 konnte das Reportergen *X-Gal* nicht mehr nachgewiesen werden. Die interne Kontrolle des Systems zeigte keine Interaktion von KAT1-C_{ub} bei der Überschichtung mit X-Gal-Lösung.

Die Negativ-Kontrolle mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (N_{ubG}) zeigte keine Blaufärbung der Hefekolonie und somit auch keine Interaktion.

3 Ergebnisse

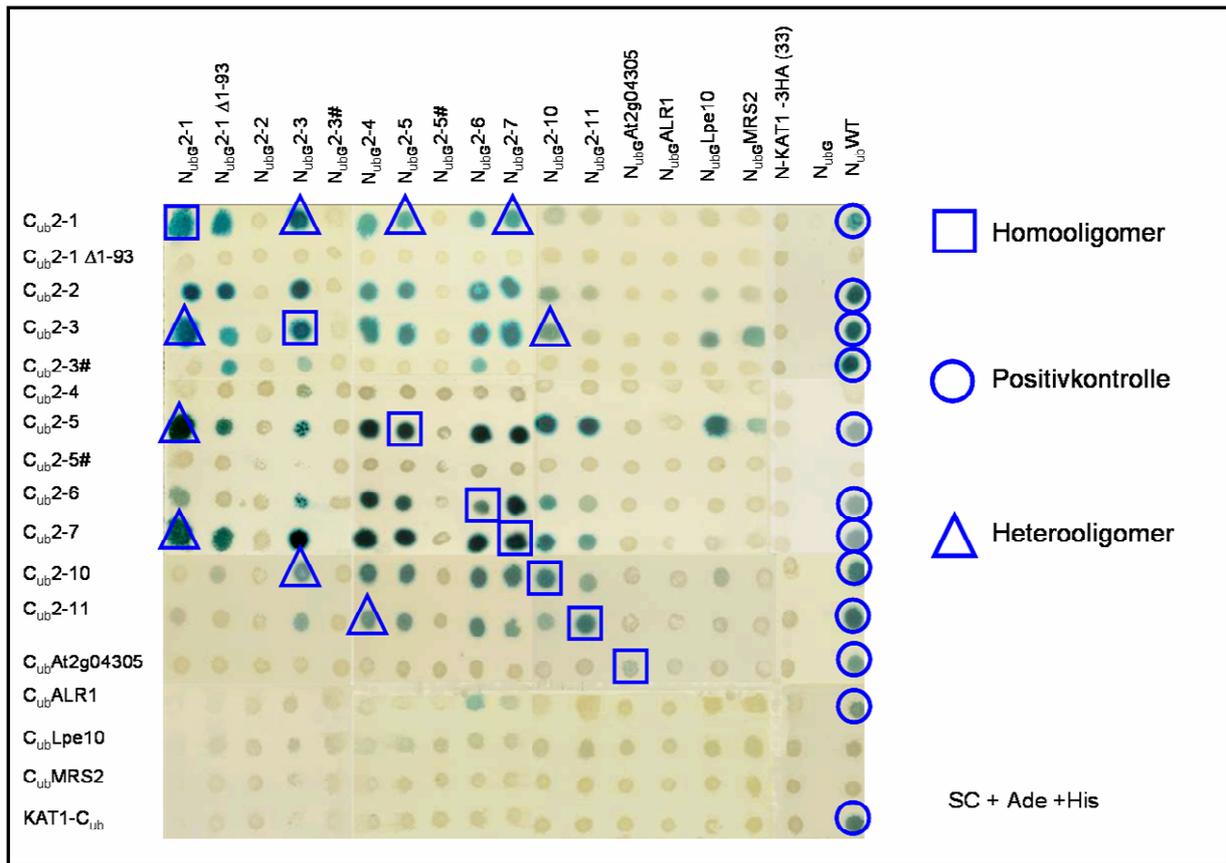


Abbildung 3.0 20 Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Überschichtung mit X-GAL-Medium

Dokumentiert wird das Wachstum der Hefekolonien auf SC+A+H-Medium. Grundsätzlich sollten nur diploide Hefezellen wachsen können, die die C_{ub} - und N_{ubG} -Fusionen coexprimieren. Das Medium mit den Hefekolonien wurde zum Nachweis der Interaktion über die Enzymaktivität des Enzyms β -Galactosidase mit X-GAL-Medium überschichtet und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

C_{ub} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins und dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV.

pMetYCgate enthält die C-terminale Hälfte des Ubiquitins in Fusion mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV. Dieser leere Vektor sollte keine Interaktion mit den N_{ubG} -Fusionen und dem Vektor N-KAT1-3HA zeigen.

N_{ubG} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins. N_{ubWT} : N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation. Dieser Ansatz (Spalte ganz rechts, blauer Kreis) diente als Positiv-Kontrolle.

Blauer Kasten: Homooligomere

Blaues Dreieck: Heterooligomere

$KAT1_{Cub}$ und N-KAT1-3HA (33) stellen die interne Kontrolle des Systems dar, da für KAT1 eine Homooligomerbildung gezeigt wurde.

Der Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin stellt die sensitivere Methode dar. Die Ergebnisse werden in Abbildung 3.0 21 dokumentiert. Vergleicht man die Ergebnisse des Wachstums auf selektivem Medium mit den Ergebnissen der Überschichtung mit X-GAL-Medium, so kann zusätzlich eine Interaktion mit der Positivkontrolle (N_{ubWT}) für $C_{ubAtMRS2-2}$, $C_{ubAtMRS2-3\#}$, $C_{ubAtMRS2-4}$, $C_{ubAtMRS2-5\#}$ und $C_{ubLPE10}$ nachgewiesen werden (Abbildung 3.0 21, rechte Spalte grüner Kreis). Die für diese C_{ub} -Fusionen beobachteten Interaktionen sind somit auswertbar. Eine

3 Ergebnisse

Homooligomerbildung (Abbildung 3.0 21, grüner Kasten) ist somit ergänzend zu den Ergebnissen der X-GAL-Überschichtung auch für AtMRS2-4 möglich. Die heterooligomere Interaktion (Abbildung 3.0 21, grünes Dreieck) die im X-Gal-Ansatz für N_{ubG}2-4 mit C_{ub}2-11 beobachtet wurde, kann durch den Nachweis über das Wachstum bestätigt und ergänzend für die C_{ub}2-4 mit N_{ubG}2-11 Kombination gezeigt werden. Ergänzend ist eine Interaktion für C_{ub}At2g04305 mit N_{ubG}2-1 und 2-4 nachweisbar.

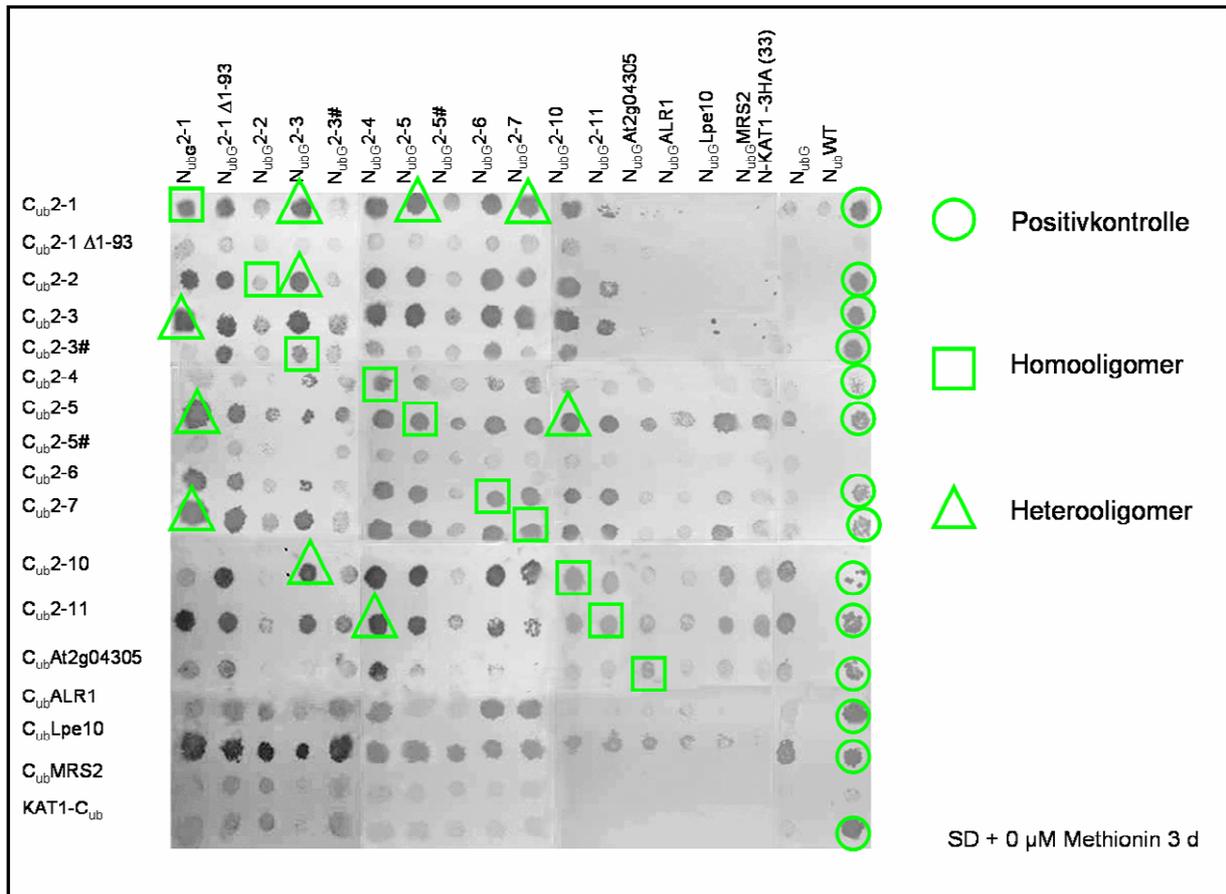


Abbildung 3.0 21: Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf Medium ohne Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil

Dargestellt sind die Ergebnisse der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf selektivem Medium für drei Tage bei 28 °C. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine können die Reportergene *Ade2* und *His3* durch Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin nachgewiesen werden. Leucin, Tryptophan und Uracil können diploide Hefezellen wieder selbst synthetisieren.

C_{ub}: Fusion des zu analysierenden Proteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins und dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV.

pMetYCgate enthält die C-terminale Hälfte des Ubiquitins in Fusion mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV. Dieser leere Vektor sollte keine Interaktion mit den N_{ubG}-Fusionen und dem Vektor N-KAT1-3HA zeigen.

N_{ubG}: Fusion des zu analysierenden Proteins mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins.

NubWT: N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation. Dieser Ansatz (Spalte ganz rechts) diente als Positivkontrolle (rechte Spalte, grüner Kreis).

KAT1Cub und N-KAT1-3HA (33) stellen die interne Kontrolle des Systems dar, da für KAT1 eine Homooligomerbildung gezeigt wurde.

Grüner Kasten: Homo-Oligomere

Grünes Dreieck: Heterooligomere

3 Ergebnisse

Da das Wachstum auf Methionin-haltigem Medium langsamer erfolgte und somit auf SD-Medium mit 150 μM Methionin nach drei Tagen noch kein Wachstum auftrat, wurden die Ergebnisse auf SD + 0 μM Methionin und SD + 150 μM Methionin nach sieben Tagen dokumentiert und verglichen. Nach sieben Tagen konnte zusätzlich zu den Ergebnissen nach drei Tagen, eine Bildung von Homo-Oligomeren für AtMRS2-2, ALR1, LPE10 und KAT1 beobachtet werden (Abbildung 3.0 22, grüner Kasten).

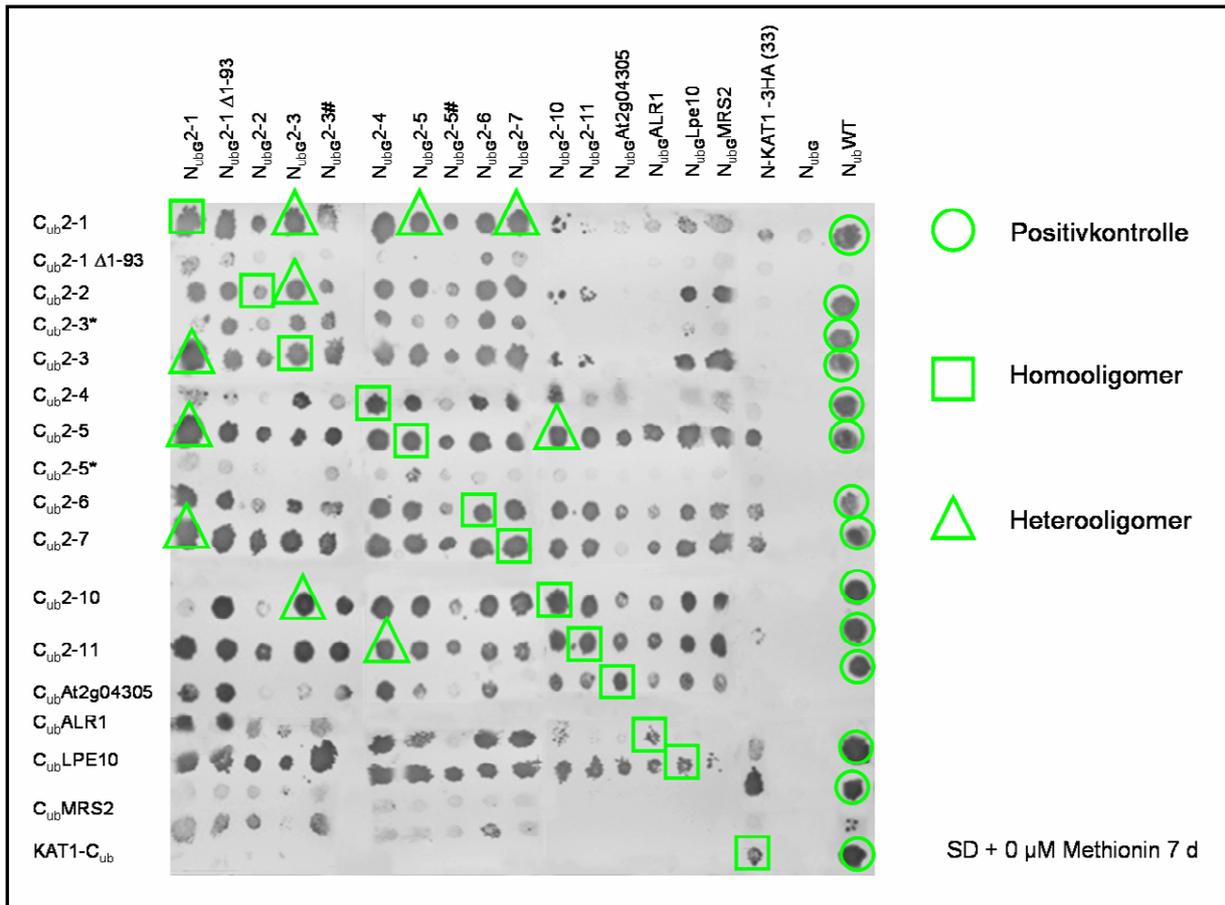


Abbildung 3.0 22 Dokumentation des Wachstums auf SD + 0 μM Methionin nach sieben Tagen

Dargestellt sind die Ergebnisse der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf selektivem Medium nach sieben Tagen Inkubation bei 28 °C. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine können die Reportergene *Ade2* und *His3* durch Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin nachgewiesen werden. Leucin, Tryptophan und Uracil können diploide Hefezellen wieder selbst synthetisieren.

C_{ub} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins und dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV.

pMetYCGate enthält die C-terminale Hälfte des Ubiquitins in Fusion mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV. Dieser leere Vektor sollte keine Interaktion mit den N_{ubG} -Fusionen und dem Vektor N-KAT1-3HA zeigen.

N_{ubG} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins.

N_{ubWT} : N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation. Dieser Ansatz (Spalte ganz rechts, grüner Kreis) diene als Positiv-Kontrolle.

KAT1 C_{ub} und N-KAT1-3HA (33) stellen die interne Kontrolle des Systems dar, da für KAT1 eine Homo-Oligomerbildung gezeigt wurde.

Homo-Oligomere: grüner Kasten

Hetero-Oligomere: grünes Dreieck

3 Ergebnisse

Abbildung 3.0 23 dokumentiert den Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf selektivem Medium mit 150 μM Methionin nach sieben Tagen Inkubation bei 28 $^{\circ}\text{C}$.

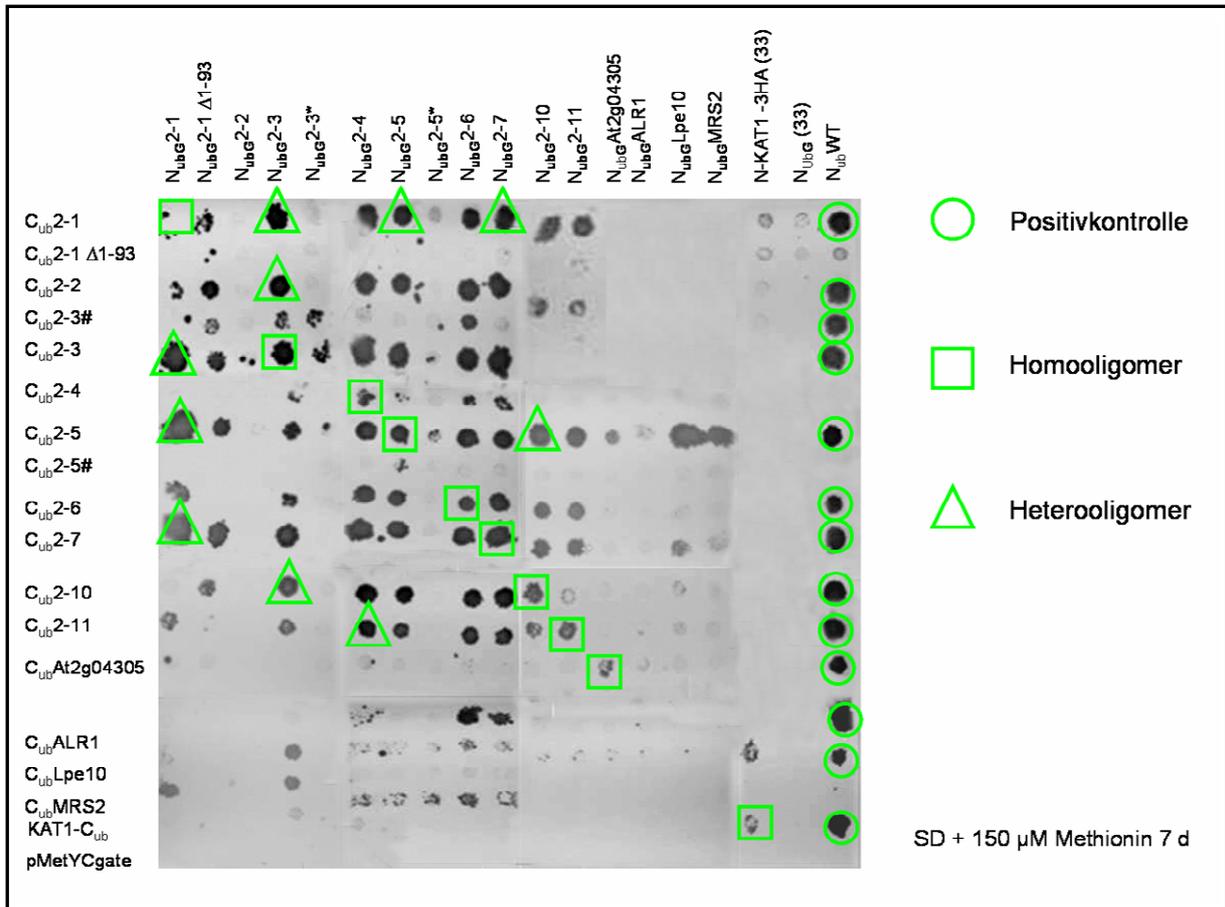


Abbildung 3.0 23: Dokumentation des Wachstum der Hefekolonien auf SD-Medium mit 150 μM Methionin nach sieben Tagen bei 28 $^{\circ}\text{C}$.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf selektivem Medium mit 150 μM Methionin. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine können die Reportergene *Ade2* und *His3* durch Wachstum auf Medium ohne Adenin und Histidin nachgewiesen werden. Leucin, Tryptophan und Uracil können diploide Hefezellen wieder selbst synthetisieren. Durch Zugabe von Methionin wurde die Menge des C_{ub} -Proteins reduziert.

C_{ub} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins und dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV.

pMetYCGate enthält die C-terminale Hälfte des Ubiquitins in Fusion mit dem künstlichen Transkriptionsfaktor PLV. Dieser leere Vektor sollte keine Interaktion mit den N_{ubG} -Fusionen und dem Vektor N-KAT1-3HA zeigen.

N_{ubG} : Fusion des zu analysierenden Proteins mit der mutierten N-terminalen Hälfte des Ubiquitins

N_{ubWT} : N-terminale Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation. Dieser Ansatz (Spalte ganz rechts) diente als Positivkontrolle (Spalte ganz rechts, grüner Kreis).

KAT1 C_{ub} und N-KAT1-3HA (33) stellen die interne Kontrolle des Systems dar, da für KAT1 eine Homooligomerbildung gezeigt wurde

Grüner Kasten: Homooligomere

Grünes Dreieck: Heterooligomere

Die beobachtete Interaktion von C_{ub2-10} mit $N_{ubG2-1\Delta1-93}$ ist wahrscheinlich durch ein Vertauschen der Versuchsansätze beim Auftropfen zustande gekommen.

3 Ergebnisse

4 Diskussion

Bei der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Gruppe von Magnesiumtransportern in *Arabidopsis thaliana* handelt es sich um eine vollkommen neue Klasse von Transportproteinen, die zur Familie der 2-TM-GxN-Superfamilie gehört (Knoop et al. 2005). Unter diesen findet sich der bakterielle Magnesiumtransporter CorA, sowie die Hefe-Homologen ALR1/2, LPE10 und MRS2. Die Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie sind bisher erst wenig untersucht. In ersten Arbeiten wurde für die *AtMRS2*-Proteine eine Komplementation des Wachstums von Δ *mrs2*-Hefemutanten gezeigt (Drummond et al. 2006, Schock et al. 2000). Lokalisationsstudien durch GFP-Fusion zeigten eine chloroplastidäre Lokalisation für *AtMRS2-11*, für *AtMRS2-1* eine Lokalisation in der Plasmamembran (Drummond et al. 2006, Li et al. 2001) und in unveröffentlichten Daten eine mitochondriale Lokalisation für *AtMRS2-6* (Schock 2000). Erste Analysen zur Expression über Promotor-GUS-Fusionen zeigten für *AtMRS2-11* eine Expression im chlorophyllhaltigen Gewebe (Drummond et al. 2006), für *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* in der Wurzel, für *AtMRS2-4* im vegetativen Gewebe und für *AtMRS2-6* in den Antheren (Meschenmoser 2003).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation lag auf Analysen der Promotoraktivität für die Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie. Durch die Herstellung und Analyse von Promotor-GUS-Fusions-Pflanzen sollte ein Überblick über die Expression für alle Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie gewonnen werden. In einem ersten Ansatz sollte eine Kartierung der Expression erstellt werden, um dann zu untersuchen, ob eine gewebe- und/ oder eine entwicklungspezifische Expression vorliegt. In einem zweiten Ansatz wurde der Einfluss exogener Faktoren wie Licht, Magnesiummangel und Schwermetallstress auf die Expression untersucht. Zudem wurden in einem weiteren Ansatz Protein-Proteininteraktionsanalysen mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System durchgeführt, um so Einblicke in den möglichen Aufbau eines Magnesiumkanals zu erhalten.

4.1 Expressionsmuster der *AtMRS2*-Genfamilie

Für die Analyse der Promotoraktivitäten wurden mit dem GATEWAY™ System Promotor:GUS-Fusionskonstrukte der Promotoren und des jeweiligen ersten codierenden Exons für alle *AtMRS2*-Transporter im Zielvektor pKGWFS7 hergestellt und in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Das erste codierende Exon wurde in die Promotor:Reportergenkonstrukte mit einbezogen, um eventuell Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation der Proteine zu erhalten. Diese hätte man zusätzlich zur β -Glucuronidase-Aktivität durch Analyse der GFP-Fluoreszenz beobachten können, da der verwendete Zielvektor pKGWFS7 (Karimi et al. 2002) stromaufwärts des *uid*-Reportergens für die β -Glucuronidase, die codierende Sequenz des EGFP enthält. Es entstanden pro Transporter ca. 50 transgene Linien, die zunächst über DNA-Extraktion und PCR mit einer Kombination aus genspezifischem und vektorspezifischem Primerpaar verifiziert wurden. Von diesen 50 Linien wurden die stärksten zehn transgenen Linien für die Analysen der Promotoraktivität verwendet. Das GFP-Signal konnte nicht eindeutig detektiert werden, da die *AtMRS2*-Promotoren allein hierfür zu schwach waren. Aus diesem Grund wurden nur die Ergebnisse des Enzymnachweises über die GUS-Färbung dokumentiert. Zum Ausschluss bzw. der Identifikation von durch Positionseffekte der T-DNA und durch eine mögliche Diffusion des blauen Reaktionsprodukts in den Geweben der Pflanze ausgelösten Artefakten, wurde die Promotoraktivität von mindestens zehn transgenen Linien pro Promotorkonstrukt analysiert. Die Experimente wurden zusätzlich mit GUS-Substratlösung wiederholt, die Formaldehyd zur Fixierung des Pflanzenmaterials enthielt. Beide Versuchsansätze zeigten keine Unterschiede. Die erhaltenen Ergebnisse zur Promotoraktivität wurden mit den Expressionsmustern in vorhandenen Microarray-Datenbanken (*Genevestigator*: <https://www.genevestigator.ethz.ch/>) (Zimmermann et al. 2004) und *EFP*-Browser (Birnbaum et al. 2003)) verglichen (siehe 4.1.1).

Erste Promotoraktivitäten wurden im auskeimenden Samen in der Keimlingswurzel für *AtMRS2*-1, 2-5 und 2-10 nachgewiesen (Abbildung 3.0 2). Der Samen ist bekannt als Speicherort für Nährstoffe wie Stickstoff und Schwefel, die in Form von speziellen Speicherproteinen vorliegen. Weniger bekannt ist, dass auch Magnesium bereits im Samen als Phytat, gebunden an Phosphat, vorkommt (Epstein und Bloom 2005, Lott et al. 1995, Raboy 2001, Vreugdenhil et al. 2004). Bei Kontakt des Samens mit Wasser mobilisiert der Embryo die Nährstoffe und baut so einen osmotischen Druck auf. Die Samenschale bricht auf und die Primärwurzel erscheint als erstes Organ (Amberger 1996, Bowman 1994). In der Primärwurzel, dem ersten Organ des auskeimenden Samens, wurde eine starke Expression der

Transporter *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5* beobachtet (Abbildung 3.0 2). Diese beiden Transporter könnten als basale Transporter für die Aufnahme von Magnesium über die Wurzel aus dem Boden, bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung, verantwortlich sein. Die Pflanze benötigt die Primärwurzel, um auf Nährstoffe und Wasser aus dem Boden bzw. dem Nährmedium zugreifen zu können. In diesem Entwicklungsstadium liegt eine erhöhte Zellteilungsaktivität vor, das Hypocotyl und das vegetative Gewebe, die Kotyledonen entwickeln sich. Magnesium wird hier als Cofaktor für viele Enzyme, zur Stabilisation von Membranen und im Nukleotidstoffwechsel benötigt (Fraústo da Silva und Williams 1991, Heldt 1979, Marschner 1995).

Für *AtMRS2-7* und *AtMRS2-10* wurde in den Wurzelhaaren und der Rhizodermis eine Färbung beobachtet (Abbildung 3.0 3). Vermutlich sind diese Transporter für die Aufnahme des Magnesiums über die Wurzelhaare und die Oberfläche der Wurzel bis zur Endodermis verantwortlich. Diese Beobachtung wird unterstützt durch Literaturangaben, wonach Transporter benötigt werden, die die Aufnahme und den Transport des Magnesiums über den Symplasten vermitteln (Jungk 2003). Der größte Teil der Magnesiumaufnahme erfolgt allerdings über den Apoplasten (Marschner 1995). Magnesium liegt im „Bodenwasser“ gelöst, und gebunden an Bodenpartikel vor. Die Wurzeloberfläche weist aufgrund von Carboxyl- und Phosphatgruppen im Plasmalemma der Rhizodermis eine negative Ladung auf, wodurch sie Kationen adsorbiert bzw. akkumuliert, schließlich erfolgt eine Diffusion in den so genannten freien Raum (*apparent free space*) des Apoplasten (Amberger 1996, Epstein und Bloom 2005). Von hier aus kann dann der apoplastische Transport durch Diffusion über das Zellwand-Interzellular-System bis zu den Endodermis-Zellen erfolgen. Für *AtMRS2-10* konnte durch GFP-Fusion eine zelluläre Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt werden (Li et al. 2001), die an dieser Stelle mit einer Aufnahme des Magnesiums in den Symplasten gut vereinbar ist. Der symplastische Transport erfolgt über die Rhizodermis-Zellen, durch die Cortex-Zellen bis zum Casparyschen Streifen von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata. Der Casparysche Streifen der Endodermis stellt durch Einlagerungen von wachsartigen, hydrophoben Substanzen wie Lignin eine Barriere dar, die die weitere Diffusion von Ionen und ungeladenen Molekülen über den apoplastischen Weg blockiert oder einschränkt (Riederer und Schreiber 2001). Damit Magnesium über den Symplasten transportiert werden kann, wird ein Magnesiumtransporter benötigt, der die Aufnahme in die Zelle vermittelt. *AtMRS2-5* könnte zusammen mit *AtMRS2-10* diese Funktion übernehmen. Für beide Transporter wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen eine Lokalisation in der

Plasmamembran gezeigt (Alexandersson et al. 2004, Li et al. 2001). Bei der Aufnahme über den Apoplasten wird spätestens an der Endodermis ein Magnesiumtransporter benötigt, der den Transport über die Plasmamembran in das Cytoplasma und somit einen Weitertransport über die Durchlass-Zellen der Endodermis in den Zentralzylinder vermittelt. Die Aufnahme von Magnesium endet mit der Abscheidung in das Xylem, von hier aus erfolgt der Langstrecken-Transport im Wasser gelöster Ionen in die vegetativen Organe der Pflanze (Rengel 1990).

AtMRS2-3 zeigt eine, auf die Initialzellen der meristematischen Zone begrenzte Expression (Abbildung 3.0 3), also dem Gewebe, in dem die höchste Zellteilungsaktivität in der Primärwurzel vorliegt. Die Wurzel wächst ausgehend vom ruhenden Zentrum der meristematischen Zone in Richtung Wurzelspitze und es erfolgt eine Differenzierung der Wurzelzellen (Bowman 1994, Taiz und Zeiger 2002). In diesen Zellen besteht aufgrund einer entsprechend hohen Stoffwechsel- und Zellteilungsaktivität ein hoher Bedarf an Magnesium, da Magnesium Membranen stabilisiert und eine essentielle Funktion als Cofaktor für eine Vielzahl von Enzymen besitzt. Verfolgt man den Weg des Magnesiums weiter durch die Wurzel, dann wird dieses über den Zentralzylinder der Wurzel und das Leitgewebe des Hypocotyls in das vegetative Gewebe transportiert. Sowohl *AtMRS2-2* als auch *AtMRS2-3* werden im Zentralzylinder der Wurzel, im Leitgewebe des Hypocotyls und in den Adern der Kotyledonen exprimiert (Abbildung 3.0 3, Abbildung 3.0 6) und könnten somit den Weitertransport des Magnesiums über das vaskuläre Gewebe in die vegetativen Organe vermitteln. Dies würde auch erklären, dass bisher keine homozygoten T-DNA-Insertionslinien für *AtMRS2-3* vorliegen. Man könnte vermuten, dass aufgrund eines fehlenden oder defekten Weitertransports von Magnesium aus der Wurzel, Magnesium in der Wurzel akkumuliert und so im vegetativen Gewebe ein Magnesiummangel entsteht, oder dass es zu einer Störung bei der Zellteilung in der meristematischen Zone der Wurzel kommt, wodurch der Keimling eingeht.

Im vegetativem Gewebe, den Keim-, Stängel- und Rosettenblättern tritt eine Expression von *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* im Keimlingsstadium in den Keimblättern (Abbildung 3.0 4), den Primärblättern und später in den Folgeblättern (Abbildung 3.0 7) auf. Beide zeigen bei der Analyse der Promotor:GUS-Fusions-Pflanzen eine chloroplastidäre Lokalisation (Abbildung 3.0 7), die für *AtMRS2-11* auch schon durch GFP-Fusion gezeigt wurde (Drummond et al. 2006). Analysen von Transportern der Chloroplastenmembran identifizierten beide Magnesiumtransporter aufgrund von Sequenzanalysen als Transporter der

Chloroplastenmembran (Weber et al. 2005). In den Chloroplastenmembranen werden Magnesiumtransporter benötigt, da einige Enzyme der Licht- und der Dunkelreaktion durch Magnesium reguliert werden (Ettinger et al. 1999) (siehe Einleitung 1.1). Außerdem ist Magnesium das Zentralatom des Chlorophylls und wird somit im chlorophyllhaltigen Gewebe benötigt, die Chelatase und Dechelatase zum Einbau bzw. zur Freisetzung des Magnesiums werden ebenfalls durch die chloroplastidäre Magnesiumkonzentration reguliert (Fraústo da Silva und Williams 1991). An dieser Stelle könnten die beiden Transporter *AtMRS2-4* bzw. *AtMRS2-11* an der Aufnahme des Magnesiums über die Chloroplastenmembran beteiligt sein. *AtMRS2-4* zeigte im Blattquerschnitt außerdem eine starke Färbung im Bereich der Leitbündel (Abbildung 3.0 7) und im Spross eine Färbung im Phloem (Abbildung 3.0 6). Für *AtMRS2-4* wäre folglich auch eine Beteiligung am Rücktransport des Magnesiums aus den Blättern in die Pflanze unter Mangel bzw. bei seneszenten Blättern denkbar, da dieser über das Phloem erfolgt (Epstein und Bloom 2005). Der Transporter könnte also aufgrund seiner Expression an der Be- und Entladung des Phloems beteiligt sein. *AtMRS2-2* und *AtMRS2-5* zeigen eine Färbung im Bereich des Xylems und *AtMRS2-5* zusätzlich im angrenzenden Gewebe (Abbildung 3.0 6). *AtMRS2-5* wurde in der Analyse von Transportern in der Plasmamembran von vegetativem Gewebe identifiziert (Alexandersson et al. 2004). Hier wäre eine Beteiligung an der Be-/Entladung des Xylems denkbar. *AtMRS2-1* zeigt eine ubiquitäre Färbung in der Blattfläche (Abbildung 3.0 5, Abbildung 3.0 7), im Querschnitt konnte man eine Färbung des Palisaden- und Schwammparenchyms (Abbildung 3.0 5) beobachten. Möglicherweise ist *AtMRS2-1* der Transporter, der das Magnesium nach der Entladung des Xylems in die angrenzenden Zellen des Leitgewebes weiterleitet. Dieser Weitertransport kann, wie schon bei der Aufnahme in die Wurzel erläutert, auch apoplastisch über Zellzwischenräume und das Interzellulärsystem erfolgen, oder symplastisch von Zelle zu Zelle. Da für *AtMRS2-1* noch keine Erkenntnisse über die zelluläre Lokalisation vorliegen, sondern nur bekannt ist, dass dieser Transporter weder chloroplastidär noch mitochondrial lokalisiert ist, wäre es ein guter Kandidat für einen Magnesiumtransporter in der Plasmamembran (Schock 2000). Beide Transporter könnten eine Funktion bei der Aufnahme des Magnesiums in die Zelle über die Plasmamembran und somit in den Symplasten, wie auch schon für die Wurzel vermutet, besitzen.

Im Blütenstadium zeigen *AtMRS2-3* und *AtMRS2-10* eine Expression in den Antherenfilamenten (Abbildung 3.0 8). In den Antheren erfolgt die Pollengenese, die einen energetisch sehr aufwendigen Prozess darstellt und die höchste Mitochondriendichte aufweisen (Huang et

al. 1994). Magnesium tritt häufig als Komplex mit ATP auf und wird in hohem Maße in den Antheren benötigt (siehe Einleitung 1.1). Folglich wird ein Transporter benötigt, der den Transport des Magnesiums über die Antherenfilamente in die Antheren vermittelt. Da *AtMRS2-5* und *AtMRS2-7* eine Färbung in den Antheren zeigen (Abbildung 3.0 8), sind sie möglicherweise für den Transport verantwortlich. Auch für *AtMRS2-6* wurde entwicklungspezifisch eine auf die Pollenkörner in den Antheren begrenzte Färbung beobachtet (Abbildung 3.0 8). Analysen von *AtMRS2-6*-T-DNA-Insertionsmutanten durch die Gruppe von Drummond (persönliche Kommunikation) zeigen eine Sterilität der Pflanzen, was auf eine essentielle Funktion von *AtMRS2-6* an diesem Punkt der Entwicklung hinweist. Das in der Datenbank *Genevestigator* publizierte Expressionsmuster von *AtMRS2-6*, basierend auf Microarray-Daten (Zimmermann et al. 2004), bestätigten die auf die Pollen begrenzte Expression von *AtMRS2-6* der beobachteten GUS-Analysen (Abbildung 4.0 1). Bestätigt wird die pollenspezifische Expression zusätzlich durch pollenspezifische Elemente im Promotor von *AtMRS2-6*. Dieses Element (AAATGA) wurde ebenfalls bei dem Kupfer-Transporter COPT1 beschrieben, der auch in den Pollenkörnern exprimiert wird (Sancenón et al. 2004). Kupfer ist ein notwendiger Cofaktor der Cytochromoxidase in der Atmungskette und wird somit ebenfalls in Geweben mit hoher Mitochondriendichte, wie den Antheren benötigt. In Tabak und in den *Avp*-Genen (*Arabidopsis thaliana* vacuolar H⁺-pyrophosphatase, V-PPase) von *Arabidopsis thaliana* wurde ein „AAATGA“-Sequenzelement identifiziert, das für die pollenspezifische Lokalisation in Tabak bzw. bei den *Avp*-Genen verantwortlich ist (Mitsuda et al. 2001, Weterings et al. 1992). Dieses Element tritt viermal im Promotor von COPT1 auf (Sancenón et al. 2004) und ist ebenfalls an Position -401 im Promotor von *AtMRS2-6* vorhanden. Im Promotor von *AtMRS2-10* ist diese Sequenz nicht vorhanden. Die GUS-Färbung ist hier auch auf die Antherenfilamente begrenzt und tritt nicht in den Pollen auf. *AtMRS2-3* zeigt die Sequenz einmal an der Position -280, hier tritt die Färbung im Antherenfilament und im Bereich zwischen Antherenfilament und Anthere auf, aber nicht in den Pollen. Weitere Publikationen identifizierten *AtMRS2-6* ebenfalls als pollenspezifisch exprimierten Magnesiumtransporter und außerdem den von uns als Pseudogen bezeichneten Transporter *AtMRS2-9* (Bock et al. 2006). *AtMRS2-9* zeigte in den Promotor:GUS-Fusionen eine Färbung in den Pollen und in der meristematischen Zone in der Wurzel (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen zur Expression auf Transkriptionsebene erbrachten für *AtMRS2-9* in der PCR mit cDNA nur Bruchstücke. Das vollständige vorhergesagte PCR-Produkt konnte im Ökotyp Columbia nicht amplifiziert werden. In Landsberg ist *AtMRS2-9* kein Pseudogen (Li et al. 2001).

In den Adern der Schotenhülle zeigte *AtMRS2-1* eine Expression (Abbildung 3.0 8), was für eine Beteiligung am Transport in die Schote und die Samen spricht. *AtMRS2-4* und *AtMRS2-2* dagegen wurden in den Samenanlagen und in der Schote exprimiert (Abbildung 3.0 8). Auch Prozesse wie die Samenreifung benötigen viel Energie, in Form von ATP und Magnesium als Cofaktoren (siehe Einleitung 1.1).

4.1.1 Vergleich der Ergebnisse mit Microarray-Datenbanken

Vergleicht man nun die Ergebnisse der durch GUS-Färbung nachgewiesenen Promotoraktivität der verschiedenen Transportergene mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse über Microarray-Datenbanken (Genevestigator, *EFP*-Browser), dann zeigen sich auch hier in beiden Analysen für *AtMRS2-6* die gleichen Ergebnisse (Abbildung 4.0 1, unterer roter Rahmen). Es wurde in den Microarray-Analysen keine Expression in Wurzel, Keimblättern und Folgeblättern erhalten, dargestellt durch die weiße Farbe, dahingegen wurde eine Expression von *AtMRS2-6* in den Staubblättern nachgewiesen (dunkelblauer Kasten, Abbildung 4.0 1). Eine genaue Aufschlüsselung wurde in den Microarray-Analysen nicht durchgeführt. Durch die Promotor-GUS-Fusionen von *AtMRS2-6* konnte jedoch eine spezifische Expression in den Pollen im Staubblatt nachgewiesen werden. Weitere Übereinstimmungen konnten für *AtMRS2-11* gefunden werden (Abbildung 4.0 1, oberer roter Rahmen). Hier wurde sowohl durch den Reportergennachweis, als auch durch die Microarray-Analyse eine Expression bzw. Promotoraktivität in den Kotyledonen des Keimlings, den Folgeblättern und im apikalen Sprossmeristem detektiert (blauer Kasten, Abbildung 4.0 1, oberer roter Rahmen). Übereinstimmend wurde ebenfalls keine Expression in Wurzeln und den Staubblättern beobachtet (Abbildung 4.0 1, weiße Kästen im oberen roten Rahmen). Die Promotoraktivität von *AtMRS2-2* wurde durch die GUS-Färbung in den Pollen, von *AtMRS2-3* und *AtMRS2-10* in den Antherenfilamenten nachgewiesen, *AtMRS2-2*, 2-3 und 2-10 zeigen in den Microarray-Analysen übereinstimmende Ergebnisse (blauer Kasten Abbildung 4.0 1) in den Staubblättern. Auch bei diesen Genen waren die Ergebnisse über den Nachweis der Promotoraktivität durch die Reportergenfusion spezifischer und konnten einzelnen Geweben zugeordnet werden. Kritisch zu betrachten sind an dieser Stelle die Ergebnisse zur Wurzelexpression der Microarray-Analysen, da für *AtMRS2-9*, einem der beiden Pseudogene, im Vergleich zu den anderen wurzelexprimierten Mitgliedern der *AtMRS2*-Genfamilie eine sehr starke Expression in der Wurzel vorhergesagt wurde. Die Ergebnisse der GUS-Färbung zeigten hier nur eine Expression in der Wurzelspitze. *AtMRS2-5* ist nicht in der Datenbank vorhanden. Die für *AtMRS2-4* detektierte Expression ist ebenfalls nur sehr schwach und nicht sehr eindeutig. Für *AtMRS2-7*, das im Keimlingsstadium nach den GUS-Analysen nur eine Expression in der Wurzel und den Stomata des Hypocotyls zeigte, wird auch in dieser Analyse im Keimling in der Wurzel und dem Hypocotyl vorhergesagt, nicht aber in den Kotyledonen (Abbildung 4.0 1), was auch mit den Ergebnissen der Promotor:GUS-Analysen übereinstimmt.

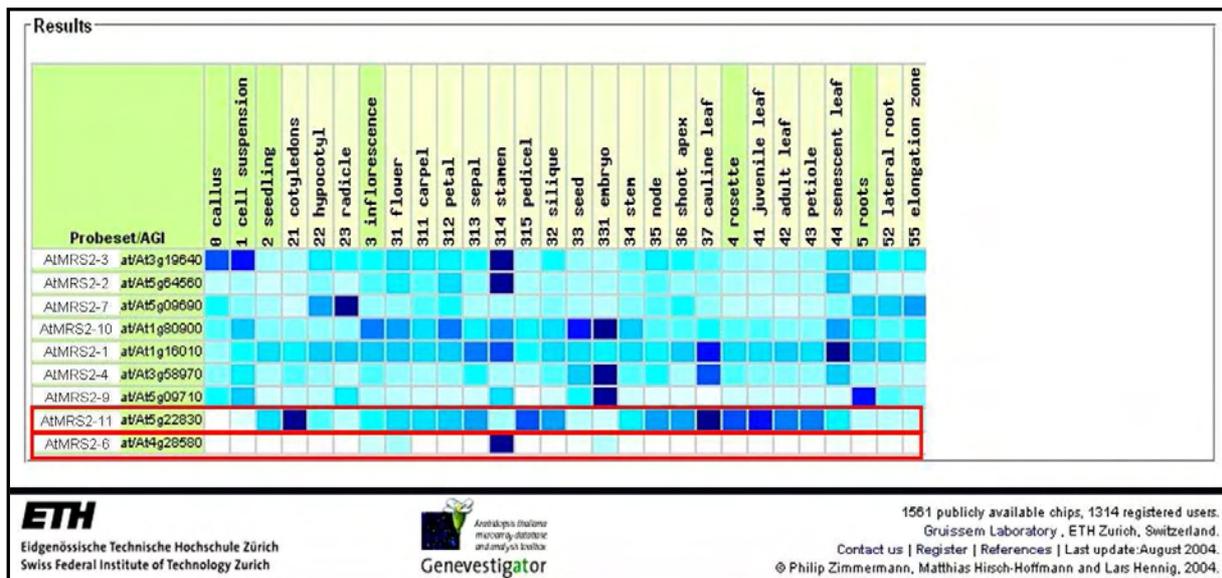


Abbildung 4.0 1: Genevestigator „plant organs“ [verändert nach Metanalyser *plant organs* (Zimmermann et al. 2004)]

Auf der Basis von Microarray-Daten wurde die Expression der Magnesiumtransporter in den verschiedenen Pflanzenorganen untersucht. Der Blauton der Kästen ist der Signalstärke angepasst: Dunkelblau zeigt die stärkste Expression des Gens an, weiß steht für keine detektierte Expression. Als Beispiele wurden die Ergebnisse für *AtMRS2-6* und *AtMRS2-11* mit einem roten Rahmen markiert.

Kürzlich wurde eine Datenbank zu Wurzelexpression, in der auch einige Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie auftreten, im Internet veröffentlicht (Birnbaum et al. 2003). Mittlerweile wurde diese Datenbank im Internet auch auf die Expression in Spross und Blüte erweitert. Als Beispiel wurde das Expressionsmuster der beiden Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie *AtMRS2-1* und *AtMRS2-6* mit den Microarray-Daten der Datenbank von Birnbaum, „eFP-Browser“, verglichen. Die Abbildung befindet sich im Anhang. A zeigt, dargestellt durch eine orange bis rote Farbe, die Expression von *AtMRS2-1* in der Wurzel. Wie auch schon bei der Analyse der GUS-Färbung wird auch hier keine, auf verschiedene Gewebe differenzierte Expression in der Wurzel festgestellt (Abbildung 4.0 2 A, B). Diese ubiquitäre Expression wird in dieser Datenbank auch für die Folgeblätter und die Blüte postuliert (Abbildung 4.0 2A bzw. B). Alle drei Analysen, GUS-Analysen, Genevestigator und der eFP-Browser in Abbildung 4.0 3 C zeigen eine entwicklungspezifische Expression in der Blüte für *AtMRS2-6*. Keine Expression wurde in der Wurzel (Abbildung 4.0 2 C) (gelb), nur ein leichtes Signal in den Folgeblättern (Abbildung 4.0 2 D, orange) und ein deutliches Signal in der Blüte (Anhang D), in der frühen Pollenentwicklung (Abbildung 4.0 2 C) detektiert.

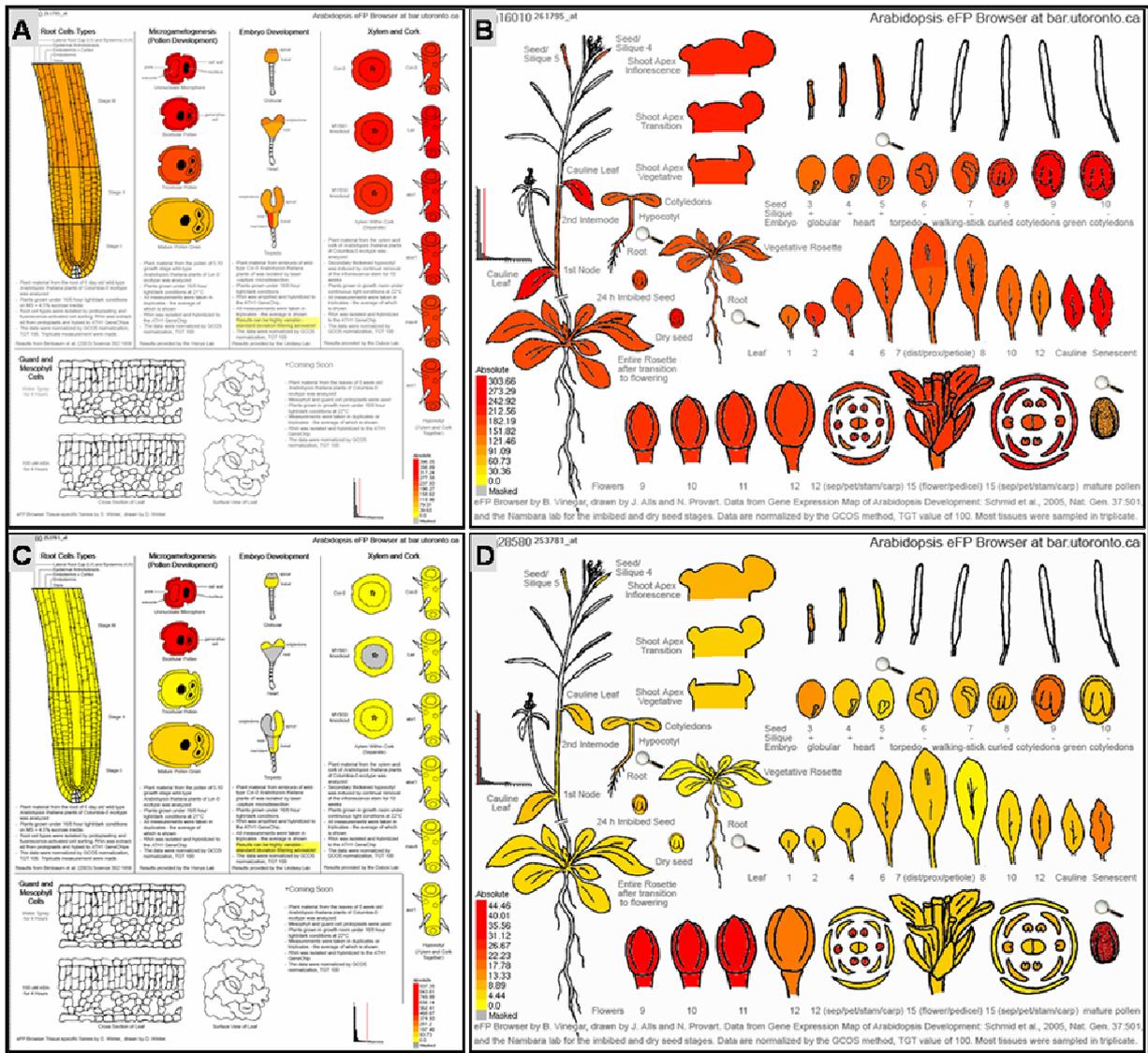


Abbildung 4.0 2: eFP Browser, „plant organs“ [verändert nach (Birnbaum et al. 2003)

Auf der Basis von Microarray-Daten wurde die Expression der Magnesiumtransporter in den verschiedenen Pflanzenorganen untersucht. Der Rotton ist der Signalstärke angepasst: Rot zeigt die stärkste Expression des Gens an, gelb steht für keine detektierte Expression. Als Beispiele wurden die Ergebnisse für *AtMRS2-1* (A, B) und *AtMRS2-6* (C, D) ausgewählt.

4.2 Einfluss von Licht auf die Expression von *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*

Für den Transporter *AtMRS2-11* sind eine chloroplastidäre Lokalisation, siehe GUS-Daten 3.1.1, und Bindestellen für licht-regulierte Transkriptionsfaktoren nachgewiesen worden (Drummond et al. 2006, Higo et al. 1999). Es sollte hier untersucht werden, ob Licht die Expression von *AtMRS2-11* beeinflusst (Abbildung 3.0 9). Da auch *AtMRS2-4* bei der Analyse der Expression durch Promotor:GUS-Fusions-Pflanzen eine Färbung im Chloroplasten zeigte, wurde dieser Transporter ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen. Bekannt ist bisher, dass in etiolierten Keimlingen keine Chloroplasten ausgebildet werden (Bowman 1994, Taiz und Zeiger 2002). Somit dürften auch *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* nicht im etiolierten Keimling exprimiert werden. Etiolierte Keimlinge enthalten Etioplasten mit prolamellaren Körpern und Protochlorophyll anstatt Chloroplasten mit Chlorophyll und Thylakoiden. Bei Belichtung werden die prolamellaren Körper innerhalb weniger Minuten in das Thylakoidsystem umgewandelt, aus dem Protochlorophyll entsteht Chlorophyll und es entwickelt sich schließlich ein vollständig ausdifferenzierter Chloroplast (Bowman 1994, Taiz und Zeiger 2002) mit Magnesiumtransportern. Die bekannten lichtregulierten Gene werden gar nicht, oder nur auf einem sehr geringen Niveau exprimiert (Chory et al. 1989). Man könnte hier vermuten, dass es ebenfalls im etiolierten Keimling, nur auf einem geringen Niveau exprimiert wird, da *AtMRS2-11* ebenfalls in der Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert ist (Drummond et al. 2006) und erst bei Belichtung die Expression induziert wird. Das vorhandene, von Drummond et al. erläuterte chloroplastidäre Signalpeptid, tritt bei vielen Proteinen auf, für die eine Lokalisation in der Hüllmembran des Chloroplasten gezeigt wurde (Ferro et al. 2003, Schleiff und Soll 2000). Drummond et al. konnten in den Analysen zur Induktion keine Unterschiede beobachten. Dies könnte aber auch daran liegen, dass sie die mRNA für *AtMRS2-11* erst nach zwei-stündiger Inkubation im Licht, also zu einem sehr späten Zeitpunkt (Drummond et al. 2006) isolierten und *AtMRS2-11* bereits induziert war. Für *AtMRS2-4* konnte in den GUS-Analysen keine Induktion beobachtet werden (Abbildung 3.0 9). Die Analysen von T-DNA-Insertionsmutanten und von RNAi-Pflanzen der *AtMRS2-4*-Konstrukte (Gebert 2006 unveröffentlichte Daten), waren bisher erfolglos. Auch RNAi-Linien waren nicht überlebensfähig (Lee 2005). Hier scheint *AtMRS2-4* also eine so essentielle Funktion in der Pflanze zu besitzen, dass Mutanten nicht überlebensfähig sind. Dieser Transporter könnte hier vielleicht als basaler Transporter für die Aufnahme des Magnesiums in der Chloroplastenmembran vorliegen. Durch das Fehlen eines der beiden Transporter könnte ein Magnesiummangel in den Chloroplasten auftreten, wodurch essentielle Stoffwechselreaktionen stark beeinträchtigt werden könnten. Mittlerweile ist ein

Einfluss von Licht auf ca. 6 % der Gene von *Arabidopsis thaliana* bekannt (Harmer et al. 2000, Taiz und Zeiger 2002). Dazu gehören unter anderem die LHCB-Gene (Krupa et al. 1988), die für die Antennenkomplexe des Photosystems II codieren. Sie werden durch eine vom Phytochrom (P_R) ausgelöste Signalkaskade induziert, wie auch eine Vielzahl von Enzymen des Stoffwechsels und auch Ionenkanäle. In Protoplasten wurden durch Phytochrom regulierte Kaliumkanäle identifiziert, die an den durch Tugoränderungen hervorgerufenen Blattbewegungen der Mimose beteiligt sind (Kim et al. 1993, Taiz und Zeiger 2002). Als weiteres bewirkt es morphologische Veränderungen wie Wachstum und Entwicklung (Puente et al. 1996, Taiz und Zeiger 2002). *AtMRS2-11* könnte ebenfalls zu diesen Genen gehören, die durch das Phytochrom reguliert werden.

AtMRS2-11 zeigt außerdem eine Expression in den Schließzellen der Stomata (Abbildung 3.0 7). Für Stomata ist eine Öffnung in Abhängigkeit von Licht im kurzwelligen, blauen Bereich bekannt. Die Öffnung ist reversibel, sie erfolgt aufgrund von osmotischen Veränderungen. Untersuchungen in *Vicia faba* haben gezeigt, dass es eine lichtabhängige H^+ -ATPase in der Plasmamembran der Schließzellen gibt. Durch den Protonengradient wird eine aktive Aufnahme von Kalium- und Chlorid-Ionen angetrieben, Stärke wird hydrolysiert und Saccharose und Malat gebildet. Die Kaliumkanäle SKT1 und KST1 in der Kartoffel und KAT1 und KAT2 in *Arabidopsis thaliana* (Nakamura et al. 1995, Zimmermann et al. 2001) werden spezifisch in den Stomata exprimiert. Sie vermitteln die Aufnahme von Kalium in die Schließzellen, wodurch es zu einer Öffnung der Stomata in der Kartoffel und in *Arabidopsis* kommt. Analysen des Promotors zeigten ein für die Stomata-spezifische Expression verantwortliches Sequenzmotiv „TAAAG“ (Plesch et al. 2000, Plesch et al. 2001). Eine Analyse der Promotors von *AtMRS2-11* mit dem Programm „PLACE“ bestätigten das TAAAG-Element, sowie Bindestellen für licht-regulierte Transkriptionsfaktoren (Higo et al. 1999). Im Promotor von *AtMRS2-11* tritt das Motiv „TAAAG“ insgesamt sechsmal an den Positionen -62, -422, -432, -1278, -1629 und -1802 auf (siehe Abbildung 4.0 3).

4.3 Einfluss von Schwermetallen auf das Expressionsmuster der *AtMRS2*-Genfamilie

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob die Veränderung der Wachstumsbedingungen einen Einfluss auf die Expression zeigt. Dazu gehörten verschiedene Schwermetalle in subletalen Konzentrationen, für die ein Transport durch das bakterielle, homologe CorA-Protein bekannt ist. Experimente zum Transport in Hefe zeigten, dass *AtMRS2-1* und *AtMRS2-10* auch Cadmium transportieren können (Li et al. 2001). Wie schon in der Einleitung (1.2.4) erwähnt, stellen Schwermetalle wie Aluminium und Cadmium, sowie die Spurenelemente Kobalt, Kupfer und Nickel in zu hohen Konzentrationen ein Problem für die Pflanze dar. Aufgrund ähnlicher Eigenschaften, wie Ladung, Ionenradius oder Größe der Hydrathülle, konkurrieren sie um die Aufnahme in der Pflanze mit Ionen wie Calcium, Magnesium oder Eisen. Dies führt meist zu Störungen im Stoffwechsel bzw. kann, wie im Fall von Magnesium, einen Mangel in der Pflanze hervorrufen (di Toppi und Gabbrielli 1999, Seregin und Ivanov 2001).

Cadmium gehört zu den klassischen Schwermetallen. Es wird für die Pflanze bei pH-Werten $<5,0$ verfügbar, da Cd^{2+} leicht über die Wurzel aufgenommen und durch die Membran in die Zelle transportiert werden kann. Dort bindet es aufgrund seiner hohen Affinität zu Schwefel-Gruppen an Proteine. Cadmium wird in den Wurzelhaaren, der Rhizodermis und im Cortex akkumuliert. Untersuchungen zeigten eine Hemmung von Aufnahme und Transport von Magnesium durch Cadmium (Yang et al. 1996). Cadmium kompetitiert außerdem mit anderen divalenten Kationen, hauptsächlich Calcium, um die Aufnahme. Toxizitäts-Symptome treten relativ unspezifisch in Form von Chlorosen und Nekrosen auf, da Cadmium allgemein die Photosyntheserate senkt, die Atmung und Transpiration, sowie die Aktivität von Ribonukleasen, Peroxidasen und hydrolytischen Enzymen aber steigert (Stohs et al. 2000).

AtMRS2-2 zeigt eine schwächere Färbung in der meristematischen Zone unter Cadmiumstress (Abbildung 3.0 10). Im Gegensatz dazu zeigt *AtMRS2-10* eine stärkere Färbung in der Rhizodermis und den Wurzelhaaren (Abbildung 3.0 14). Hier könnte man vermuten, dass die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie, mit einer unterschiedlichen Affinität, neben Magnesium auch Cadmium transportieren können. Somit wäre es möglich, dass ein Transporter wie *AtMRS2-2* schwächer exprimiert wird um so eine Cadmiumaufnahme zu verhindern oder zu reduzieren. Die Expression von einem anderen Mitglied, wie *AtMRS2-10*,

das spezifischer Magnesium transportiert, könnte induziert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Induktion von einzelnen Transportern, da Cadmium die Aufnahme von Magnesium inhibiert und somit ein Magnesiummangel auftritt (Seregin und Ivanov 1997, Seregin und Ivanov 1998, Seregin und Ivanov 2001). Im chlorophyllhaltigen Gewebe verändert Cadmium die Struktur und Entwicklung der Chloroplasten und inhibiert so die Chlorophyllsynthese (Krupa et al. 1988). Es bilden sich Chlorosen, da für die Chlorophyllsynthese auch ein Mangel an Magnesium besteht (Stobart et al. 1985). Aufgrund der inhibitorischen Wirkung auf die Entwicklung des Chloroplasten hätte man bei den Analysen einen Einfluss von Cadmium auf die GUS-Färbung bei den chloroplastidären *AtMRS2-4* bzw. *AtMRS2-11* erwartet. Hier besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass beide spezifischer Ionen transportieren und vielleicht am Transport des Cadmiums im vegetativen Gewebe beteiligt sind. Hier könnten auch ganz andere Transporter eine Rolle spielen. Bisher ist ein Einfluss von Cadmium auf Metalltransporter der *AtNramp*-Genfamilie bekannt, die Metalle wie Eisen, Mangan und Cadmium transportieren. Diese Transporter weisen bei einer Überexpression eine höhere Sensitivität der Wurzeln gegenüber Cadmium auf und sorgen gleichzeitig für eine Akkumulation von Eisen, während T-DNA-Insertionsmutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber Cadmium zeigen (Thomine et al. 2000). Ein weiteres Beispiel für wurzelexprimierte Metalltransporter sind IRT1 und IRT2, die beide den Transport von Eisen vermitteln. Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass der Eisentransporter IRT1 eine Sensitivität gegenüber Cadmium und Mangan aufweist, im Gegensatz dazu transportiert IRT2 kein Cadmium und kein Mangan, sondern nur Eisen (Vert et al. 2001, Vert et al. 2002).

Unter Kupferstress zeigen *AtMRS2-4*Promotor:GUS-Keimlinge eine stark reduzierte, auf das vaskuläre Gewebe begrenzte, GUS-Färbung in den Keimblättern (Abbildung 3.0 11). Kupfer könnte hier spezifisch den Promotor inhibieren, so dass die chloroplastidäre Expression von *AtMRS2-4* stark geschwächt wird. Kupfer verursacht in toxischen Konzentrationen Chlorosen, da es die Thylakoidmembranen schädigt (Sandmann und Böger 1983). Da *AtMRS2-4* im Chloroplasten lokalisiert ist, könnte man hier einen Zusammenhang zwischen der Degradation der Membranstruktur und den dort lokalisierten Membranproteinen vermuten. Unter toxischen Bedingungen könnte *AtMRS2-4* als Transporter benötigt werden, der den Rücktransport von Magnesium aus den absterbenden Blättern in den Spross vermittelt, da ja für *AtMRS2-4* eine Expression im Phloem des Sprosses (Abbildung 3.0 6) beobachtet wurde und der Rücktransport von Ionen wie Magnesium über das Phloem erfolgt (Epstein und Bloom 2005). Ein ähnliches Muster der GUS-Färbung im vaskulären Gewebe, den Blüten und

den Schoten zeigt auch der Saccharose-Transporter SUC2 (Truernit und Sauer 1995). Untersuchungen haben gezeigt, dass Kupferstress häufig einen Eisenmangel in der Pflanze auslöst. Für den Eisentransporter IRT1, der bereits im Abschnitt mit Cadmiumstress genannt wurde, ist eine Induktion unter Kupferstress bekannt. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von *AtMRS2-4* an der Be-/ Entladung des Phloems in Bezug auf das Expressionsmuster unter Kupferstress liegt darin, dass im Phloem aufgrund des alkalischen pH-Wertes Schwermetalle wie Kupfer nicht oder nur sehr gering löslich sind und somit nicht über das Phloem transportiert werden. Aus diesem Grund bleibt vielleicht die Expression von *AtMRS2-4* im vaskulären Gewebe der Keimblätter unter Schwermetallstress erhalten. Schwermetalle können im Phloem nur als Komplex mit organischen Säuren, wie Malat, oder Chelatbildnern transportiert werden (Epstein und Bloom 2005, Hall 2002, Miranda et al. 2002). Zusätzlich könnte durch die Inhibition des *AtMRS2-4*-Transporters in den Blättern gleichzeitig das Signal Magnesiummangel auslösen und somit die Expression von anderen Mitgliedern der Genfamilie wie *AtMRS2-5* induzieren. *AtMRS2-5* zeigt im Vergleich zur Expression unter Standardbedingungen eine stärkere GUS-Färbung unter Kupferstress (Abbildung 3.0 11).

Bei *AtMRS2-10* konnte unter Aluminiumstress eine geringere Zahl an Seitenwurzeln beobachtet werden (Abbildung 3.0 15). In den vorhandenen Seitenwurzeln trat eine reduzierte GUS-Färbung unter gleichzeitigem Aluminiumstress und Magnesiummangel, im Vergleich zum Versuchsansatz mit Aluminiumstress ohne Magnesiummangel, auf. Aluminium scheint somit die Expression von *AtMRS2-10* negativ zu beeinflussen (Abbildung 3.0 14). In den Blättern zeigte sich unter Aluminiumstress auch eine stark reduzierte Färbung bei Promotor:GUS-Keimlingen für die chloroplastidär lokalisierten *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11*-Transporter (Abbildung 3.0 16). Die Färbung verschwand fast vollständig unter Aluminiumstress und gleichzeitig auftretendem Magnesiummangel (Abbildung 3.0 16). Die bekannte Hemmung der Photosynthese durch Aluminium-Ionen könnte zu einer schwächeren Expression von *AtMRS2-11* unter Aluminiumstress führen (Amberger 1996, Scheffer 2002). Untersuchungen in Tabak zeigten bei einer Überexpression von *AtMRS2-10* eine erhöhte Aluminiumresistenz. (Deng et al. 2006).

Die beobachtete Expression von *AtMRS2-8* in der gesamten Wurzel unter Magnesiummangel (Abbildung 3.0 13) deutet auf eine Induktion von *AtMRS2-8* hin. Liegt ein Magnesiummangel vor, wird ein zusätzlicher Transporter benötigt, der das in geringen Konzentrationen vorhandene Magnesium effizienter aufnimmt. Für den Kaliumtransporter HKT1 wurde z.B.

eine Induktion unter Kaliummangel beschrieben. Dieser Transporter wird bei dann im Bereich des Cortex der Wurzel und in den, an das vaskuläre Gewebe angrenzenden, Zellen exprimiert (Epstein und Bloom 2005, Schachtman und Schroeder 1994). *AtMRS2-8* zeigt in der Wurzel außer unter Magnesiummangel auch eine Expression unter Schwermetallstress (Abbildung 3.0 13). Dieser Induktionseffekt könnte bei *AtMRS2-8* auch durch Schwermetallstress verursacht werden, da es aufgrund von ähnlichen chemischen Eigenschaften zur Kompetition zwischen Magnesium und Ionen mit gleicher Ladung und ähnlicher Größe der Hydrathülle kommen kann. Durch diese Ionen werden Bindestellen für Magnesium blockiert und somit eine Aufnahme verhindert. Schließlich entsteht ein Mangel an Magnesium in der Pflanze (Amberger 1996, di Toppi und Gabbrielli 1999, MacDiarmid und Gardner 1998, Scheffer 2002). Problematisch ist hier die Tatsache, dass *AtMRS2-8* im Ökotypen *Columbia* ein Pseudogen ist. Vergleicht man die Sequenz von *AtMRS2-8* mit der Sequenz des funktionalen Gens im Ökotypen *Landsberg erecta*, dann findet man eine Insertion. Das Leseraster verschiebt sich und es entsteht ein Stopcodon. Das entstehende Protein besitzt keine Transmembrandomänen und kein GMN-Motiv und ist somit als Transporter nicht funktional. *AtMRS2-7*, *2-8* und *2-9* liegen eng auf dem Genom von *Arabidopsis thaliana* zusammen und sind eng miteinander verwandt (Knoop et al. 2005). Schwermetalle beeinflussten auch die Promotoraktivität von *AtMRS2-7* und *AtMR2-8*. *AtMRS2-9* wurde nicht untersucht, da es im Ökotypen *Columbia* und auch im Ökotypen *Landsberg* nicht funktional ist. Das einzige funktionale Gen dieser Gruppe, das noch übrig ist, ist der Transporter *AtMRS2-7*. Eine T-DNA-Insertionsmutante von *AtMRS2-7* zeigt ein reduziertes Wachstum unter Magnesiummangel (M. Gebert, 2006). Es wäre interessant zu sehen, ob dieser Phänotyp auch im Ökotypen *Landsberg erecta* auftritt, da dort *AtMRS2-8* funktional ist und *AtMRS2-7* ersetzen könnte.

Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Schwermetallen könnte man vielleicht durch Unterschiede in der Sequenz zwischen den einzelnen Gruppen erklären. Abschließend bleibt unklar, in welcher Form Schwermetalle die Magnesiumkanäle beeinflussen. Neuere Analysen zum Transport durch CorA in *Salmonella* zeigten, dass aufgrund der Struktur Ionen mit ähnlichen Eigenschaften wie Magnesium zunächst durch die Pore des Kanals aufgenommen werden. Die Ionenselektivität des Kanals setzt erst dann ein, wenn der eigentliche Transport durch die „Trichter“-Struktur erfolgt. Somit blockieren Schwermetalle den Kanal in dem sie ihn verstopfen. Magnesium kann nicht mehr in den Kanal gelangen und dadurch auch nicht mehr transportiert werden (Maguire 2006). Diese Möglichkeit der Blockade besteht ebenfalls

für die AtMRS2-Proteine. Es wurde noch nicht untersucht, ob die Schwermetalle transportiert werden oder ob nur eine Blockade vorliegt, wodurch schließlich ein Magnesiummangel entsteht.

4.4 Magnesiumtransporter und Verletzungsinduktion

In Geweben mit erhöhter Enzymaktivität, erwartet man einen erhöhten Bedarf an Magnesium, da es einen wichtigen Cofaktor im Komplex mit ATP für eine Vielzahl zellulärer Enzyme darstellt. Hierzu wurden Rosettenblätter und Stängelblätter verletzt und nach mehrstündiger Inkubation die Expression der Magnesiumtransporter mittels GUS-Färbung untersucht. Bei Verwundung kann die Pflanze Abwehrmechanismen induzieren. Hierbei wird die Synthese von Sekundärmetaboliten und Proteinen, die inhibitorisch auf den Stoffwechsel des Angreifers wirken, induziert. Diese Induktion erfolgt durch Jasmonsäure, die als Signalstoff bei Verletzung eine Signalkaskade aktiviert. Ein zweiter Abwehrmechanismus ist die sogenannte systemische Abwehr, hierbei wird bei einer Verletzung das Signalmolekül Systemin aus Phloemzellen freigesetzt und bindet an den LRR-Rezeptor in der Plasmamembran von angrenzenden Geleitzellen. Dort wird eine Signalkaskade aktiviert, wodurch schließlich ebenfalls die Biosynthese von Jasmonsäure erfolgt. Jasmonsäure aktiviert dann die Expression von Zielgenen in der verletzten Zelle im Mesophyll. Zusätzlich müssen in verletzten Geweben die Membranen der umliegenden Zellen stabilisiert werden. Es liegt außerdem eine erhöhte Zellteilungs- und Stoffwechselaktivität vor, da die Verwundungsstelle repariert werden muss (Taiz und Zeiger 2002). Es konnte hier jedoch nur für *AtMRS2-1* ein Unterschied der Promotoraktivität im Vergleich zwischen unverletzten, verletzten und sofort gefärbten bzw. verletzten und nach mehrstündiger Inkubation gefärbten Stängelblättern beobachtet werden (Abbildung 3.0 17).

4.5 Analysen des Promotors auf cis-aktive Elemente

Die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie wiesen zum Teil sehr spezifische Expressionsmuster auf. Untersuchungen zeigten z.T. einen Einfluss von Schwermetallen, wie Aluminium auf *AtMRS2-10* (Abbildung 3.0 15), Nickel auf *AtMRS2-2* (Abbildung 3.0 10), und einen Einfluss von Licht auf die Expression von *AtMRS2-11* (Abbildung 3.0 9). Abschließend soll hier analysiert werden, ob Elemente im Promotor auftreten, für die ein Zusammenhang mit der gewebe-spezifischen Expression, oder ein Einfluss von exogenen Faktoren wie Licht und Schwermetallen bekannt ist. Abbildung 4.03 zeigt eine Übersicht über einige vorhandene Cis-active Elemente in den für die Promotor:GUS-Fusionen verwendeten 5' Bereichen des jeweiligen *AtMRS2*-Gens.

AtMRS2-6 zeigt in Übereinstimmung mit der pollenspezifischen Expression (Abbildung 3.0 8) eine Vielzahl von Sequenzmotiven, bezeichnet mit G, H, L und M, für die eine Beteiligung an den gewebespezifischen Expressionen in den Pollen bekannt ist. Das häufige Auftreten einiger dieser Motive bei dem eindeutig nicht in den Pollen exprimierten *AtMRS2-11* Protein könnte auch auf Bindung von Transkriptionsfaktoren, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind, hinweisen. Zusätzlich treten spezifisch bei *AtMRS2-11* und *AtMRS2-7*, die beide eine Expression in den Stomata zeigten auch ein Sequenzmotiv auf, das an einer Stomata-spezifischen Expression beteiligt ist. Sequenzmotive für eine Expression in Trichomen treten nur bei *AtMRS2-1*, *AtMRS2-5* und *AtMRS2-10* auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen der GUS-Expression überein. *AtMRS2-1*, das ein relativ unspezifisches Expressionsmuster zeigte, weist ebenfalls nur sehr wenige regulatorische Sequenzmotive im Promotorbereich auf. Sequenzmotive, die auf eine Lichtregulation hinweisen, wurden für *AtMRS2-11* gefunden (Drummond et al. 2006, Higo et al. 1999), dort allerdings nicht genauer beschrieben. Die unter Lichtregulation aufgeführten Sequenzmotive aus der Gruppe „G-Box like elements“ wurden bei *AtMRS2-11* nicht gefunden, dafür bei einigen anderen Mitgliedern der Genfamilie wie *AtMRS2-2*, 2-3, 2-5, 2-6, 2-7 und 2-8, die alle eine Expression in den Pollen zeigten. Diese Motive könnten auch durch Licht als Signal für die Pflanze zur Umstellung des Wachstums auf reproduktives Wachstum, Blütenbildung und Pollengenesse reguliert werden.

Die vorhandenen Motive, für die eine Beteiligung an der Reaktion auf Zucker gezeigt wurde (Pyridimidin- und Amy-Box), treten häufig bei den in den Pollen exprimierten *AtMRS2*-Transportern auf. Bei dem energetisch aufwendigen Prozess der Pollengenesse könnte Zucker die Expression induzieren. Allerdings tritt das Motiv auch bei *AtMRS2-4* auf, das unter

anderem im Phloem exprimiert wird. Transporter für Zucker, wie der Saccharosetransporter zeigen ebenfalls eine Expression im Phloem (Truernit und Sauer 1995).

Auffällig ist das häufige Auftreten des mit „N“ bezeichneten Motivs, das zu den *Metal responsive elements* (MRE) gehört. Ein negativer Einfluss von Schwermetallen wurde besonders bei *AtMRS2-2*, *2-4*, *2-5*, *2-7*, *2-10* und *2-11*, sowie eine Induktion der Expression von *AtMRS2-8* beobachtet. Hierbei ist auch auffällig, dass bei *AtMRS2-8* das Motiv nur einmal auftritt, aber unter Magnesiummangel und durch Schwermetalle hervorgerufenem Magnesiummangel eine erhöhte Expression vorliegt. Obwohl bei *AtMRS2-3* das Motiv am häufigsten auftritt, ist ein Einfluss auf das Expressionsmuster nicht erkennbar.

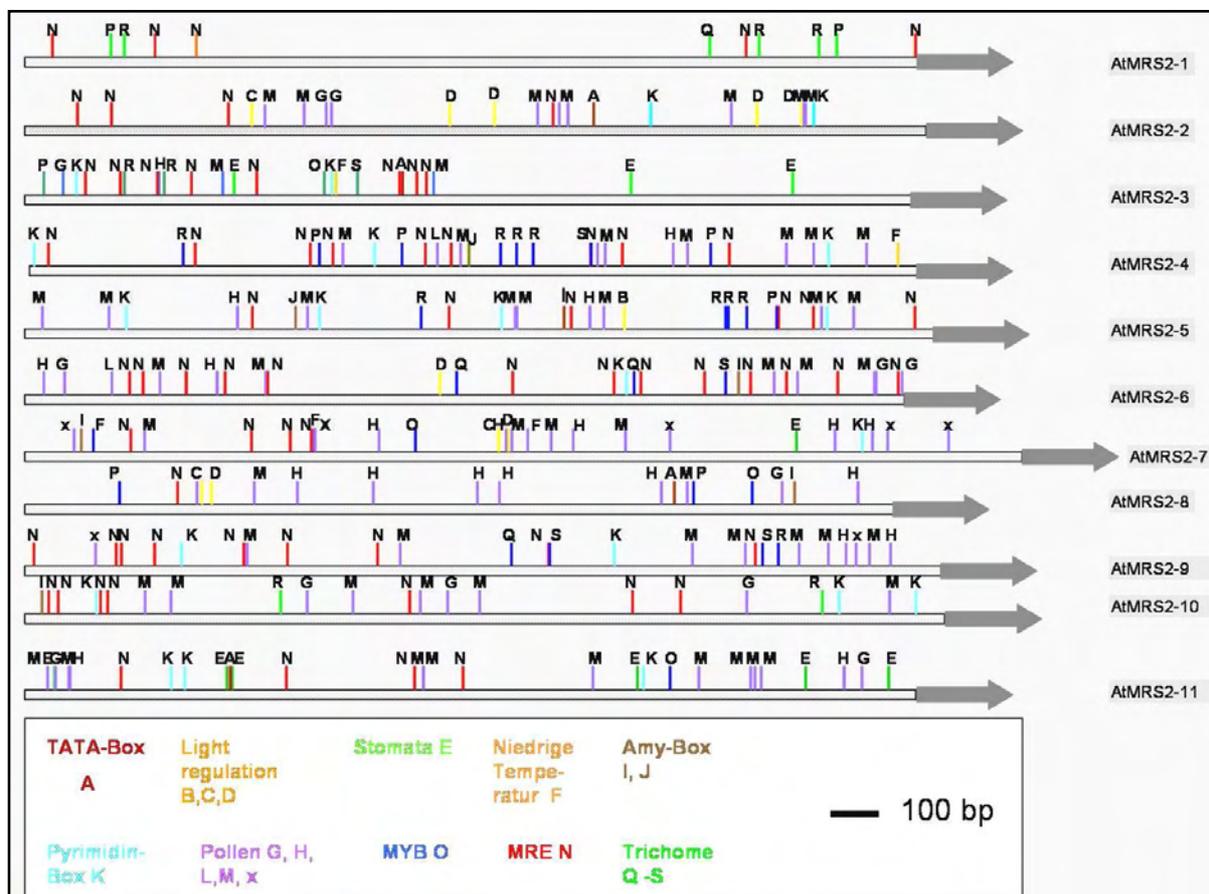


Abbildung 4.0 3: Graphische Darstellung der Cis-aktiven Sequenzen im 5'-Bereich stromaufwärts des ersten Exons für die einzelnen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie

Das erste Exon ist jeweils als grauer Pfeil dargestellt, der „Promotor-Bereich“ als hellgrauer Kasten. Die Position der auftretenden Sequenzmotive ist durch einen Strich mit Buchstaben gekennzeichnet. Die ausführliche Legende mit Referenzen liegt in Tabelle 4. 1 vor. Die einzelnen Sequenzen für die regulatorischen Elemente wurden mit dem Programm BioEdit in den Promotoren der einzelnen *AtMRS2*-Gene gesucht.

Tabelle 4. 1 zeigt die einzelnen dargestellten Sequenzmotive mit Funktion und Literaturangaben.

Tabelle 4. 1 Analyse der stromaufwärtsliegenden Sequenzen auf cis-aktive Elemente, Legende zu Abb. 4.03

	Sequenz	Bezeichnung	Funktion	Referenz
A	TATATAA	TATA-Box consensus	Transkriptionsstart	(Lü et al. 2006)
B	CACGTG	Lichtregulation	Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren	(Schindler et al. 1992)
C	TGACGTGGT	G-Box-like element	Light responsive element	(Schindler et al. 1992)
D	TACGTG	G-Box related element	Light responsive element	(Puente et al. 1996)
E	T(A)AAAG	cis-aktives Element	Stomata spezifische Expression	(Plesch et al. 2000, Plesch et al. 2001)
F	GCGAC	GCGAC-Box	niedrige Temperaturen	(Lü et al. 2006)
G	AGTCA	Q-ähnliches Element, Dikotyle	Regulation der pollenspezifischen Expression	(Mitsuda et al. 2001)
H	AAATGA	cis-aktives Element Tabak	Regulation der pollenspezifischen Expression	(Weterings et al. 1992)
I	TAACAAA	Amy-Box I	Anwort auf Zucker	(Mitsuda et al. 2001)
J	TATCCAT	Amy-Box II	Anwort auf Zucker	(Mitsuda et al. 2001)
K	TCTTTT	Pyrimidin-Box	Anwort auf Zucker	(Mitsuda et al. 2001)
L	GGTTAA	PBI-Motiv	pollenspezifische Expression	(Bate und Twell 1998)
M	AGAAA	Domain C	pollenspezifische Expression	(Bate und Twell 1998)
N	TGCA	MRE: Metal responsive element	Anwort auf Schwermetalle wie Kupfer	(Fordham-Skelton et al. 1997, Lü et al. 2006)
O	CAGTTG	MYB-Motiv	Trichom/Wurzelhaare, Entwicklung, Stress	(Wang et al. 2002)
P	TAACTG	Myb like recognition sites	Trichom/Wurzelhaare, Entwicklung, Stress	(Wang et al. 2002)
Q	CTGTTA	Myb like recognition sites	Trichom/Wurzelhaare, Entwicklung, Stress	(Wang et al. 2002)
R	GGATA	Myb like recognition sites	Trichom/Wurzelhaare, Entwicklung, Stress	(Wang et al. 2002)
S	CAACAG	Myb like recognition sites	Trichom/Wurzelhaare, Entwicklung, Stress	(Wang et al. 2002)
x			Pollenspezifische Expression, Mais	(Bate und Twell 1998)

Ergänzend zu den in Abbildung 4.0 3 aufgeführten cis-aktiven Elementen wurden mit dem Programm “PLACE” Elemente für die Lichtregulation, so genannte I-Box und I-Box- verwandte Sequenzen im der Promotor von *AtMRS2-11* (Giuliano et al. 1988) und Elemente für die wurzelspezifische Expression für *AtMRS2-1* (Elmayan et al. 1995) gefunden.

4.6 Protein-Proteininteraktionsanalysen mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System

Aufgrund der Strukturähnlichkeit der AtMRS2-Proteine mit dem homopentameren CorA-Protein in *Thermotoga maritima* (Abbildung 1.0 2) sollte mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System untersucht werden, ob theoretisch eine Interaktion der einzelnen Mitglieder mit zum Teilentwicklungsspezifischer Expression möglich wäre. Die Expressionsanalyse mittels der Promotor:GUS-Fusionen zeigte auf Gewebe-Ebene überlappende Expressionen, für AtMRS2-4 und AtMRS2-11 auf Zellorganellen-Ebene (Chloroplast, Abbildung 3.0 7). Somit würde auch aufgrund der hohen Zahl an Mitgliedern der Genfamilie die Möglichkeit zur Bildung von Hetero-Oligomeren bestehen. Das *mating based* Split-Ubiquitin-System wurde zur Interaktions-Analyse pflanzlicher Membranproteine entwickelt (Obrdlik et al. 2004) und die Funktionalität über die Analyse von Kalium-Kanälen getestet (Schulze et al. 2003). Bei der Anwendung des Systems auf die Kaliumkanäle KAT1 und KAT2, für die eine überlappende Expression in den Stomata beobachtet wurde, zeigte sich hier, dass eine Bildung von Hetero-Tetrameren möglich ist. Für das ALR1-Protein wurde durch eine Analyse mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System eine Hetero-Oligomerbildung gezeigt (Wachek et al. 2006). Mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System wurden bereits Interaktionsanalysen für die Saccharose-Transporter AtSUC, AtSUT2 und AtSUT4 durchgeführt. Für diese drei Transporter wurde durch Promotor:GUS-Fusionen eine Co-Expression in den Siebelementen beobachtet. Mit dem Split-Ubiquitin-System wurde gezeigt, dass die Bildung von Homo- und Hetero-Oligomeren möglich ist. Die Spezifität wurde getestet durch Negativ-Kontrollen mit dem Glucose-Transporter AtSTP1 bzw. dem Kaliumkanal AtKAT1 (Reinders et al. 2002, Schulze et al. 2003).

In einem ersten Ansatz wurde in der Dissertation von K. Weyand eine Interaktion für AtMRS2-1, AtMRS2-2 und AtMRS2-10 als Homo- und auch in allen Kombinationen als Hetero-Oligomer gezeigt. Für AtMRS2-1 wurde außerdem gezeigt, dass eine Mutation des GMN-Motivs zu keiner Veränderung des Interaktions-Schemas führte. Bei den Interaktionsanalysen stellte das unterschiedliche Wachstum der C_{ubS} und N_{ubS} vor dem *Mating* ein Problem dar. Die C_{ubS} wuchsen wesentlich langsamer als die N_{ubS} wodurch z. T. eine Interaktion mit der Wildtyp- N_{ub} -Kontrolle ausblieb. In folgenden Ansätzen wurden die C_{ubS} einige Stunden vor den N_{ubS} angeimpft, um so für das *Mating* Hefesuspensionen mit der gleichen Optischen Dichte zu erhalten.

In meiner Arbeit konnte bei den Interaktionsanalysen die Homo-Oligomerbildung für AtMRS2-1 und AtMRS2-10 bestätigt werden. Ebenso konnte für die anderen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie die Bildung von Homo-Oligomeren Transportern für alle Mitglieder nachgewiesen werden (Abbildung 3.0 20, Abbildung 3.0 21, Abbildung 3.0 22, Abbildung 3.0 23). Die Bildung von Hetero-Oligomeren wurde in fast allen Kombinationen beobachtet (Abbildung 3.0 20, Abbildung 3.0 21, Abbildung 3.0 22, Abbildung 3.0 23). Vergleicht man die Interaktionsergebnisse mit dem Expressionsmuster, dann zeigt sich bereits, dass eine Interaktion zwischen AtMRS2-1 und AtMRS2-5, die beide unter anderem eine Coexpression in der Wurzel zeigten (Abbildung 3.0 3), miteinander interagieren können. Möglich ist zudem eine Colokalisation, da AtMRS2-5 als Transporter in der Plasmamembran identifiziert wurde (Alexandersson et al. 2004). Für AtMRS2-1 ist die Lokalisation noch nicht bekannt, aber auch in der Plasmamembran denkbar. Diese Hetero-Oligomerbildung, die auch für AtMRS2-7 und AtMRS2-10 auftrat, passt ebenfalls gut zusammen mit der überlappenden Promotoraktivität der beiden Transporter in Wurzelhaaren, Rhizodermis und Cortex der Wurzel (Abbildung 3.0 3). AtMRS2-4 und AtMRS2-11, die beide chloroplastidär lokalisiert sind und eine überlappende Färbung im vegetativen Gewebe zeigten (Abbildung 3.0 4, Abbildung 3.0 7), können ebenfalls miteinander interagieren. Unklar bleibt, wie die Situation in Pflanzen ist, da nur vereinzelt Daten zur subzellulären Lokalisation vorliegen.

Sequenzanalysen mit speziellen Programmen zur Vorhersage von *coiled coil*-Domänen (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html und <http://www.russell.embl.de/cgi-bin/coils-svr.pl>) haben gezeigt, dass diese an der Interaktion von Membranproteinen beteiligt sind. Diese Analysen wurden auch für das MRS2 aus *Saccharomyces* durchgeführt (Weghuber et al. 2006). In *Arabidopsis thaliana* wurde die Interaktion von heteromeren GTP-Bindungsproteinen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die *coiled-coil*-Domäne für die Interaktion essentiell ist (Obrdlik et al. 2000). Die Analyse des N-terminal verkürzten AtMRS2-1-Konstrukts zeigte dennoch eine Interaktion (Abbildung 3.0 20, Abbildung 3.0 21, Abbildung 3.0 22, Abbildung 3.0 23), da die *coiled coil*-Domäne nicht in dem Bereich liegt, der entfernt wurde. Allerdings zeigte der Ansatz, in dem durch gezielte Mutation die *coiled coil*-Domäne bei AtMRS2-3 und AtMRS2-5 zerstört wurde, dass keine Interaktion mehr möglich war. Somit scheint die *coiled coil*-Domäne auch bei den AtMRS2-Proteinen, wie es bereits für MRS2 vorhergesagt wurde (Weghuber et al. 2006) eine essentielle Funktion zu besitzen. Man kann keine Aussage dazu treffen, ob die *coiled coil*-Domäne die Interaktion vermittelt, oder ob sie für die Stabilität des Ionenkanals notwendig ist.

5 Ausblick

Weitere Analysen zu den Promotor:GUS-Fusions-Pflanzen wären dann interessant, wenn man gezielt Sequenzen im Promotor mutiert und die Veränderung der Expressionsmuster mit den beobachteten Promotoraktivitäten vergleicht. Hier würde sich z.B. *AtMRS2-11* eignen, da es spezielle Bindungsmotive für die stomata-spezifische Expression und für die Lichtregulation enthält. Eine Auswirkung auf die Induktion in etiolierten Keimlingen und eine Veränderung des Expressionsmusters im photosynthetisch aktiven Gewebe, in den Chloroplasten und Stomata wäre möglich. Auf diese Weise könnte man auch die anderen Transporter analysieren, welche Sequenzen im Promotor für die entsprechende gewebespezifische Lokalisation besitzen.

Im Bezug auf die Transportereigenschaften wäre es natürlich wichtig zu wissen, welche weiteren Ionen auch von den Mitgliedern der *AtMRS2*-Genfamilie mit welcher Spezifität transportiert werden können. An dieser Stelle wäre das Magfura-Hefe-System interessant, welches auch für andere Ionen als Magnesium möglich ist (Kolisek et al. 2003). Eine Analyse der Struktur durch Auskristallisieren wäre interessant, um so die Anzahl der Untereinheiten und den Aufbau des Transporters zu sehen. Hierzu wären allerdings sehr große Mengen des Proteins notwendig. Zunächst könnte man durch Überexpression in *Escherichia coli* größere Mengen des Proteins erhalten, um Antikörper herstellen zu können. Durch eine Western-Blot-Analyse könnte man mit Antikörpern analysieren, welche Transporter als Komplex tatsächlich in der Pflanze vorliegen.

In Experimenten zur Charakterisierung der Transporter durch heterologe Expression in *Xenopus*-Oocyten konnten bisher keine Ergebnisse erzielt werden. Hier könnte man die Experimente mit einer Coexpression derjenigen Transporter wiederholen, die in den Interaktionsanalysen eine Interaktion gezeigt haben, z.B. *AtMRS2-1* und *AtMRS2-10*. Untersuchungen zu den Transportereigenschaften der Saccharose-Transporter *SUT1* und *SUT2* zeigten im *Xenopus*-Modell ebenfalls erst nach einer Coexpression Ergebnisse. Da bei diesen nur ein Hetero-Oligomer als funktionaler Transporter funktioniert (Reinders et al. 2002, Schulze et al. 2003).

Die Interaktionsanalysen könnten insofern erweitert werden, dass man andere Bereiche mutiert, um so zu untersuchen welche davon essentiell für die Bildung eines funktionalen

Transporters sind. Hier sollten auch die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation durch GFP-Fusion berücksichtigt werden.

Die vorhandenen phänotypisch unauffälligen Überexpressionslinien könnte man in einem neuen hydroponischen Ansatz unter Schwermetallstress genauer auf Akkumulation der Schwermetalle, und T-DNA-Insertionslinien und RNAi-Linien auf eine mögliche Unempfindlichkeit gegenüber toxischen Schwermetallkonzentrationen, untersuchen. Bei einem nachgewiesenen Transport von Schwermetallen durch einzelne Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie, könnte man Überexpressionspflanzen für die Entgiftung schwermetallverseuchter Böden einsetzen.

6 Zusammenfassung

Magnesium besitzt einzigartige physiko-chemische Eigenschaften und benötigt einen ebenso außergewöhnlichen Transportmechanismus. Obwohl Magnesium eine essentielle Funktion in der Zelle als Cofaktor zahlreicher Enzyme, und bezogen auf die pflanzliche Zelle als Zentralatom des Chlorophylls und Regulator photosynthetischer Schlüsselenzyme besitzt, ist der Magnesiumtransport bisher wenig untersucht. Die vorliegende Dissertation erläutert Ergebnisse zur Analyse einer Genfamilie pflanzlicher Magnesiumtransporter, der *AtMRS2*-Genfamilie. Die *AtMRS2*-Genfamilie gehört zu einer neuen Klasse von Ionentransportproteinen, der 2-TM-GxN-Superfamilie. Zu dieser Familie gehören funktionale Magnesiumtransporter, wie das mittlerweile gut untersuchte CorA-Protein der Prokaryonten und bei den Eukaryonten die Hefeproteine ALR1/2, LPE10 und MRS2. Die Genfamilie umfasst in *Arabidopsis thaliana* elf Kernmitglieder und vier weiter entfernt Verwandte. In der vorliegenden Dissertation sollte die Promotoraktivität der elf Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie analysiert werden. Es stellte sich hier die Frage, ob eine entwicklungspezifische oder gewebespezifische Expression vorliegt. Für die Expressionsanalyse wurden die Promotoren und das jeweilige erste codierende Exon mit der codierenden Sequenz der β -Glucuronidase fusioniert und stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Für einige Mitglieder der Genfamilie, wie *AtMRS2-1* und *AtMRS2-5*, wurde eine ubiquitäre Expression beginnend im auskeimenden Samen, die sich über das Keimlingsstadium bis zur adulten Pflanze in fast allen Organen fortsetzte, beobachtet. Andere Transporter wie *AtMRS2-2*, zeigten vom Keimlings- bis zum Blütenstadium eine Expression im vaskulären Gewebe. Für *AtMRS2-6* wurde eine entwicklungspezifische Promotoraktivität in den Pollenkörnern dokumentiert. *AtMRS2-4* und *AtMRS2-11* zeigten Promotoraktivität im vegetativen Gewebe, zusätzlich konnte eine Expression in den Chloroplasten nachgewiesen werden. Insgesamt betrachtet konnte jedem Entwicklungsstadium und jedem Organ der Pflanze mindestens ein Mitglied der *AtMRS2*-Genfamilie zugeordnet werden. Die Analyse der Promotoraktivität unter veränderten exogenen Bedingungen zeigte eine Induktion des chloroplastidär lokalisierten *AtMRS2-11*-Transporters in etiolierten Keimlingen durch Licht. Ein Einfluss von Schwermetallen auf die Promotoraktivität wurde für *AtMRS2-4*, 2-5, 2-10 und 2-11 unter Aluminiumstress, unter Cadmiumstress für *AtMRS2-2*, und unter Kupferstress für *AtMRS2-4* und 2-5 beobachtet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Protein-Proteininteraktionsanalysen durchgeführt, um Einblicke in den möglichen Aufbau eines funktionalen Kanals zu erhalten. Das bakterielle CorA besitzt eine Pentamerstruktur, die auch für die *AtMRS2*-Proteine denkbar ist. Für alle funktionalen Mitglieder der *AtMRS2*-Genfamilie wurde die Möglichkeit Homo-Oligomeren zu bilden gezeigt. Für einzelne Mitglieder, die eine überlappende Promotoraktivität zeigten, ist eine Hetero-Oligomerbildung möglich. Für Kaliumkanäle wurde eine Beteiligung von *coiled coil*-Domänen an der Interaktion gezeigt. In einem ergänzenden Ansatz wurde untersucht, ob eine Mutation der *coiled coil*-Domäne die Oligomerisierung der *AtMRS2*-Proteine beeinflusst. Die Interaktion der *AtMRS2* Proteine mit einer

Mutation in der *coiled coil*-Domäne war stark reduziert. Unklar bleibt, ob die *coiled coil*-Domäne an der Interaktion oder der Stabilisierung beteiligt ist.

7 Summary

Magnesium atoms possess unique physico-chemical properties and need an unusual mechanism of transport as well. Although magnesium has important functions in the cell metabolism as a cofactor for numerous enzymes, especially as the central atom of the chlorophyll molecule and as regulator of photosynthetic enzymes in plants, the magnesium transport is not very well-characterized until now. This thesis contains results of the analysis of a plant magnesium transport gene family, the *AtMRS2* gene family. The *AtMRS2* gene family, like the meanwhile well-characterized functional magnesium transport protein CorA in prokaryotes and the yeast proteins ALR1/2, MRS2 and LPE10 in eukaryotes, belongs to a new class of metal ion transporters, the 2-TM-GxN-superfamily. The gene family in *Arabidopsis thaliana* contains eleven core members and four distantly relatives. In the present thesis promoter activity of the eleven members of *AtMRS2* gene family were analysed for example to answer the question if there is a developmental or a tissue specific expression of some members of the gene family. For the expression analysis promoter and first coding exon of each member of the *AtMRS2* gene family was fused to the coding sequence of the enzyme β -glucuronidase and stably expressed in *Arabidopsis thaliana*. For some members like *AtMRS2-1* and *AtMRS2-5*, an ubiquitous promoter activity beginning in the germinating seed, continuing in the seedling and the adult plant in nearly every plant organ was observed. Other transporters, like *AtMRS2-2* showed an expression in vascular tissue from stage of seedling to the flowering stage. For *AtMRS2-6* a developmental expression became evident in pollen grains. *AtMRS2-4* and *AtMRS2-11* showed promoter activity in the vegetative tissue and in addition an expression in the chloroplasts was experimentally proven. Altogether every plant organ and every developmental stage could be assigned to at least one member of the *AtMRS2* gene family. The analysis of promoter activity under different exogenous conditions showed an induction of the expression in the chloroplast localized *AtMRS2-11* under the influence of light in the etiolated seedling. An influence of heavy metals on the promoter activity of *AtMRS2-4*, *2-5*, *2-10* and *2-11* was observed in plants under aluminium stress, for *AtMRS2-2* under cadmium stress and for *AtMRS2-4* and *5* under copper stress.

In the second part of the work analyses of protein-protein-interactions were carried out to gain insights in the possible structure of a functional magnesium channel. The bacterial CorA possesses a homo-pentameric structure, which is also conceivable for the *AtMRS2* proteins. For all functional members of the *AtMRS2* gene family the possibility of building a homo-oligomeric structure was shown. For some members, which show an overlapping expression of promoter activity, a hetero-oligomeric structure is possible as well. The interaction with *AtMRS2* proteins having a mutation in the coiled coil domain was reduced. It remains still uncertain, whether the *coiled coil* domain takes part in the interaction or just in the stability of the protein.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.0 1: Struktur der prokaryotischen Magnesiumtransportproteine in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (Moncrief und Maguire 1999).....	11
Abbildung 1.0 2: Kristallstruktur des bakteriellen CorA-Transporterproteins in <i>Thermotoga maritima</i> verändert nach (Lunin et al. 2006).....	12
Abbildung 1.0 3: Schematische Darstellung der Primärsequenz eines <i>coiled coil</i> -Motivs [verändert nach (Lupas 1996)].....	13
Abbildung 1.0 4: Schematische Darstellung der Ionenaufnahme durch die Wurzel (verändert nach (Shaul 2002)).....	15
Abbildung 1.0 5: Phylogramm der Mitglieder der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>At</i>) und der Homologen in <i>Oryza sativa</i> (<i>Os</i>) (verändert nach (Knoop et al. 2005)).....	17
Abbildung 1.0 6: Struktur des <i>AtMRS2-X</i> -Transporters	18
Abbildung 2.0 1: verwendete Vektoren zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionskonstrukte.....	24
Abbildung 2.0 2: Vektorkarten der Hefevektoren pMetYCgate für die C _{ub} -Fusionen und pNXgate 33-3HA für die Herstellung der N _{ubG} -Fusionen.....	25
Abbildung 2.0 3: Schematische Darstellung der BP-Klonase-Reaktion (Manual Invitrogen, 2002).....	40
Abbildung 2.0 4: LR-Klonase-Reaktion (nach Manual Invitrogen, 2002).....	41
Abbildung 2.0 5: Schematische Darstellung des amplifizierten PCR-Produkts, Promotor-GUS-Fusionen.....	41
Abbildung 2.06: Donorvektor (verändert nach Invitrogen) und <i>Expressions</i> -Vektor pKGWFS7 (verändert nach Karimi et al. 2002).....	43
Abbildung 2.07: Nachweis-Reaktion der β -Glucuronidase-Aktivität (Kempken und Kempken 2004).....	47
Abbildung 2.0 8: Schematische Darstellung des "geteilten" Ubiquitins [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)].....	52
Abbildung 2.0 9: Schematische Darstellung der Zusammenlagerung der beiden Ubiquitinhälften [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)].....	53
Abbildung 2.0 10: Mutation des Ubiquitins [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994)]	54
Abbildung 2.0 11: Schematische Darstellung zum Prinzip des <i>mating based</i> Split-Ubiquitin-Systems [verändert nach (Johnsson und Varshavsky 1994) und P. Obrdlik 2004)].....	55
Abbildung 2.0 12: Vektorkarten für die Hefevektoren pMetYCgate und pNXgate 33-3HA [verändert nach (Obrdlik et al. 2004)].....	57
Abbildung 2.0 13: Schematische Darstellung des Hefestamms THY.AP4 und eines Ausschnitts des Vektors pMetYCgate für die C _{ub} -Fusion (Obrdlik et al. 2004).....	58
Abbildung 2.0 14: Hefestamm THY.AP5 und Ausschnitt des Vektors pNXgate 33-3HA für die N _{ub} - und N _{ubG} -Fusionen [verändert nach Obrdlik 2004)].....	59
Abbildung 2.0 15: Schematische Darstellung der Kreuzung.....	60
Abbildung 2.0 16: Schematische Darstellung der Interaktion durch Wachstum auf Medium ohne Aminosäurezusatz.....	61
Abbildung 2.0 17 Schematische Darstellung der Interaktion durch Überlagerung mit X-Gal-Medium.....	62
Abbildung 3.0 1: graphische Darstellung der Größenverhältnisse von Promotor und erstem Exon in den Promotor:GUS-Fusionen mit den in 5' angrenzenden Genen.....	67

Abbildung 3.0 2: Expressionsmuster von <i>AtMRS2</i> -1, 2-5 und 2-10 im ein bzw. zwei Tage alten auskeimenden Samen.....	68
Abbildung 3.0 3: Wurzelexpression sieben Tage alter PromotorGUS-Keimlinge.....	69
Abbildung 3.0 4: Keimlingsexpressionsmuster von <i>AtMRS2</i> -4 und <i>AtMRS2</i> -11 Promotor:GUS-Keimlingen.....	70
Abbildung 3.0 5: Promotoraktivität in den Kotyledonen sieben Tage alter Promotor:GUS-Keimlinge.....	71
Abbildung 3.0 6: Promotoraktivität im Leitgewebe von <i>AtMRS2</i> -2, 2-3, 2-4, und 2-5.....	72
Abbildung 3.0 7: GUS-Färbung von Folgeblättern adulter Pflanzen.....	74
Abbildung 3.0 8: Expression im reproduktiven Gewebe und in den Schoten adulter <i>AtMRS2</i> Prom:GUS-Pflanzen.....	76
Abbildung 3.0 9: Untersuchungen zum Einfluss von Licht auf die Expression der chloroplastidären Magnesiumtransporter <i>AtMRS2</i> -4 und <i>AtMRS2</i> -11.....	77
Abbildung 3.0 10: Untersuchungen zum Einfluss von Schwermetallen auf die Expression von <i>AtMRS2</i> -2.....	79
Abbildung 3.0 11: Expression von <i>AtMRS2</i> -4 und <i>AtMRS2</i> -5 in den Kotyledonen unter Schwermetallstress.....	80
Abbildung 3.0 12: Wurzelexpression von <i>AtMRS2</i> -7 unter Schwermetallstress.....	81
Abbildung 3.0 13: <i>AtMRS2</i> -8 Promotoraktivität in der Wurzel unter Magnesiummangel und Schwermetallstress.....	82
Abbildung 3.0 14: Einfluss von Schwermetallen auf die Promotoraktivität von <i>AtMRS2</i> -10 im Keimling.....	84
Abbildung 3.0 15: Einfluss von Aluminium auf die Expression von <i>AtMRS2</i> -5 und <i>AtMRS2</i> -10.....	85
Abbildung 3.0 16: Einfluss von Aluminium auf die Expression von <i>AtMRS2</i> -4 und <i>AtMRS2</i> -11.....	86
Abbildung 3.0 17: Einfluss von Verwundungen auf die Promotoraktivität von <i>AtMRS2</i> -1.....	88
Abbildung 3.0 18: zusammenfassende Dokumentation der Promotoraktivitäten für die einzelnen Mitglieder der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie.....	90
Abbildung 3.0 19: Dokumentation des Hefewachstums auf Vollmedium (YPD) nach dem Kreuzen für alle funktionalen Mitglieder der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie.....	97
Abbildung 3.0 20: Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Überschichtung mit X-Gal-Medium.....	100
Abbildung 3.0 21: Nachweis der Protein-Proteininteraktion durch Wachstum auf Medium ohne Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil.....	101
Abbildung 3.0 22: Dokumentation des Wachstums auf SD+0 μ M Methionin nach sieben Tagen.....	102
Abbildung 3.0 23: Dokumentation des Wachstums der Hefekolonien auf SD+ 150 μ M Methionin nach sieben Tagen bei 28 °C.....	103
Abbildung 4.0 1 Genevestigator „ <i>plant organs</i> “ [verändert nach Metanalyser <i>plant organs</i> (Zimmermann et al. 2004)].....	115
Abbildung 4.0 2: EFP Browser „ <i>plant organs</i> “ [verändert nach (Birnbaum et al. 2003)].....	116
Abbildung 4.0 3: Graphische Darstellung der Cis-aktiven Sequenzen im 5'-Bereich stromaufwärts des ersten Exons für die einzelnen Mitglieder der <i>AtMRS2</i> -Genfamilie.....	125

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2. 1: Liste der verwendeten Vektoren.....	23
Tabelle 2. 2: verwendete Laborgeräte.....	26
Tabelle 2. 3: verwendete Reaktionskits.....	27

Tabelle 2. 4: verwendete Restriktionsendonukleasen.....	28
Tabelle 2. 5: spezielle verwendete Chemikalien.....	28
Tabelle 2. 6: Auflistung der verwendeten Medien.....	30
Tabelle 2. 7: Antibiotika.....	34
Tabelle 2. 8: Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
Tabelle 2. 9: Thermoprofil „GFP 60“ zur Synthese der PCR-Produkte für die Promotor:GUS-Fusionen.....	36
Tabelle 2. 10: Inkubationszeiten und Waschschritte zur Entwässerung in Ethanol.....	48
Tabelle 2. 11: Einbettung, Mischungsverhältnisse von Ethanol und Einbettungsmedium mit Inkubationszeiten.....	49
Tabelle 3. 1: Größe der PCR-Produkte zur Herstellung der Promotor:GUS-Fusionen.....	66
Tabelle 3. 2: Sequenzgrößen in bp für die cDNA-PCR-Produkte zur Herstellung der C _{ub} - und N _{ubG} -Fusionen ohne <i>att</i> -Sequenzen.....	94
Tabelle 3. 3: Zusammenfassung der Interaktionsanalysen durch X-GAL- und Wachstums-Assay.....	104
Tabelle 4. 1: der stromaufwärtsliegenden Sequenzen auf cis-aktive Elemente, Legende zu Abb. 4. 03.....	126
Tabelle 8.01: Oligonukleotidsequenzen der Promotor:GUS-Fusionen.....	136
Tabelle 8.02: Oligonukleotidsequenzen des <i>mating based</i> Split-Ubiquitin-Systems.....	137
Tabelle 8.03: Abkürzungen.....	140

8.3 Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 8.0 2 Promotor:GUS-Fusionen

#	Name	Nukleotidsequenzen (5'□3')	Amplifikation
53	2-1gfp-gus up	attB1 + AAGGAAGAGGAGCAGGTGGACAG	Promotor und erstes Exon
158	gfp-gus 2-1 down	attB2 + TGGGAATCGAGAAACGTACAAGCAGC	von <i>AtMRS2-1</i>
55	2-2gfp-gus up	attB1 + GCTTAAGCTTTTGAAGTTGGA	Promotor und erstes Exon
159	gfp-gus 2-2 down	attB2 + TCCAAATTGAGAACAATGGCTC	von <i>AtMRS2-2</i>
57	2-3gfp-gus up	attB1 + CGACTCTCCTTGGGAATTCTCC	Promotor und erstes Exon
160	gfp-gus 2-3 down	attB2 + TGAGGTTTAGTGGCGTGATGGTG	von <i>AtMRS2-3</i>
59	2-4gfp-gus up	attB1 + CAAAACCTTGCTCAAAGTTTGCC	Promotor und erstes Exon
161	gfp-gus 2-4 down	attB2 + AGAATGTTAGAGGAGTGAGAGAA	von <i>AtMRS2-4</i>
61	2-5gfp-gus up	attB1 + GCAATCATCAATGCATCATTTTA	Promotor und erstes Exon
162	gfp-gus 2-5 down	attB2 + TTAACATTTAGGTTGTGGTTTGA	von <i>AtMRS2-5</i>
63	2-6gfp-gus up	attB1 + ATATATGCACCAAGATTCAAGAA	Promotor und erstes Exon verkürzt
294	2-6 gfp- gus down verkürzt	attB2 + ACTTCCATGAATCCAGTCCGATC	von <i>AtMRS2-6</i>
65	2-7gfp-gus up	attB1 + TAGGGACTTATTCGGTGAATTTA	Promotor und erstes Exon
164	gfp-gus 2-7 down	attB2 + TCTAAGTTAAGAACAATGGCTCT	von <i>AtMRS2-7</i>
67	2-8gfp-gus up	attB1 + AAAAAAATGGTGGTTCAAGCGG	Promotor und erstes Exon

#	Name	Nukleotidsequenzen (5'→3')	Amplifikation
165	gfp-gus 2-8 down	attB2 + ACCTCTAAGTTAAGAACAATGGC	von <i>AtMRS2-8</i>
69	2-9gfp-gus up	attB1 + CGATGGAAGGAATTGATACTCGT	Promotor und erstes Exon
166	gfp-gus 2-9 down	attB2 + TCTAAGTTCAGCACAATGGCTC	von <i>AtMRS2-9</i>
71	2-10gfp-gus up	attB1 + GCTTCTAAGAGCTCATTAAACACC	Promotor und erstes Exon verkürzt
295	2-10gfp-gus down verkürzt	attB2 + TGAGAATTGGCAGAAAGTATCAAC	von <i>AtMRS2-10</i>
73	2-11gfp-gus up	attB1 + TCCTTGCCCTTATTCTCTTCT	Promotor und erstes Exon
74	2-11gfp-gus down	attB2 + TCATAAACCGTTACGAATTC	von <i>AtMRS2-11</i>
Sequenzierung			
90	M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung von pDONR221
91	M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pDONR221
465	<i>attR1</i>	ATATCACAAGTTTGTAC	<i>attR1</i> Sequenz Destination Vector
466	<i>attR2</i>	ATATCACCACCTTGTAC	<i>attR2</i> Sequenz Destination Vector
52	gfp-pK7FWG2	CGGTGGTGCAGATGAACTTC	Bindestelle im eGFP von pK7FWG2/ FS7
157	GUS-pKGWFS7	ACATCGGCTCAAATGGC	Bindestelle im <i>uid</i> Gen von pKGWFS7
	<i>attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	<i>att1</i> -Sequenz zur Rekombination im GATEWAY™ System
	<i>attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	<i>att2</i> -Sequenz zur Rekombination im GATEWAY™ System

8.3.2 verwendete Oligonukleotide im *mating based* Split-Ubiquitin-System

Tabelle 8.0 3 *mating based* Split-Ubiquitin-System

#	Name	Nukleotidsequenzen (5'□3')	Amplifikation
186	2-1 SplitU up	B1 + ATGTCTGAGCTAAAAGAGCGC	codierende Sequenz
187	2-1 SplitU down	B2 + TAGAGGCATGAGTCTTCTGTA	AtMRS2-1
246	2-1 SplitU up -N	B1 + ACTATCCTAGGCCGAGAGAA	N-terminal verkürzte Sequenz von AtMRS2-1(ohne AS 1-94)
247	2-2 SplitU up	B1 + ATGGCGCAAACGGGTACTTG	codierende Sequenz
248	2-2 SplitU down	B2 + AGATCCCACAAGTCCTTTGTACC	AtMRS2-2
377	2-3 Split up	B1 + ATGAGAGGAGCTAGACCCGAT	codierende Sequenz
378	2-3 Split do	B2 + TTCAAGAAGGCGCTTGTACTT	AtMRS2-3
424	2-3 coiled coil mut miup	GAAGAGGAGGAAATGCTTGAGGAAGCA	Mutation der coiled coil-Domäne
425	2-3 coiled coil mut mido	TGCTTCCTCAAGCATTTCCTCCTCTTC	AtMRS2-3
462	2-4 Split Up	B1 + ATGGGGAAGGGCCCTTATC	codierende Sequenz
380	2-4 Split Do	B2 + TGAGCCTAGCAGCTTCTTCC	AtMRS2-4
381	2-5 Split up	B1 + ATGGGAGAACAACCTAGATCCATTT	codierende Sequenz
382	2-5 Split do	B2 + GAGAGGGAATACTTCTTGTGCTT	AtMRS2-5
426	2-5 coiled coil mut miup	TGATCAAGAAGAGATGGAACTAGCTTA	Mutation der coiled coil -Domäne
427	2-5 coiled coil mut mido	TA AGCTTCTAGTTCATCTCTTCTTGATCA	AtMRS2-5
383	2-6 Split up	B1 + ATGGGATCACTTCGCCGTA	codierende Sequenz
384	2-6 Split do	B2 + GTCAAGTAGCTTCTTCCACTTGG	AtMRS2-6
254	2-6 cDNA miup	TCGGAAGGATGGTCTTGAAAATAT	Bindung in der codierenden Sequenz
255	2-6 cDNA mido	AGAAGACCTCGAATGCAATCTCT	AtMRS2-6
249	2-7	B1 + ATGTCACCTGACGGAGAACTT	codierende

#	Name	Nukleotidsequenzen (5'□3')	Amplifikation
	SplitU up		Sequenz
281	2-7 SplitU down neu	B1 + AGATCCGATGAGTCCTCTAAAC	AtMRS2-7
188	2-10 SplitU up	B1 + ATGTCTGAACTCAAAGAGCGT	codierende Sequenz
189	2-10 SplitU down	B2 + CAGAGGCATGAGTCTTCTA	AtMRS2-10
387	2-11 Split up	B1 + ATGGCGTAACTCCAATTCCT	codierende Sequenz
388	2-11 Split do	B2 + AAAGATTTTTCGCTACTGAGATAG	AtMRS2-11
414	ALR Split up	B1 + ATGTCATCATCCTCAAGTTCATCAGAGTCA	codierende Sequenz
415	ALR Split do	B2 + GTCGTAGCGGCTATATCTACTAGGAAGAAGACTTGC	ScALR1
410	MRS2 Split up	B1 + ATGAATCGGCGTCTCCTGGTACGTTCTATA	codierende Sequenz
411	MRS2 Split do	B2 + ATTTTCTTGTCTTCTATCAACCATTT	ScMRS2
412	LPE10 Split up	B1 + ATGAGAGCATTCCCCGAGTACTGCCATTT	codierende Sequenz
413	LPE10 Split do	B2 + TTTCTTCAACAGTTCGTGAACGGAATCTGT	ScLpe10
190	Oligo (dT)23 VN	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	Oligonukleotid zur cDNA synthesis
418	pMet25	TTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATA	Bindestelle im Methionin Promotor von pMetYCgate
419	Cub do	TAATCAGACAGCGTTCTACCGTCTTCTAGC	Bindung in der C-terminalen Hälfte des Ubiquitin ubi14gens in Hefe
420	NubGup	GAAGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAAC	Bindung in der N-terminalen Hälfte des mutierten Ubiquitins in Hefe
421	NubG 3HAtag do	CGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTA	Bindung in Sequenz des 3HA-tag im Vektor pNXgate 33-3HA
	B1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACC	B1 Sequenz zur Rekombination in der Hefe
	B2	TCCGCCACCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA	B2 Sequenz zur Rekombination in der Hefe

8.4 Abkürzungsverzeichnisse

Tabelle 8.0 4 Abkürzungen

Abkürzung	Ausgeschriebener Begriff
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A	Adenin
ADH	alcohol dehydrogenase
Al	Aluminium
ALR1/2	<u>Al</u> ³⁺ resistenz 1/2
AMP	Ampicillin
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
AS	Aminosäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AtMHX	<i>Arabidopsis thaliana</i> Mg ²⁺ -proton exchanger
att	attachment
BAP	Benzylaminopurin
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ccd	coupled cell division
Cd	Cadmium
cDNA	Copy DNA
CDS	coding sequence
Co	Cobalt
Col	Ökotyp Columbia
CorA	Co ²⁺ resistance A
C-terminal/ Terminus	Carboxyterminales Ende eines Proteins
Cu	Kupfer
C _{ub}	C-terminale Hälfte des Ubiquitins
d	Tag,/ Tage
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzung	Ausgeschriebener Begriff
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanosin
ges.	gesamte
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	β -D-Glucuronidase
h	Stunde
ind.	induziert
H	Wasserstoff
K	Kalium
Kan	Kanamycin
AKT1	<i>Arabidopsis</i> <u>K</u> aliumtransporter 1
KAT1	<u>K</u> alium <i>Arabidopsis</i> <u>T</u> ransporter 1
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
LB	Left Border
Ler	Ökotyp <i>Landsberg erecta</i>
μ	mikro
m	Meter
Met	Methionin
m	Mili
M	mol/L
merist.	meristematisch
MES	Morpholinoethansulfonsäure
Mg^{2+}	Magnesium Ion
Mgt	Mg^{2+} Transport
min	Minute
Mn	Mangan
mol	Molar
mRNA	messenger (Boten) RNA
MRS2	<u>m</u> itochondrial <u>R</u> NA <u>s</u> plicing factor <u>2</u>

Abkürzung	Ausgeschriebener Begriff
MS	Murashige and Skoog
n	nano
N	Asparagin
Ni	Nickel
N-terminal /Terminus	Aminoterminales Ende eines Proteins
N _{ubG}	mutierte N-terminale Hälfte des Ubiquitins
N _{ubWT}	Wildtyp N-terminal Hälfte des Ubiquitins ohne Mutation
ori	Origin of replication
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PLV	proteinA-LexA-VP16
polyA	Polyadenylierung
RB	Right Border
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	Rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
s	Sekunde
SC	Synthetic complete media (Synthetisches Vollmedium)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetic dextrose media (Synthetisches Minimalmedium)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
T	Thymidin
T	Tyrosin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
T-DNA	Transfer DNA

Abkürzung	Ausgeschriebener Begriff
tRNA	Transfer-RNA
TE	Trisbase mit EDTA
Ti plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TM	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TRPM	transient receptor protein for magnesium
U	Units
U	Uracil
u.a.	unter anderem
UBP	ubiquitin-specific protease
ÜN	Über Nacht
USP	ubiquitin-spezifische Proteasen
v	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenanteil)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsanteil)
w/o	without
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
X-Glc	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
YPD	
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

9 Literaturverzeichnis

- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C., and Kjellbom, P. *Arabidopsis* Plasma Membrane Proteomics Identifies Components of Transport, Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Plant Cell Physiology* 45[11], 1543-1556. 2004.
- Amberger, A. (1996) *Pflanzenernährung*. Eugen Ulmer GmbH & Co: UTB für Wissenschaft.
- Bahassi, E.M., O'Dea, M.H., Allali, N., Messens, J., Gellert, M., and Couturier, M. (1999) Interactions of *ccdB* with DNA Gyrase. *Journal of Biological Chemistry* 274:10936-10944.
- Bapty, B.W., Dai, L.J., Ritchie, G., Canaff, L., Hendy, G.N., and Quamme, G.A. (1998) Mg^{2+}/Ca^{2+} sensing inhibits hormone-stimulated Mg^{2+} uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Am.J.Physiol* 275:F353-F360.
- Bate, N. and Twell, D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple-stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Molecular Biology* 37, 859-869. 1998.
- Bernard, P. and Couturier, M. Cell killing by the F- plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II. *Journal of Molecular Biology* 226, 735-745. 1992.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, Y. J., Jung, L. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., and Benfey, P. N. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 302, 1956-1960. 2003.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleid Acid Research* 7[6], 1513-1523. 1979.
- Bock, K. W., Honys, D., Ward, M. J., Padmanaban, S., Nawrocki, E. P., Hirschi, D. K., Twell, D., and Sze, H. Integrating Membrane Transport with Male Gametophyte Development and Function through Transcriptomics. *Plant Physiology* 140, 1151-1168. 2006.
- Bowman, J. (1994) *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. Springer Verlag.
- Brown, P.H., Welch, R.M., and Cary, E.E. (1987) Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology* 85:801-803.
- Bui, D.M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragini, A., and Schweyen, R.J. (1999) The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue MRS2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* 274:20438-20443.
- Chérel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H., and Thibaud, J.-B. Physical and Functional interaction of the *Arabidopsis* K^+ channel AKT2 and Phosphatase AtPP2CA. *The Plant Cell* 14, 1133-1146. 2002.
- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., and Ausubel, F. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58, 991-999. 1989.
- Chubanov, V., Waldegger, S., Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M., Seyberth, H., Konrad, M., and Gudermann, T. (2004) Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the *TRPM6* gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:2894-2899.

- Ciamporová, M. (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. *Biologia Plantarum* 45:161-171.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16:735-743.
- Cowan, J.A. (2002) Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* 15:225-235.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U. (2003) A Gateway Cloning Vector Set for High-Troughput Functional Analysis of Genes in Plants^[w]. *Plant Physiology* 133:462-469.
- de Ruijter, N.C.A., Verhees, J., Leeuwen, W., and van der Krol, A.R. (2003) Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology* 5:103-115.
- Delhaize, E. and Ryan, P.R. (1995) Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107:315-321.
- Deng, W., Luo, K., Li, D., Zheng, X., Wei, X., Smith, W., Thammina, C., Lu, L., Li, Y., and Pei, Y. (2006) Overexpression of an *Arabidopsis* magnesium transport gene, *AtMGT1*, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57:4235-4243.
- di Toppi, S. and Gabbriellini, R. (1999) Response to Cadmium in higher Plants. *Environment Experimental Botany* 41:105-130.
- Drummond, R. S, Tutone, A. F, and Gardner, R. C. A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. 170, 78-89. 2006. *Plant Science*.
- Elmayan T., Tepfer M Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35Spromoter (1995) *Transgenic Research* 4
- Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Sinauer.
- Eshaghi, S., Niegowski, D., Kohl, A., Motina, M. D., Lesley, S. A., and Nordlund, P. Crystal Structure of a Divalent Metal Ion Transporter CorA at 2.9 Angstrom Resolution. 313, 354-357. 2006. *Science*.
- Ettinger, W. F., Clear, A. M., Fanning, K. J., and Peck, M. L. Identification of a Ca²⁺/H⁺ Antiport in the Plant Chloroplast Thylakoid Membrane. *Plant Physiology* 119, 1379-1385. 1999.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugiére, S., Miras, S., Kowalski, M., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., and Rolland, N. (2003) Proteomics of the chloroplasts envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Cell.Proteomics* 2:325-345.
- Fordham-Skelton, A. P., Lilley, C., Urwin, P. E., and Robinson, N. J. GUS Expression in *Arabidopsis* directed by 5' regions of the pea methallothionein-like gene *PsMT_A*. *Plant Molecular Biology* 34, 659-668. 1997.

- Fraústo da Silva, J.J.R. and Williams, R.J.P. (1991) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford: Clarendon Press.
- Gebert, M. A gene family of Mg²⁺ transporters in *Arabidopsis thaliana*: molecular and physiological characterisation of knockout mutants. 2006. Unveröffentlichte Arbeit.
- Gibeaut ,D.M., Hulett, J., Cramer, R.G., and Seemann, J.R. (1997) Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance Hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology* 115:317-319.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of Yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B* 350:87-96.
- Gilissen, L.J.W., Metz, P.L.J., Stiekema, W.J., and Nap, J.-P. (1998) Biosafety of *E.coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Research* 7:157-163.
- Gould, S.J. and Subramani, S. (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry* 175:5-13.
- Graschopf, A., Stadler, J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D., and Schweyen, R.J. (2001) The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg²⁺ homeostasis and is subject to Mg²⁺-dependent control of its synthesis and degradation. *Journal of Biological Chemistry* 276:16216-16222.
- Gregan, J., Kolisek, M., and Schweyen, R.J. (2001) Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo. *Genes and Development* 15:2229-2237.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V.S., Timko, M.P., Scolnik, P.A., Cashmore, R.T. (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of RT a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7089-7093 (1988)
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal Experimental Botany* 53:1-11.
- Hanahan, D. Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166[4], 557-580. 1983.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., and Kay, S. A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110-2113. 2000.
- Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R., and Nureki, O. (2007) Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature Letters* 06093.
- Heldt, H.W. (1979) Light-dependent changes of stroma H⁺ and Mg²⁺ concentrations controlling CO₂ fixation. *Phytosynthesis II Encyclopedia of Plant Physiology* 6:202-207.
- Hermans, C. and Verbruggen, N. (2005) Physiological characterization of Mg²⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 56:2153-2161.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acid Research* 27[1], 297-300. 1999.

Hmiel, S.P., Snively, M.D., Florer, J.B., Maguire, M.E., and Miller, C.G. (1989) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J.Bacteriol.* 171:4742-4751.

Hmiel, S.P., Snively, M.D., Miller, C.G., and Maguire, M.E. (1986) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *J.Bacteriol.* 168:1444-1450.

Höffgen, R. and Willmitzer, L. Storage of competent cells of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acid Research* 16[20], 9877-. 1988.

Huang, J., Struck, F., Matzinger, D.F., and Levings, C.S. (1994) Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell* 6:439-448.

Jefferson, R.A. (1989) The GUS reporter gene system. *Nature* 342:837-838.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6:3901-3907.

Johnsson, N. and Varshavsky, A. (1994) Split Ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:10340-10344.

Jungk, A. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 121-129. 2003.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002) GATEWAY™ for *Agrobacterium* -mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7:193-195.

Kehres, D.G. and Maguire, M.E. (2002) Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins. *Biomaterials* 15:261-270.

Kempken, F. and Kempken, R. (2004) *Gentechnik bei Pflanzen*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Kim, H. Y., Cote, G. G., and Crain, R. C. Potassium channels in *Samanea*-Saman protoplasts controlled by phytochrome and the circadian clock. *Science* 260, 960-962. 1993.

Knoop, V., Groth-Maloney, M., Gebert, M., Eifler, K., and Weyand, K. Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. 274[Mol Gen Genomics], 205-216. 2005.

Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R.J., and Schweigel, M. (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO Journal* 22:1235-1244.

Koncz, C. and Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204[383], 394. 1986.

Krupa, Z., Bornman, J., and Asp, H. (1988) Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting complex II in radish cotyledons. *Physiologia Plantarum* 73:518-524.

Lee, J. RNAi-Geninaktivierungen in einer Genfamilie von Magnesiumtransportern in *Arabidopsis thaliana*. 2005., unveröffentlichte Arbeit.

Li, L., Tutone, A.F., Drummond, R.S., Gardner, R.C., and Luan, S. (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:2761-2775.

Lott, J.N.A., Greenwood, J.S., and Battem, G.D. (1995) Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In *Seed Development and Germination*, J.Kigel and G.Galili, eds (New York: Dekker), pp. 215-235.

Lü, S., Gu, H., Yuan, X., Wang, X., Wu, A., Qu, L.J., and Liu, J.Y. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Research* . 2006.

Ludwig, J., Owen, D., and Pongs, O. Carboxy-terminal domain mediates assembly of voltage gated rat ether-a-go-go potassium channels. *The EMBO Journal* 16, 6337-6345. 1997.

Lunin, V., Debrovetsky, E., Khutoreskaya, G., Zhang, R., Joachimiak, A., Doyle, D.A., Maguire, M.E., and Edwards, A.M. (2006) Crystal structure of the CorA Mg²⁺ transporter. *Nature* 440:833-837.

Lupas, A. *Coiled coils*: new structures and new functions. *Trends in Biological Structure* 21, 375-381. 1996.

Lusk, J.E. and Kennedy, E.P. (1969) Magnesium transport in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 244:1653-1655.

MacDiarmid, C.W. and Gardner, R.C. (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* Magnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion. *J.Biol.Chem.* 273:1727-1732.

Maguire, M.E. Magnesium Transporters: Properties, Regulation and Structure. *Frontiers in Bioscience* 11, 3149-3163. 2006.

Maguire, M.E. and Cowan, J.A. Magnesium chemistry and biochemistry. . 15, 203-210. 2002. *BioMetals*.

Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Elsevier Academic Press.

- Matsomoto, H. (2000) Cell Biology of Aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology - A survey of Cell Biology* 200:1-46.
- Meschenmoser, K. Expressionsanalyse der *AtMRS2*-Genfamilie. 2003. Unveröffentlichte Arbeit.
- Miranda, E.R., Pattanagul, W., and Madore, M.A. (2002) Phloem transport of solutes in crop plants. In *Handbook of Plant and Crop Physiology*, M.e.D.Pessarakli, ed (New York: pp. 449-465).
- Mitsuda, N., Takeyasu, K., and Sato, M. H. Pollen-specific regulation of vacuolar H⁺-PPase expression by multiple cis-acting elements. *Plant Molecular Biology* 46[2], 185-192. 2001.
- Moncrief, M.B. and Maguire, M.E. (1999) Magnesium transport in prokaryotes. *J.Biol.Inorg.Chem.* 4:523-527.
- Nakamura, R.L., McKendree, W.L.J., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F., and Sussman, M.R. (1995) Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology* 109:371-374.
- Neidz, R.P., Sussman, M. R., and Satterlee, J.S. (1995) Green fluorescent protein an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Reports* 14:403-497.
- Nelson, D.L. and Kennedy, E.P. (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J.Biol.Chem.* 246:3042-3049.
- Nies, D. H. and Silver, S. (1989) Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J.Bacteriol.* 171:4073-4075.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischscher, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J. L., Boles, E., Andre, B., and Frommer, W. B. K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane proteins interactions. 101[PNAS], 12242-12247. 2004.
- Obrdlik, P., Neuhaus, G., and Merkle, T. (2000) Plant Heterotrimeric G protein β subunit is associated with membranes via protein interactions involving *coiled-coil* formation. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 476:208-212.
- Plesch, G., Ehrhardt, T., and Mueller-Roeber, B. (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role of Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *The Plant Journal* 28:455-464.
- Plesch, G., Kamann, E., and Mueller-Roeber, B. (2000) Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression. *Gene* 249:83-89.
- Ptashne, M. (1992) *A Genetic Switch: Phage (Lambda) and higher organisms*. Cambridge: MA: Cell Press.
- Puente, P., Wei, N., and Deng, X.-W. Combinational interplay of promoter elements constitutes the minimal determinant for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 15, 3732-3743. 1996.

Raboy, V. Seeds for a better future: "Low Phytate" grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends in Plant Science* 6, 458-462. 2001.

Reinders, A., Schulze, W., Kuhn, C., Barker, L., Schulz, A., Ward, J.M., and Frommer, W.B. (2002) Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities co-localized in the same enucleate sieve element. *The Plant Cell* 14:1567-1577.

Rengel, Z. Net Mg^{2+} uptake in relation to the amount of exchangeable Mg^{2+} in the Donnan free space. *Plant and Soil* 128, 185-189. 1990.

Rengel, Z. and Robinson, D.L. (1989) Competitive aluminium ion inhibition of net magnesium ion uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. *Plant Physiology* 91:1407-1413.

Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., and Gardner, R.C. (1998) Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116:409-418.

Riederer, M. and Schreiber, L. Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52, 2023-2032. 2001.

Sancenón, V., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D. J., and Peñarrubia, L. The *Arabidopsis* Copper Transporter *COPT1* Function in Root Elongation and Pollen development. *Journal of Biological Chemistry* 279[15], 15348-15355. 2004.

Sandmann, G. and Böger, P. (1983) The enzymatological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, A.Läuchli and R.L.Bielecki, eds (Berlin: Springer Verlag), pp. 563-596.

Schachtman, D. P. and Schroeder, J.I. Structure and transport mechanisms of a high-affinity potassium uptake transporter of higher plants. *Nature* 370, 655-658. 1994.

Scheffer, F. (2002) *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.

Schindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A. R. TGA1 and G-Box Binding factors: Two distinct classes of *Arabidopsis* Leucine Zipper Proteins compete for the G-Box like element TGACGTGG. *The Plant Cell* 4, 1309-1319. 1992.

Schleiff, E. and Soll, J. (2000) Travelling of proteins through membranes: translocations into chloroplasts. *Planta* 211:449-456.

Schmitz, C., Perraud, A., Johnson, C., Inabe, K., Smith, M., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A., and Scharenberg, A. (2003) Regulation of Vertebrate Cellular Mg^{2+} Homeostasis by *TRPM7*. *The Cell* 114:191-200.

Schock, I. Spleißen mitochondrialer Gruppe II Introns: Molekulare Analysen und Identifikation einer Genfamilie von putativen Magnesiumtransportern in Pflanzen. 2000., Unveröffentlichte Arbeit.

- Schock, I., Gregan, J., Steinhauser, S., Schweyen, R., Brennicke, A., and Knoop, V. (2000) A member of a novel *Arabidopsis thaliana* gene family of candidate Mg^{2+} ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. *The Plant Journal* 24:489-501.
- Schulze, W., Reinders, A., Ward, J., Lalonde, S., and Frommer, W. B. Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. 4[3], 1471-2091. 2003. *BMC Biochemistry*.
Ref Type: Generic
- Seregin, I.V. and Ivanov, V.B. (1997) Histochemical Investigation on Cadmium and Lead Distribution in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 44:915-921.
- Seregin, I.V. and Ivanov, V.B. (1998) The transport of Cadmium and Lead Ions through root tissues. *Russian Journal of Plant Physiology* 45:899-905.
- Seregin, I.V. and Ivanov, V.B. (2001) Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48:523-544.
- Shaul, O. (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* 15:309-323.
- Shaul, O., Hilgemann, D. W., de-Almeida-Engler, J., Montagu, M. V., Inze, D., and Galili, G. Cloning and characterization of a novel M^{2+}/H^+ exchanger. 18[14], 3973-3980. 1999. *The EMBO Journal*.
- Siegenthaler, P. A. and Depéry, F. Influence of unsaturated fatty acids in chloroplasts. Shift of the pH optimum of electron flow and relations to delta pH, thylakoid internal pH and proton uptake. *European Journal of Biochemistry* 61[2], 573-580. 1976.
- Sigel, H. and Sigel, A. (1990) *Metal ions in biological systems: Compendium on magnesium and its role in biology, nutrition and physiology*. Marcel Dekker, INC.
- Silver, S. (1969) Active transport of magnesium in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 62:764-771.
- Silver, S. and Clark, D. (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246:569-576.
- Smith, R.L., Banks, J.L., Snively, M.D., and Maguire, M.E. (1993) Sequence and Topology of the CorA Magnesium Transport System of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 268:14071-14080.
- Smith, R.L., Thompson, L.J., and Maguire, M.E. (1995) Cloning and Characterization of MgtE, a putative New Class of Mg^{2+} Transporter from *Bacillus firmus* OF4. *Journal of Bacteriology* 177:1233-1238.
- Snively, M.D., Florer, J.B., Miller, C.G., and Maguire, M.E. (1989) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: expression of cloned genes for three distinct Mg^{2+} transport systems. *J. Bacteriol.* 171:4752-4760.

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and teHeesen, S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. 95, 5187-5192. 1998. Genetics.
- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., and Sherwood, R.P. (1985) The effect of cadmium on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63:293-298.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2000) Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19:201-213.
- Taiz, I. and Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associated Inc. Publishers.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *PNAS* 97:4991-4996.
- Tocquin, P., Corbesier, I., Havelange, A., Pielain, A., Kurtem, E., Bernier, G., and Périlleux, C. (2003) A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 3:1-10.
- Truernit, E. and Sauer, N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *SUC2* sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -Glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. *Planta* 196, 564-570. 1995.
- Vert, G., Briat, J.-F., and Curie, C. *Arabidopsis IRT2* gene encodes a root-periphery iron transporter. *The Plant Journal* 26[2], 181-189. 2001.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J.-F., and Curie, C. *IRT1*, an *Arabidopsis* Transporter essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *The Plant Cell* 14, 1223-1233. 2002.
- Vreugdenhil, D., Aarts, M.G.M., Koornneef, M., Nelissen, H., and Ernst, W. H. O. Natural variation and QTL Analysis for cationic mineral content in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 27, 828-839. 2004.
- Wachek, M., Aichinger, M.C., Stadler, J.A., and Schweyen, R.J. (2006) Oligomerization of the Mg²⁺-transport proteins ALR1p und ALR2p in yeast plasma membrane. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 273:4236-4249.
- Wang, E., Gan, S., and Wagner, G.J. Isolation and characterization of the CXP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany* 53[376], 1891-1897. 2002.
- Weber, A.P.M., Schwacke, R., and Flügge, U.-I. Solute Transporters of the Plastid Envelope Membrane. *Annual Review of Plant Biology* 56, 133-164. 2005.
- Weghuber, J., Dieterich, F., Froschauer, E. M., Sidova, S., and Schweyen, R. J. Mutational analysis of functional domains in Mrs2p, the mitochondrial Mg²⁺ channel protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS Journal* 273, 1198-1209. 2006.

Weterings, K., Reijnen, W., van Aarssen, R., Kortstee, A., Spijkers, J., van Herpen, M., Schrauwen, J., and Wullems, G. Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Molecular Biology* 18[6], 1101-1111. 1992.

Weyand, K. Analysis of the AtMRS2-magnesium transporter family in *Arabidopsis thaliana* via gene-GFP fusions, heterologous complementations and proteome interaction studies. 2006, Unveröffentlichte Arbeit.

Wiesenberger, G., Waldherr, M., and Schweyen, R.J. (1992) The nuclear gene *MRS2* is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 276:6963-6969.

Yang, X., Baligar, V.C., Martens, D.C., and Clark, R.B. (1996) Cadmium Effects on Influx and transport of mineral nutrients in plant species. *Journal of Plant Nutrition* 19:643-656.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* 136:2621-2632.

Zimmermann, S., Hartje, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., and Mueller-Roeber, B. The K⁺ channel SKT1 is co-expressed with KST1 in potato guard cells - both channels can co-assemble via their conserved K_Tdomains. 28[5], 517-527. 2001. *The Plant Journal*.

10 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Volker Knoop, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung meine Dissertation anzufertigen. Er hat mich mit konstruktiver Kritik begleitet und die Arbeit fachlich unterstützt.

Herrn Professor Dr. Lukas Schreiber danke ich für die Übernahme des Koreferats. Ich durfte in seiner Abteilung Mikroskop und Kryomikrotom benutzen.

Herrn Professor Dr. Karl-Heinz Scheidtmann und Herrn Professor Dr. Joern Piel danke ich für Ihre Teilnahme an der Promotionskommission als fachnahe und fachangrenzende Gutachter.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Diedrik Menzel, und ganz besonders bei Ursula Mettbach aus seiner Abteilung bedanken für die Unterstützung und die gute Einarbeitung bei der Herstellung von Mikrotomdünnschnitten und die Möglichkeit, bei Ihnen Mikroskop und Kamera benutzen zu dürfen.

Aus der Abteilung von Prof. Dr. Schreiber möchte ich mich außerdem bei Isabel Briesen dafür bedanken, dass sie mir gezeigt hat, wie man Kryoschnitte herstellt und das Mikroskop benutzt.

Für die Unterstützung und Hilfe bei den Arbeiten mit Hefe bin ich Herrn Dr. Daniel Wipf und Tobias Müller aus der Abteilung „Transport in der Mykorrhiza“ dankbar.

Vielen Dank an alle fleißigen Korrekturleser, insbesondere Mareike Rüdinger, Ute Wahrmond und Julia Lee für ihre Geduld und ihre tollen Vorschläge und Kommentare bei der Korrektur meiner Arbeit.

Ich möchte mich außerdem besonders bei Monika Polsakiewicz für ihre guten Tips zur Lösung vieler Probleme im Laboralltag bedanken, meinem ehemaligen Diplomanden Henning Lenz für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Nicht zu vergessen ist die nette Büroatmosphäre mit Ute und Mareike. Vielen Dank auch für die freundliche Unterstützung im Laboralltag bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Evolution“ Felix, Katja, Michael, Simon, Nicole, den zahlreichen Auszubildenen und

Praktikanten, die meine Doktorarbeit begleitet haben und der Arbeitsgruppe „Transport in der Mykorrhiza“. Ich möchte mich auch bei den ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, besonders Katrin Weyand bedanken, die mich in die Arbeiten mit der Hefe und bereits zu Beginn meiner Diplomarbeit eingearbeitet hat, sowie Julia, Jan, Theresia, Milena und Karolin.

Meine Familie gab mir eine Rückzugsmöglichkeit. Meinen Freunden verdanke ich schöne Freizeitaktivitäten, durch die ich einen Ausgleich und neue Motivation bei der Anfertigung meiner Arbeit gewonnen habe.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig angefertigt habe. Ich habe keine anderen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Diese Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Bonn, 07.April 2008