

Molekulare und Physiologische Analyse
der *MRS2*-Genfamilie von
Magnesiumtransportern in
Arabidopsis thaliana

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

MICHAEL GEBERT

aus Köln

Bonn, 31. März 2011

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig angefertigt und die verwendeten Quellen und Hilfsmittel gekennzeichnet habe.

Bonn, 31. März 2011

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

“A few months in the lab can save you hours in the library.”

- Unbekannter Verfasser -

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xv
1. Einleitung	1
1.1. Die biologische Bedeutung von Magnesium gegenüber anderen Ionen	1
1.1.1. Untersuchungen von Magnesiumtransport bei Prokaryonten	2
1.1.2. Beteiligung von Magnesium in der Eukaryontenphysiologie	2
1.2. Ungewöhnliche Transportproteine für Magnesium in allen Domänen des Lebens	6
1.2.1. Typische Magnesiumtransporter der Prokaryonten	6
1.2.2. Proteine für den Magnesiumtransport in Eukaryonten	11
1.3. Zielsetzung	13
2. Ergebnisse	15
2.1. Molekulare Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>MRS2</i> Mutanten	15
2.1.1. Herstellung von multiplen <i>Knockout</i> -Linien durch Kreuzung von T-DNA-Insertionsmutanten	16
2.1.2. Genotypisierung der Filialgenerationen via Polymerase-Kettenreaktion . .	16
2.1.3. Bestätigung des Genverlustes durch Transkriptionskontrolle	18
2.1.4. Phänotypische Untersuchungen und Bestimmung des Ionenprofils von <i>MRS2 Knockout</i> -Mutanten.	20
2.1.5. Bestimmung von T-DNA-Insertionsorten in <i>MRS2</i> RNAi-Linien	22
2.1.6. Quantitative Expressionsanalyse von homozygoten RNAi-Linien	23
2.2. Komplementation von <i>mrs2-7</i> Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.1. Klonierung der Komplementationskonstrukte und Transformation von <i>Arabidopsis</i>	25
2.2.2. Wachstumsphänotyp der <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien unter verschiedenen Magnesiumbedingungen	26
2.2.3. Expressionsanalyse der <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien und Kontrollsequenzierung der Transkripte	27
2.2.4. ICP-MS-Ionenprofile von <i>mrs2-7</i> Mutanten und <i>Pro</i> _{35S} : <i>MRS2-7c</i> Komplementationslinien	29
2.2.5. Untersuchung der <i>MRS2-7 Knockout</i> - und Komplementationslinien auf veränderte Aluminiumtoleranz	30

2.3.	Lokalisation von MRS2 Proteinen in <i>Arabidopsis</i> und <i>Nicotiana</i>	33
2.3.1.	Herstellung und mikroskopische Untersuchung von MRS2:GFP Fusionsproteinen in Tabakblättern	33
2.3.2.	Herstellung und mikroskopische Untersuchung von GFP:MRS2 Fusionsproteinen in Tabakblättern	35
2.3.3.	Co-Lokalisation der MRS2-7:GFP-Fusion mit dem DsRED-ER-Marker und Untersuchung der Mobilität durch Zeitrafferaufnahmen	37
2.3.4.	Expressionsnachweis von MRS2-7:GFP und Komplementationsversuche in <i>Arabidopsis</i>	39
2.4.	Komplementation von <i>mrs2Δ</i> Mutanten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.4.1.	Vergleichende Analyse von CorA/Mrs2/Lpe10 Proteinen auf strukturelle Gemeinsamkeiten	41
2.4.2.	Klonierung von chimären <i>MRS2</i> Expressionskonstrukten und Transformation in <i>mrs2Δ</i> Mutanten	42
2.4.3.	Wachstumstest auf selektivem Medium und Mg ²⁺ -Aufnahmemessungen mit transformierten <i>mrs2Δ</i> Hefen	44
2.5.	Etablierung von <i>Escherichia coli</i> Magnesiumtransportmutanten	47
2.5.1.	Herstellung und Charakterisierung von $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Mutanten	47
2.5.2.	Herstellung und Charakterisierung von $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutanten	49
3.	Diskussion	53
3.1.	Welche <i>MRS2</i> Gene sind redundant, und welche essentiell?	53
3.1.1.	Die Gene <i>MRS2-1</i> , <i>MRS2-5</i> und <i>MRS2-10</i> sind in <i>Arabidopsis</i> entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert	54
3.1.2.	In <i>mrs2-1</i> , <i>mrs2-5</i> und <i>mrs2-10</i> Mutanten ist die Zusammensetzung des Ionenprofils verändert	55
3.1.3.	Einzel-, Doppel- oder Trippel- <i>Knockouts</i> von <i>mrs2-1</i> , <i>mrs2-5</i> und <i>mrs2-10</i> zeigen unterschiedliche Phänotypen	57
3.1.4.	Die Herunterregulation von <i>MRS2</i> Genen in RNAi-Linien bewirkt keine offensichtlichen Defekte	59
3.1.5.	<i>MRS2</i> Proteine sind in den Kompartimenten des Endomembransystems oder in endosymbiontischen Organellen lokalisiert	60
3.1.6.	Die Evolution der <i>MRS2</i> -Genfamilie verrät etwas über mögliche funktionelle Redundanz und spezifische Anpassungen	65
3.1.7.	Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zur Funktion der Proteine <i>MRS2-1</i> , <i>MRS2-5</i> und <i>MRS2-10</i>	69
3.2.	Verbesserte Umweltanpassung durch Überexpression von <i>MRS2-7</i>	71
3.2.1.	<i>MRS2-7</i> Expressionsdaten und Komplementation des <i>mrs2-7</i> Phänotyp	71
3.2.2.	Subzelluläre Lokalisation von <i>MRS2-7</i> im Endomembransystem	71
3.2.3.	Physiologische Bedeutung von <i>MRS2-7</i> und Evolution in <i>Arabidopsis</i>	72
3.2.4.	Aluminium Resistenz durch ektopische Überexpression von <i>MRS2-7</i>	74

3.3. Untersuchung von pflanzlichen MRS2 Proteinen in heterologen Systemen	76
3.3.1. Komplementation und mag-fura 2 Messungen der Aufnahmekinetik mit <i>mrs2Δ</i> Hefemutanten	76
3.3.2. Komplementation von <i>Escherichia coli ΔcorA ΔmgtA</i> Mutanten	78
4. Material und Methoden	81
4.1. Transgene Pflanzenlinien, Bakterien- und Hefestämme	81
4.1.1. Kultivierung und Handhabung des verwendeten Pflanzenmaterials	82
4.2. Molekularbiologische Arbeiten	83
4.2.1. Herstellung der Vektoren und Transformation von Pflanzen, Pilzen und Bakterien	83
4.2.2. Präparation von Nukleinsäuren, cDNA Synthese und PCR	84
4.2.3. Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	84
4.2.4. Transkriptionsanalyse durch quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	84
4.3. Proteinextrakte aus Pflanzen, SDS-PAGE und Western Blot	85
4.4. Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	85
4.5. Phylogenetische Rekonstruktion des Stammbaums der MRS2 Proteinfamilie . . .	85
A. Abkürzungen	87
A.1. Präfixe	87
A.2. Einheiten	87
A.3. Chemikalien	88
A.4. Sonstige Abkürzungen	88
B. Oligonukleotide	91
B.1. Genotypisierung und FST-Sequenzierung	91
B.2. Transkriptionskontrolle von <i>Knockout</i> - und RNAi-Linien	92
B.3. Klonierungen für <i>Arabidopsis</i> , Hefe und <i>E. coli</i>	92
B.4. Sequenzierungs-Primer	94
Literaturverzeichnis	95
Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

1.1. Wechselwirkungen bei der Ionenverfügbarkeit in Bodenlösungen, Nährstoffaufnahme und Kurzstreckentransport zum Leitgewebe in der Wurzel.	5
1.2. Kristallstrukturanalyse des CorA Mg ²⁺ -Transporters aus dem Bakterium <i>Thermotoga maritima</i>	7
1.3. Phylogenie der <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) und <i>Oryza sativa</i> (Os) MRS2/MGT Mg ²⁺ -Transporterfamilien.	14
2.1. Primerbindungsstellen zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien am Beispiel von <i>mrs2-7(3)</i>	17
2.2. Genotypisierung von Nachkommen gekreuzter T-DNA-Insertionslinien und Wildtyp <i>Arabidopsis</i>	17
2.3. Genotypisierung von Einfach- <i>Knockout</i> -Linien, Nachkommen aus der F ₁ - und F ₂ -Generation einer Tripel-T-DNA-Mutante und Wildtyp <i>Arabidopsis</i>	19
2.4. Transkriptionsanalyse von <i>MRS2</i> und Haushaltsgenen in Rosettenblättern der <i>mrs2-1 mrs2-5</i> Doppelmutante bzw. Wildtyp <i>Arabidopsis</i>	19
2.5. Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp <i>Arabidopsis</i> und verschiedenen <i>MRS2</i> Mutanten bei niedriger Mg ²⁺ -Verfügbarkeit.	20
2.6. PiiMS Ionenprofil der Blätter von einzelnen und multiplen T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zum <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	21
2.7. Sequenzierung von T-DNA-Insertionsorten im Genom von <i>Arabidopsis</i> RNAi-Linien für verschiedene <i>MRS2</i> Gene.	23
2.8. Analyse der relativen Expression von <i>MRS2</i> Genen in RNAi-Linien und <i>Arabidopsis</i> Wildtyp durch quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.	24
2.9. Vektorkarten von pK7WG2D.1 und pMDC99 mit zugehöriger T-DNA für <i>MRS2-7</i> Komplementationsversuche in <i>Knockout</i> -Mutanten.	26
2.10. Hydroponische Kultur von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp Col-0, <i>mrs2-7(2)</i> <i>Knockout</i> - und <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien.	27
2.11. Transkriptionsanalyse von <i>MRS2-7</i> und endogenen Kontrollen in <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien und <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	28
2.12. Quantifizierung und Analyse von verkürzten und vollständigen <i>MRS2-7</i> Transkripten aus <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien und <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	29
2.13. Ionenprofil von <i>mrs2-7</i> <i>Knockout</i> - und <i>MRS2-7</i> Komplementationslinien im Vergleich zum <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	30

2.14. Aluminiumtoleranz von <i>MRS2-7 Knockout</i> - und Überexpressionsmutanten im Vergleich zu <i>Arabidopsis</i> Wildtyp	32
2.15. Vektorkarte von pMDC83 mit zugehörigen T-DNAs für <i>MRS2-x:GFP</i> Reporterstudien in <i>Arabidopsis</i> und <i>Nicotiana</i>	34
2.16. Fluoreszenz von verschiedenen <i>MRS2-x:GFP</i> Fusionsproteinen bei transienter Expression in Tabakepidermiszellen.	35
2.17. Vektorkarte von pMDC43 mit zugehörigen T-DNAs für <i>GFP:MRS2-x</i> Reporterstudien in <i>Arabidopsis</i> und <i>Nicotiana</i>	36
2.18. Fluoreszenz von verschiedenen <i>GFP:MRS2-x</i> Fusionsproteinen bei transienter Expression in Tabakepidermiszellen.	37
2.19. Fluoreszenzbilder von Tabakepidermiszellen mit HDEL:DsRED markiertem Endomembransystem und Co-Expression von GFP bzw. <i>MRS2-7:GFP</i>	38
2.20. Zeitreihe von <i>MRS2-7:GFP</i> Fluoreszenzsignalen im endoplasmatischen Retikulum und in Transportvesikeln des Golgi-Netzwerks von Tabakepidermiszellen.	39
2.21. Nachweis der <i>MRS2-7:GFP</i> Transkription und Translation sowie Komplementationsstudien in <i>mrs2-7</i> Linien im Vergleich zu Wildtyp <i>Arabidopsis</i>	40
2.22. Tertiäre Proteinstruktur von CorA aus <i>Thermotoga maritima</i> (Tm) und Sekundärstrukturmodelle von homologen <i>MRS2</i> Proteinen in Hefe (Sc), Mensch (Hs) und <i>Arabidopsis</i> (At).	43
2.23. Vektorkarte von YEp351 und <i>MRS2</i> Fusionskonstrukte für funktionelle Komplementationsstudien in Hefe <i>mrs2Δ</i> Mutanten.	44
2.24. Komplementation der <i>mrs2Δ</i> Mutante durch <i>Arabidopsis MRS2</i> Gene und Messung der Mg^{2+} -Aufnahme in isolierte Hefemitochondrien.	46
2.25. Rekombinationsschema für <i>CorA</i> und <i>MgtA</i> mit PCR-Produkten bestehend aus Antibiotikumsresistenz und flankierenden homologen Bereichen.	48
2.26. Genotypisierung von <i>E. coli Knockout</i> -Mutanten und Wildtyp BW25113 mit Test auf veränderte Cobaltsensitivität.	49
2.27. Genotypisierung von potentiellen <i>E. coli</i> Doppelmutanten und Rekombinationsschema für falsch inserierte Resistenzgene.	50
2.28. Genotypisierung von <i>E. coli</i> Doppelmutanten und Rekombinationsschema ohne FRT-Sequenzen sowie Mg^{2+} bzw. Co^{2+} -abhängiger Wachstumsdefekt.	51
3.1. Vergleich der genomischen Regionen von <i>MRS2-1</i> und <i>MRS2-10</i> auf <i>Arabidopsis</i> Chromosom 1.	53
3.2. Expressionsanalyse von <i>MRS2-1</i> und <i>MRS2-10</i> durch den Affymetrix <i>ATH1 GeneChip</i>	54
3.3. Vergleichende Gegenüberstellung der Proteinsequenzen von <i>MRS2-1</i> und <i>MRS2-10</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3.4. Zusammenfassung der subzellulären Lokalisation von <i>Arabidopsis MRS2</i> Proteinen durch unterschiedliche Methoden.	65
3.5. Rekonstruierter Stammbaum CorA-ähnlicher Proteine aus den sequenzierten Genomen von sechs Angiospermen nach dem <i>Neighbor-Joining</i> -Verfahren.	66

-
- 3.6. Gen-Arrangement von *MRS2-7*, *MRS2-8* und *MRS2-9* auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* und homologe Bereiche in *Arabidopsis lyrata*. 73
- 3.7. Die globale Verteilung der pH-Werte im Boden von stark sauer (rot) bis leicht alkalisch (blau). 74

Tabellenverzeichnis

2.1. Zusammenfassung der durchgeführten Kreuzungen von homozygoten T-DNA-Insertionslinien.	16
2.2. Ergebnisse der Genotypisierung von Filial-Generationen multipler T-DNA-Insertionslinien.	18
2.3. Signifikante Abweichungen des Ionengehaltes einzelner und multipler T-DNA-Insertionslinien vom <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	22
2.4. Signifikante Abweichungen des Ionengehaltes verschiedener <i>MRS2-7</i> Mutanten vom <i>Arabidopsis</i> Wildtyp.	31
2.5. Primerkombinationen und PCR-Fragmentgrößen für die Genotypisierung von <i>Escherichia coli</i> $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Mutanten und Wildtyp BW25113.	49
4.1. Tabellarische Übersicht der verwendeten und im Vorfeld bezogenen Pflanzenlinien	81
4.2. Tabellarische Übersicht der verwendeten und im Vorfeld bezogenen Hefe- und Bakterienstämme	82

Zusammenfassung

Magnesium ist an einer großen Vielfalt von biochemischen Vorgängen in allen lebenden Zellen z.B. als Co-Faktor vieler Enzyme, als Zentralatom des Chlorophylls oder als Regulator von zellulären Prozessen beteiligt. Weitere Beispiele für seine essentielle Bedeutung sind die Stabilisierung von ribosomalen Untereinheiten und Ribozymstrukturen sowie die Komplexierung von ATP. Aufgrund seiner besonderen physiko-chemischen Eigenschaften ist das Mg^{2+} -Ion einzigartig unter den biologisch relevanten Kationen und deshalb weisen auch die für seinen Membrantransport zuständigen Proteine außergewöhnliche Merkmale auf. Das zur Zeit am besten untersuchte Transportsystem für Mg^{2+} ist das bakterielle CorA Protein, gefolgt von seinem eukaryontischen Verwandten Mrs2p aus der inneren Mitochondrienmembran der Hefe. Weitere Homologe existieren in den Metazoa und im Reich der Pflanzen, wo sie sogar ganze Genfamilien bilden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob und welche Mitglieder der *Arabidopsis thaliana* *MRS2* Genfamilie zueinander redundant sind. Aus diesem Grund wurden multiple *Arabidopsis* *Knockout*-Linien für die drei eng verwandten Mitglieder *MRS2-1*, *MRS2-5* und *MRS2-10* hergestellt und charakterisiert. Die Ergebnisse deuten an, dass die beiden am nächsten zueinander verwandten Gene *MRS2-1* und *MRS2-10* funktionell redundant sind und die Pflanze eines der beiden Proteine für ihr Überleben benötigt. Das *MRS2-5* Gen hingegen schien unter den untersuchten Bedingungen keine essentielle Funktion zu besitzen. Vorangegangene Studien zeigten, dass ein *Knockout* für die meisten anderen Mitglieder der Genfamilie nicht möglich ist. Für einige dieser Kandidaten konnte durch post-transkriptionelles *Gene Silencing* das Transkriptionsniveau deutlich reduziert werden, ohne jedoch zu einem offensichtlichen Phänotyp zu führen.

Aus einer früheren Untersuchung lag bereits eine *mrs2-7 Knockout*-Mutante mit einem Mg^{2+} -abhängigen Phänotyp vor, die nun weiter physiologisch charakterisiert werden sollte. Eine ektoxische Überexpression der codierenden Sequenz von *MRS2-7* unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors hob diesen Phänotyp vollständig auf, während ein alternatives Konstrukt mit der genomischen DNA und dem endogenen Promotor hierzu nicht in der Lage war. Die Überexpression von *MRS2-7* bewirkte außerdem eine erkennbar gesteigerte Toleranz gegenüber toxischen Al^{3+} -Ionen bei Wachstum unter sauren pH-Bedingungen.

Um das Wissen über die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen *MRS2* Proteine zu erweitern, wurden einige Mitglieder der Genfamilie in co-translatorischer Fusion mit den grün fluoreszierenden Protein in Epidermiszellen von Tabakblättern transient exprimiert. Alle sechs untersuchten Proteine konnten unabhängig von der Positionierung des Reporters im Endomembransystem der Zelle detektiert werden. Diese Ergebnisse müssen jedoch kritisch hinter-

fragt werden, da ein Versuch die *mrs2-7 Knockout*-Mutante mit einem MRS2-7:GFP Fusionsprotein zu komplementieren nicht gelang. Die stabile Expression dieses Konstruktes führte in *Arabidopsis* zu keiner erkennbaren Fluoreszenz, und nur ein deutlich verkürztes Fusionsprotein konnte immunologisch nachgewiesen werden.

Ein vielseitiges Instrument um die Funktion eines unbekanntes Proteins zu untersuchen ist die Verwendung eines heterologen Expressionssystems. Mit Hilfe der *mrs2Δ* Mutante der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden neun Mitglieder der MRS2 Genfamilie als funktionelle Magnesiumtransporter identifiziert. Durch Transportmessungen mit einem Mg^{2+} -sensitiven Farbstoff konnten die Aufnahmekapazitäten der einzelnen MRS2 Proteine bestimmt werden.

Als ein alternatives System zur funktionellen Charakterisierung von Mg^{2+} -Transportproteinen wurde durch die Anwendung von homologer Rekombination ein *Escherichia coli* Stamm erzeugt, dem seine beiden endogenen Magnesiumtransporter CorA und MgtA fehlen. Dieser Stamm benötigt für sein Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp oder den $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Einzelmutanten zusätzliches Magnesium im Medium. Erste Versuche zur Komplementation der $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante mit den pflanzlichen MRS2 Proteinen waren allerdings erfolglos.

1. Einleitung

In den Lebenswissenschaften sind trotz bahnbrechender Erkenntnisse über die Grundlagen des Lebens und die Entdeckung zahlreicher biologischer Mechanismen innerhalb der letzten Jahrzehnte immer noch mehr Fragen offen als beantwortet. Die Erforschung von Genom, Transkriptom, Proteom und sogar Metabolom eines einzelnen Organismus produziert eine Fülle an Daten, welche zwar viele Einsichten gewähren, aber gleichzeitig deutlich machen, wie komplex und unverstanden die meisten zellulären Vorgänge nach wie vor sind. Im Vordergrund steht derzeit die Bemühung, durch molekulare und physiologische Untersuchungen die Gesamtheit der Funktionen einer Zelle, eines Gewebes oder ganzen Organismus - von den Erbanlagen über den Stoffwechsel bis zum Verhalten - zu kennen und zu verstehen. Als Modelle stehen hierfür inzwischen viele gut charakterisierte und im Labor leicht zu handhabende Bakterien, Pilze, Tiere und Pflanzen als Vertreter für die drei Domänen des Lebens zu Verfügung.

Innerhalb solcher Organismen spielen eine Vielzahl von organischen und anorganischen Molekülen unterschiedlicher Komplexität eine entscheidende Rolle für deren Erhalt oder Vermehrung. Einige dieser Moleküle haben Bedeutung für den Aufbau oder die Bewegung einer Zelle sowie deren Unterteilung in abgetrennte Reaktionsräume. Wiederum andere sind wichtig für die Vervielfältigung, Reparatur und Umsetzung der Erbinformation, die Katalyse biochemischer Prozesse wie z.B. der Bereitstellung von Energie oder die Signalerkennung und -übertragung. Anorganische Ionen sind aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften als Co-Faktoren an nahezu all diesen Prozessen beteiligt und ihr Vorhandensein unterliegt einer strengen Kontrolle durch die Zelle.

1.1. Die biologische Bedeutung von Magnesium gegenüber anderen anorganischen Ionen

Magnesium gehört zu den Erdalkalimetallen und ist das achthäufigste Element in der Erdkruste. Da viele Magnesiumsalze sehr gut in Wasser löslich sind, ist die reichhaltigste Quelle von ionisiertem Mg^{2+} die Hydrosphäre mit Konzentrationen von durchschnittlich 54 mM in Seewasser und 0,05 - 0,5% im Boden bzw. 125 μM - 8,5 mM in Bodenlösungen (Epstein und Bloom 2005; Maathuis 2009; Karley und White 2009). Mg^{2+} besitzt im Gegensatz zum flexibleren Ca^{2+} immer die Koordinationszahl 6 und seine 90° Bindungswinkel sind sehr starr. Dadurch kann es als Co-Faktor verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe stabilisieren oder beispielsweise Wassermoleküle an entscheidende Stellen innerhalb aktiver Zentren platzieren. Eine weitere Besonderheit ist neben der hohen Ladungsdichte der fast 400 fache Volumenunterschied zwischen hydratisiertem ($r = 4,76 \text{ \AA}$) und dehydratisiertem ($r = 0,65 \text{ \AA}$) Mg^{2+} gegenüber dem

nur 25 fachen Unterschied bei Ca^{2+} (Maguire und Cowan 2002). Magnesium ist das häufigste divalente Kation in Zellen, wo es zu etwa 50 % an ATP gebunden vorliegt. Bei der Hydrolyse von ATP und dem Transfer der Phosphatgruppe dient die Komplexbildung zu Mg-ATP nicht nur der Bindung oder dem Ladungsausgleich, sondern ist aufgrund der Eigenschaften von Mg^{2+} als Lewis-Säure bereits Teil der enzymatischen Katalyse (Cowan 2002). Darüber hinaus ist Magnesium an unzähligen anderen metabolischen Prozessen als essentieller Co-Faktor oder Regulator beteiligt. Im Nukleinsäuremetabolismus besteht seine Funktion neben der Neutralisierung der negativen Ladung von Phosphatresten in der Etablierung von dreidimensionalen Ribozymstrukturen bzw. deren autokatalytischer Aktivität (Sreedhara und Cowan 2002) und ähnliches gilt für die Stabilisierung der ribosomalen Untereinheiten (Sperrazza und Spremulli 1983). Die Bindung von Magnesium und Calcium an polare Kopfgruppen von Phospholipiden und die daraus entstehende Quervernetzung beeinflusst außerdem die Stabilität von Biomembranen (Bara *et al.* 1988). Im Gegensatz zur unmittelbaren Signalwirkung von Ca^{2+} als *second messenger* ist die regulatorische Funktion von Mg^{2+} eine langfristige Modulation von zellulären Prozessen (Grubbs und Maguire 1987).

1.1.1. Untersuchungen von Magnesiumtransport bei Prokaryonten

In physiologischen Untersuchungen von Prokaryonten wie *Escherichia coli* wurde bereits in den späten 60er Jahren des letzten Jahrhunderts ein spezifisches Transportsystem für die aktive Mg-Aufnahme aus der Umgebung über Proteine in der Plasmamembran erkannt. Hinweise hierfür waren Temperaturabhängigkeit der Aufnahmekinetik, die Unterdrückung des Transports durch Entkopplung des Protonengradienten sowie Selektivität des Transportes gegenüber Kalium und Calcium (Lusk *et al.* 1968; Silver 1969). Eine kompetitive Hemmung der Mg-Akkumulation lässt sich durch nichtphysiologische Konzentrationen von Mangan und Cobalt im Medium beobachten (Silver und Clark 1971; Nelson und Kennedy 1971). Durch weiterführende Experimente wurden zwei unabhängige Transportsysteme charakterisiert, von denen System I konstitutiv vorhanden und zum Transport von Co^{2+} in der Lage ist. Das System II wird in seiner Expression durch hohe Mg-Konzentrationen im Medium unterdrückt und besitzt keine Affinität zu Co^{2+} (Nelson und Kennedy 1972). Neben den bereits erwähnten biologischen Funktionen von Magnesium entdeckte man bei pathogenen Bakterien wie *Salmonella typhimurium* seine essentielle Bedeutung als regulatorisches Signal für die Virulenz (García-Véscovi *et al.* 1996).

1.1.2. Beteiligung von Magnesium in der Eukaryontenphysiologie

Eukaryonten haben im Gegensatz zu den Prokaryonten zahlreiche intrazelluläre Kompartimente wie beispielsweise Mitochondrien, den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum welche den Transport von Magnesium über weitere Membranen erfordern. Bei Pilzen wurde die energieabhängige und kompetitive Aufnahme von Magnesium und anderen divalenten Kationen durch ein gemeinsames Transportsystem noch vor dem der Einzeller beschrieben (Rothstein *et al.* 1958; Fuhrmann und Rothstein 1968). Bereits 1957 konnten Physiologen große

Mengen von Magnesium in den Muskelzellen von Säugetieren messen und ab den frühen 1970er Jahren entdeckte man Magnesium als Regulator für die Muskelkontraktion und den Ionenfluss über Zellmembranen von Nervenzellen. Erst in den folgenden Jahrzehnten wurde nach und nach die Möglichkeit eines Mechanismus für aktiven Magnesiumtransport und die Beteiligung von intrazellulären Kompartimenten an der streng regulierten Mg^{2+} -Homöostase erkannt (Romani und Scarpa 1992). Die hohen Magnesiumkonzentrationen in Zellen sind entgegen früherer Annahmen nicht statisch. Sie unterliegen signifikanten Änderungen unter der Kontrolle einer Vielzahl von Hormonen und anderen Auslösern, was wiederum ihre physiologische Relevanz für die Regulation von Zell- und Gewebefunktionen verdeutlicht (Romani und Maguire 2002). Freie cytosolische Mg^{2+} -Konzentrationen ($[Mg^{2+}]_{cyt}$) werden für Säugetiere mit 0,5 - 0,7 mM angegeben, wobei die Gesamtmenge pro Zelle zwischen 14 und 20 mM liegt. Die Menge an freiem Mg^{2+} in der Mitochondrienmatrix ist mit 0,8 - 1,2 mM gegenüber dem Cytosol deutlich erhöht (Romani 2007). Die Fähigkeit von Wirbeltierzellen, $[Mg^{2+}]_{cyt}$ trotz großer Schwankungen in der Gesamtmenge konstant zu halten, wird neben der Aufnahme in Organellen und Na^+ -abhängiger Verdrängung vor allem der Komplexbildung mit ATP und anderen Verbindungen zugeschrieben (Gabriel und Günzel 2007).

Ernährungsphysiologische Bedeutung von Magnesium in Pflanzen

Magnesium macht in Pflanzen durchschnittlich etwa 0,2 % der Trockenmasse (TM) aus und ist damit das dritthäufigste anorganische Element nach Kalium (1 %) und Calcium (0,5 %). Im Vergleich verschiedener monokotyler und dikotyler Nutzpflanzen variieren die Konzentrationen für Mg (0,05 - 1 % TM), K (0,8 - 8 % TM) und Ca (0,1 - 6 % TM) zwischen ober- und unterirdischen Organen, einzelnen Blattgeweben sowie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Verfügbarkeit im Boden (Epstein und Bloom 2005; Conn und Gilliam 2010). Die Gesamtmenge an Magnesium innerhalb von Blattzellen liegt im Bereich von 2 - 10 mM und kann in den Speichervakuolen von Fichtennadeln Konzentrationen zwischen 13 - 17 mM in Mesophyllzellen und sogar 16 - 120 mM in Epidermiszellen erreichen. Der Transport von Mg über den Tonoplasten bestimmt die Homöostase im Cytosol und den Organellen und reguliert darüber hinaus das Anion-Kation Verhältnis und den Turgor der Zelle (Marschner 1995). Die Konzentration an freiem cytosolischem Mg^{2+} entspricht durchschnittlich nur etwa 0,5 mM. Sie liegt damit deutlich unterhalb der Konzentration von 50 - 80 mM für cytosolisches K^+ jedoch über den 100 nM an cytosolischem Ca^{2+} (Maathuis 2009). Die Konzentration von freiem Mg^{2+} im Chloroplasten hängt sehr stark vom Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit ab und ändert sich augenblicklich von 2,5 - 3 mM im Dunkeln zu 0,2 mM beim Übergang zur Helligkeit, kehrt aber nach wenigen Minuten wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die Mg^{2+} -Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten des Chloroplasten ist sehr ungleichmäßig. So liegt die Gesamtkonzentration von freiem und gebundenem Magnesium im Stroma bei ungefähr 5 mM und innerhalb des Thylakoidlumens im Bereich von 50 mM. Bei Mitochondrien fällt die Konzentrationsänderung nach dem Wechsel deutlich geringer aus und liegt im Durchschnitt bei 2 mM mit kurzfristiger Verringerung auf 1 mM beim Übergang Dunkel-Hell bzw. Erhöhung auf 3 mM beim Übergang Hell-Dunkel (Igamberdiev und Kleczkowski 2001; Shaul 2002).

Unter den zahlreichen physiologischen Funktionen von Magnesium in Pflanzen sind die des Zentralatoms im Porphyrin der Chlorophyllmoleküle und seine Beteiligung an Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese die bekanntesten. Nicht nur ein Mangel, sondern auch ein Überschuss von Magnesium im Cytosol kann sich negativ auf die Photosyntheserate auswirken. Dies kann z.B. über die Ansäuerung des pH-Wertes im Stroma der Chloroplasten durch Blockierung des K^+/H^+ -Antiports über die Hüllmembran geschehen (Berkowitz und Wu 1993). In Abhängigkeit von Licht aktiveren erhöhte Magnesiumkonzentrationen im Stroma die Enzyme Fructose-1,6-bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, welche im Calvin-Benson-Zyklus das CO_2 -Akzeptormolekül Ribulose-1,5-bisphosphat regenerieren (Epstein und Bloom 2005). Die Bindung von chloroplastidärem Mg^{2+} an die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) erhöht zusätzlich deren Affinität gegenüber CO_2 und steigert damit die Umsetzungsrate der Kohlenstofffixierung. Außerdem ist der lichtinduzierte Mg^{2+}/H^+ -Antiport über die Thylakoidmembran wichtig für die Regulation des pH-Wertes und den Ladungsausgleich im Thylakoidlumen (Marschner 1995). Die Aktivität von H^+ , K^+ und Ca^{2+} Transportern in der Plasmamembran wird ebenfalls durch die Verfügbarkeit von Mg beeinflusst (Shabala und Hariadi 2005). Eine unzureichende Versorgung mit Magnesium beeinträchtigt die Mobilisierung und Verteilung von Aminosäuren und nichtstrukturellen Kohlenhydraten wie Stärke bzw. Saccharose und führt schon frühzeitig zu deren Akkumulation in Mg-defizienten Blattgeweben. Dies geschieht möglicherweise durch die Inhibierung einer Mg-abhängigen P-Typ-ATPase, welche unter Normalbedingungen den für die Phloembeladung nötigen Protonengradienten erzeugt (Cakmak *et al.* 1994). Mg-Mangel erhöht darüber hinaus die Aktivität von H_2O_2 -abbauenden Enzymen (Katalasen) und ruft in photosynthetisch aktiven Geweben Chlorosen bzw. Nekrosen hervor (Cakmak 1994). Dies ist eine Folge der Akkumulation von Kohlenhydraten in den Blättern, welche die Oxygenasereaktion der RuBisCO verstärkt und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt (Shaul 2002). Die verringerten Transkriptmengen von *Cab2* (*Chlorophyll A/B-binding protein 2*) in Pflanzen mit Mg-Defizienz sind möglicherweise ebenfalls für den Rückgang von Chlorophyllgehalt und photosynthetischer Aktivität verantwortlich (Hermans und Verbruggen 2005). Eine Erhöhung des Biomassenverhältnisses von Wurzel zu Sproß ist im Gegensatz zu Stickstoff- und Phosphormangel bei niedriger Mg-Verfügbarkeit nicht zu beobachten (Hermans *et al.* 2006).

Aufnahme und Transport von Magnesium und anderen Nährstoffen in der Pflanze

Die Verfügbarkeit der organischen und anorganischen Nährstoffe im Boden ist stark vom vorherrschenden pH-Wert abhängig und die höchste Löslichkeit liegt für die meisten Ionen im Bereich zwischen 5 und 7 (Abb. 1.1 a). Positiv geladene Ionen, die an unterschiedliche Bodenpartikel mit negativen Oberflächenladungen gebunden sind, werden durch Protonen oder andere Kationen verdrängt und gehen in die Bodenlösung über (Abb. 1.1 b). Aus diesem Grund bevorzugen die meisten Pflanzen leicht saure Böden oder fördern selbst durch Abgabe von Protonen und Hydrogenkarbonat den Ionenaustausch (Marschner 1995; Epstein und Bloom 2005). Die Aufnahme der gelösten Nährstoffe erfolgt über die Wurzelhaare und der anschließende Kurzstreckentransport zum Leitgewebe entweder über Diffusion oder Strömung im Apoplasten oder

durch Plasmodesmen innerhalb des Symplasten (Abb. 1.1 c). Innerhalb des Cortex erfolgt dabei größtenteils der Übergang von apoplastischem zu symplastischem Transport, d.h. die Nährstoffe werden aktiv über eine Zellmembran in das Cytosol aufgenommen. Dies ist nötig, da der Casparische Streifen in der Endodermis eine hydrophobe Diffusionsbarriere bildet und gelöste Nährstoffe somit nicht über den Apoplasten in das Leitgewebe gelangen können (Marschner 1995; Epstein und Bloom 2005). Die Messung der Mg-Aufnahmekinetik in Wurzeln zeigt, dass dessen Transport zur Endodermis über den Apoplasten schneller verläuft als über den Symplasten (Kuhn *et al.* 2000). Im Leitgewebe erfolgt der Rücktransfer in den Apoplasten durch die Beladung des Xylems, teilweise entgegen des elektrochemischen Gradienten ($[Mg^{2+}]_{xyl} \approx 0,5 - 1 \text{ mM}$), sowie der Langstreckentransport zu den Spross- und Blattgeweben über den Transpirationssog. In den Blattgeweben werden die Nährstoffe aus dem Xylem durch die Aufnahme in die Bündelscheidenzellen entlang ihres elektrochemischen Gradienten entladen und ggf. von dort über das Phloem wieder zurück in die Wurzel transportiert, so dass einige Nährstoffe permanent durch die Leitgewebe zirkulieren. Bei langfristigem Magnesiumdefizit erfolgt dessen Remobilisierung aus alten und der Transfer in jüngere Blätter, wahrscheinlich unter Beteiligung des Phloems (Marschner 1995; Epstein und Bloom 2005; Karley und White 2009).

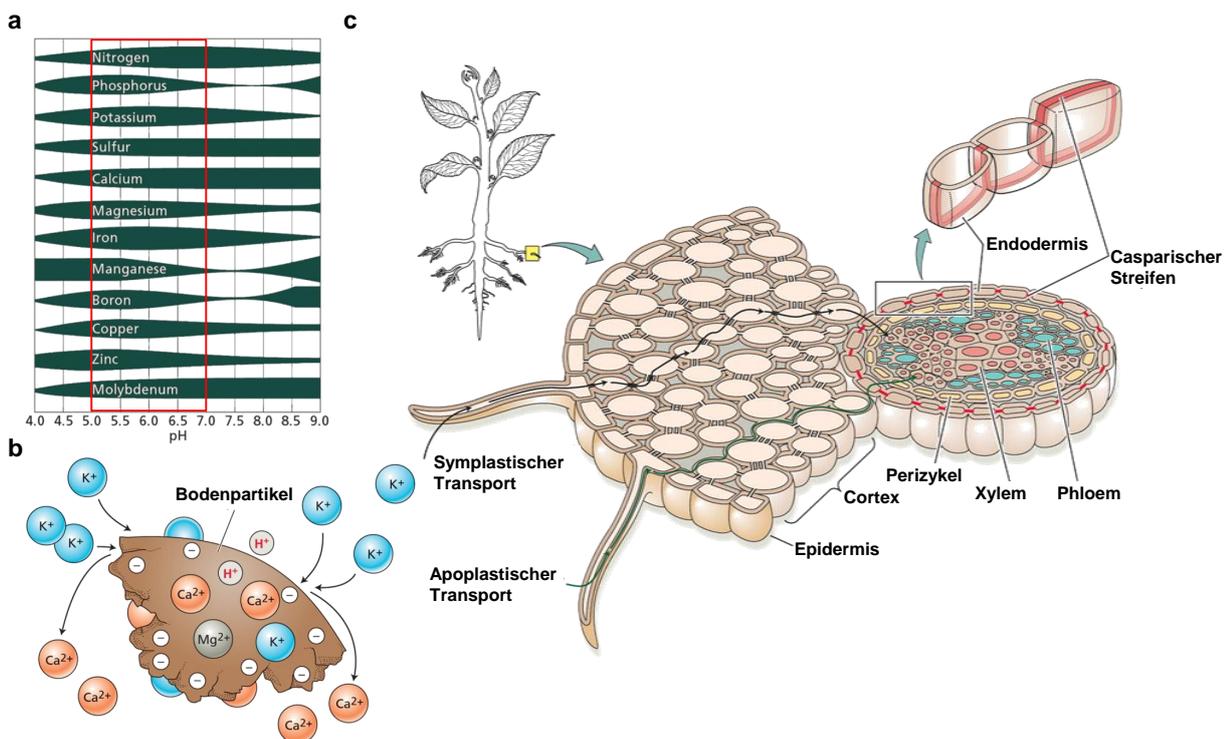


Abbildung 1.1. Wechselwirkungen bei der Ionenverfügbarkeit in Bodenlösungen, Nährstoffaufnahme und Kurzstreckentransport zum Leitgewebe in der Wurzel.

(a) Abhängigkeit der relativen Ionenverfügbarkeit in der Bodenlösung vom pH-Wert. **(b)** Konkurrenz von verschiedenen anorganischen Kationen um negative Bindungsstellen auf der Oberfläche von Bodenpartikeln. **(c)** Querschnitt durch die Gewebe einer Angiospermenwurzel mit radialem Nährstofftransport von den Wurzelhaaren bis zum Leitbündel über den apoplastischen oder symplastischen Weg. Abbildung modifiziert nach Taiz und Zeiger (2002).

1.2. Ungewöhnliche Transportproteine für Magnesium existieren in allen Domänen des Lebens

Bedingt durch die genannten physiko-chemischen Besonderheiten des Magnesiumions müssen seine Transportproteine ebenfalls einzigartige Anpassungen aufweisen um (I) das große hydratisierte Kation selektiv zu erkennen, (II) die eng gebundenen Wassermoleküle zu entfernen und (III) die dehydratisierte Form durch die Membran zu transportieren (Maguire und Cowan 2002; Maguire 2006a; Moomaw und Maguire 2008). Es existiert eine Vielzahl von verschiedenen Genen bzw. Proteinen für unterschiedliche Typen von Magnesiumtransportern, manche davon sind universell und andere nur in einzelnen Domänen des Lebens vertreten (Shaul 2002; Gardner 2003; Moomaw und Maguire 2008). Die derzeit am besten charakterisierten Magnesiumtransporter sind die der Prokaryonten, aber in den letzten Jahren wurden zunehmend sowohl verwandte als auch neuartige Transporter in den Eukaryonten entdeckt und beschrieben. Im Folgenden wird besonders auf die drei unterschiedlichen Klassen von Mg^{2+} -Transportern in *Archaea* und *Bacteria* eingegangen sowie auf deren eukaryontische Verwandte, sofern diese vorhanden sind.

1.2.1. Typische Magnesiumtransporter der Prokaryonten

Bei der Identifizierung von am Mg^{2+} -Transport beteiligten Proteine gelangen in den 70er und 80er Jahren große Fortschritte in Folge der Entdeckung der Transportsysteme I und II in *Escherichia coli*, welche nach ihren Charakteristika *Cor* (*Cobalt resistance*) bzw. *Mgt* (*Magnesium transport*) (Park *et al.* 1976) benannt wurden. Die Klonierung von drei beteiligten Loci gelang zuerst in *Salmonella typhimurium* für *CorA* (Hmiel *et al.* 1986) und anschließend für *MgtA* und *MgtB* (Hmiel *et al.* 1989; Snavely *et al.* 1989a). Der Verlust von *CorA* in *Salmonella typhimurium* verringert den Mg-Einstrom bei Wachstum in Medium mit viel Magnesium, aber zeigt keine Auswirkung auf den Transport bei niedrigen Mg-Konzentrationen (Hmiel *et al.* 1986). Die $\Delta corA$ Mutanten weisen keine Anzeichen von Mg-Defizienz auf und der Gesamtgehalt in der Zelle ist unverändert. Beide Beobachtungen bestätigen, dass mehrere redundante Mg-Transporter mit unterschiedlicher Regulation vorhanden sind (Snavely *et al.* 1989b) und erst ein *Knockout* aller drei Gene bewirkt, dass *Salmonella typhimurium* nur bei hohen Magnesiumkonzentrationen im Medium wachsen kann. Die erneute Expression eines der drei Gene hebt diesen Phänotypen vollständig auf (Hmiel *et al.* 1989; Kehres und Maguire 2002). Neben den zwei Transportsystemen *CorA* und *MgtA/MgtB* wurde Mitte der 90er Jahren ein dritte Klasse von Mg-Transportproteinen im Gram-positiven Bakterium *Bacillus firmus* identifiziert und als *MgtE* bezeichnet (Smith *et al.* 1995).

Struktur und Funktion von *CorA* und verwandten Proteinen

Die Proteine der *CorA* Familie sind die mit Abstand am besten untersuchten und wahrscheinlich primären Magnesiumtransporter der Prokaryonten. Sie sind in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet (Smith und Maguire 1995) und mit wenigen Ausnahmen auch in den Genomen

anderer *Archaea* und *Bacteria* vorhanden (Kehres *et al.* 1998; Knoop *et al.* 2005). Alle CorA-ähnlichen Magnesiumtransporter sind etwa 320 Aminosäuren groß und entsprechen dem “2-TM-GxN” Bauprinzip mit einer löslichen N-terminalen Domäne, zwei C-terminalen hydrophoben Transmembransegmenten sowie einem konservierten “GxN” Tripeptid am Ende der ersten Transmembrandomäne (TMD). Im Jahr 2006 wurden drei voneinander unabhängige Kristallstrukturen des CorA Mg^{2+} -Transporters aus *Thermotoga maritima* mit Auflösungen von 2,9 bis 3,9 Å publiziert, welche den Transporter offenbar in einem geschlossenem Zustand darstellen (Lunin *et al.* 2006; Eshaghi *et al.* 2006; Payandeh und Pai 2006). In diesen Arbeiten ist der funktionelle CorA Transportkomplex ein Homopentamer mit zwei Transmembrandomänen pro Monomer und sowohl Amino- als auch Carboxyl-Terminus liegen im Cytoplasma (Abb. 1.2). Das N-terminale Ende bildet eine bisher einzigartige $\alpha \beta \alpha$ Anordnung bestehend aus sieben parallelen/antiparallelen β -Faltblättern ($\beta_2 \uparrow \beta_1 \downarrow \beta_3 \uparrow \beta_7 \uparrow \beta_6 \downarrow \beta_5 \uparrow \beta_4 \downarrow$), die sich zwischen zwei Gruppen von α -Helices ($\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$ und $\alpha_4 \alpha_5 \alpha_6$) befinden (Abb. 1.2). Eine so genannte *stalk*-Helix (α_7) verbindet die cytosolische Domäne mit TMD1, und zusammen bilden sie eine trichterförmige Struktur unterhalb der Zellmembran. Die zehn Transmembransegmente der fünf Untereinheiten bilden die membranständige Domäne, in der die α -Helices von TMD2 einen äußeren Ring um die aus den TMD1 α -Helices bestehende Pore formen. Diese Transmembranbereiche enthalten neben anderen - für die Transportfunktion essentiellen Aminosäuren - das CorA Leitmotiv der Prokaryoten “YGMNF” (Smith *et al.* 1998b; Szegedy und Maguire 1999). Bei allen bisher bekannten CorA Orthologen befinden sich keine negativen Seitenreste in diesen Domänen, so dass der Mg-Einstrom ohne elektrostatische Interaktion stattfinden muss. Trotz geringer Sequenzähnlichkeiten sind alle CorA Proteine in den Sekundär- und Tertiärstrukturen bis auf die äußersten N-terminalen β -Faltblätter selbst zwischen Pro- und Eukaryonten hoch konserviert (Lunin *et al.* 2006; Maguire 2006a; Maguire 2006b). Auch die Membrantopologie sowie die Kristallstruktur der cytosolischen Domäne von ZntB entsprechen der von CorA (Caldwell und Smith 2003; Tan *et al.* 2009).

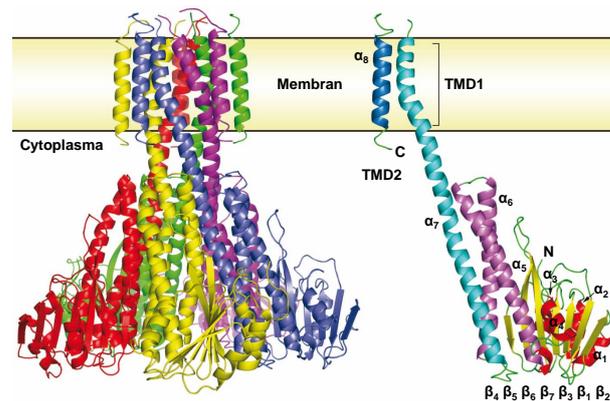


Abbildung 1.2. Kristallstrukturanalyse des CorA Mg^{2+} -Transporters aus dem Bakterium *Thermotoga maritima*.

Schematische Darstellung des CorA Pentamers in der Membranebene (links) und Aufbau einer einzelnen Untereinheit (rechts) mit TMD2 (dunkelblau), der *stalk*-Helix mit TMD1 (hellblau), den *willow*-Helices (violett) und den verbleibenden α -Helices (rot) bzw. β -Faltblättern (gelb). Abbildung modifiziert nach Lunin *et al.* (2006).

Die CorA Superfamilie lässt sich in die Gruppen CorA-I und CorA-II mit bzw. ohne "MPEL" Motiv im kurzen Bereich zwischen den beiden TMD unterteilen (Smith und Maguire 1995; Kehres *et al.* 1998; Kehres und Maguire 2002; Knoop *et al.* 2005). Die CorA-I Gruppe besteht aus den Untergruppen A und B wobei die Mitglieder der Untergruppe B (z.B. *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*) möglicherweise eine andere Topologie (drei TMD und Homotetramer) besitzen als *Thermotoga maritima* (zwei TMD und Homopentamer) aus Untergruppe A (Smith *et al.* 1993a; Warren *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006; Niegowski und Eshaghi 2007). Die Mitglieder der CorA-II Gruppe sind möglicherweise für den Export von bisher nicht identifizierten Ionen verantwortlich, transportieren aber kein Magnesium (Kehres und Maguire 2002). Über die phylogenetische Verwandtschaft hinaus sind CorA Transporter bei *Archaea* und *Bacteria* funktionsgleich und ein prokaryontisches CorA kann sogar sein eukaryontisches Homolog Mrs2p ersetzen (Smith *et al.* 1998a; Bui *et al.* 1999; Gregan *et al.* 2001b). Innerhalb der Prokaryonten existieren außerdem CorA-ähnliche Proteine wie der Zn²⁺-Transporter ZntB aus *Salmonella typhimurium*, welcher statt des "GMN" Motivs der Magnesiumtransporter ein "GVN" besitzt. Eine *Salmonella* $\Delta zntB$ Mutante besitzt erhöhte Sensitivität gegenüber Zn²⁺ und Cd²⁺, wird jedoch von den CorA Substraten Co²⁺ und Ni²⁺ nicht beeinflusst. Im Unterschied zum CorA aus *Methanococcus jannaschii* ist der ZntB Transporter offenbar nicht in der Lage, die Aufnahme von Mg²⁺ in die *Salmonella* Tripelmutante zu vermitteln (Worlock und Smith 2002).

Untersuchungen zur Interaktion von CorA mit Magnesium und anderen Ionen sowie Messungen der Transportkinetik führten zu dem Ergebnis, dass [Co(III)(NH₃)₆]³⁺ und Hexaamminkomplexe mit anderen Kationen nur diesen Kanal selektiv blockieren. Die Komplexe entsprechen zwar nicht in der Ladung aber in der Größe dem vollständig hydratisierten Mg-Ion, so dass dieses wahrscheinlich aufgrund seines Volumens durch den Transporter erkannt wird (Kucharski *et al.* 2000; Hu *et al.* 2009; Moomaw und Maguire 2010). CorA Proteine transportieren Mg²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺, aber nicht Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ oder Fe²⁺ (Snively *et al.* 1989b; Papp und Maguire 2004; Moomaw und Maguire 2008). Die K_m-Werte für Mg²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺ sind 10 - 20 μ M, 20 - 40 μ M bzw. 200 - 400 μ M, d.h. unter physiologischen Bedingungen kommt nur Magnesium als Substrat in Frage, da die anderen Ionen bei diesen Konzentrationen auf *Salmonella* bereits toxisch wirken (Hmiel *et al.* 1986; Snively *et al.* 1989b; Kehres und Maguire 2002; Wang *et al.* 2006; Maguire 2006b). Die treibende Kraft für die Magnesiumaufnahme von Bakterienzellen durch den CorA Transporter ist das einwärts gerichtete negative Membranpotential ($\Delta\Psi$) von etwa 150 mV (Froschauer *et al.* 2004). Bei hoher Mg-Verfügbarkeit im Medium kann CorA in *Salmonella* auch den Austritt von Magnesium vermitteln, jedoch nur wenn eine Konzentration von 0,5 mM überschritten wird und darüber hinaus entweder der *CorB*, *CorC* oder *CorD* Locus intakt vorliegt (Gibson *et al.* 1991). Die Funktion der Genprodukte aus diesen drei Loci im Zusammenhang mit dem CorA Transportsystem ist derzeit nicht bekannt.

Die Regulation des Transports von Magnesium über CorA erfolgt nicht auf der Transkriptionsebene, da der Kanal gemäß den bislang durchgeführten Promotorstudien konstitutiv und gleichmässig exprimiert wird (Smith *et al.* 1998c; Tao *et al.* 1998). Offenbar erlaubt ein Sensor für [Mg²⁺]_{cyt} in der N-terminalen Domäne über die Koordination von Mg²⁺ mit Carboxylatresten von Asparagin- und Glutaminsäuren eine allosterische Regulation, in dem er die Konformation

des geschlossenen Kanals stabilisiert. Bei niedrigen cytosolischen Magnesiumkonzentrationen könnten diese Metallbindungsstellen frei vorliegen und somit eine Konformationsänderung und die Öffnung des Kanals bewirken (Niegowski und Eshaghi 2007; Payandeh *et al.* 2008; Chakrabarti *et al.* 2010; Dalmas *et al.* 2010).

Struktur und Funktion von MgtA/MgtB

In Bakterien wurden MgtA und MgtB wenige Jahre nach CorA durch die Komplementation einer *Salmonella* Mutante als alternative Mg-Transportsysteme kloniert (Hmiel *et al.* 1989). Beide Proteine sind P-Typ ATPasen (Tao *et al.* 1995; Snavely *et al.* 1991a), und zu MgtA und MgtB homologe Transporter sind sowohl in *Bacteria* als auch *Archaea* weit verbreitet, allerdings nicht so ubiquitär wie CorA. In der Familie der *Enterobacteriaceae* ist in nur drei von zehn untersuchten Species neben MgtA auch MgtB vorhanden. MgtA stellt also wahrscheinlich den endogenen Vertreter dar, während MgtB durch Genduplikation und horizontalen Gentransfer in Bakteriengattungen wie *Salmonella* gelangt sein könnte (Blanc-Potard und Groisman 1997; Maguire 2006b). MgtA und MgtB haben aufgrund ihrer Proteinsequenz mit einer Länge von mehr als 900 Aminosäuren und der Topologie bestehend aus 10 Transmembransegmenten eine größere Ähnlichkeit zu eukaryontischen als zu prokaryontischen P-Typ ATPasen (Smith *et al.* 1993b; Smith und Maguire 1998). Derzeit sind keine dreidimensionalen Strukturdaten zu den MgtA oder MgtB Proteinen verfügbar. Die im Allgemeinen angenommene Topologie wird aber durch die Kristallstruktur einer homologen sarko(endo)plasmatischen P-Typ Ca^{2+} -ATPase aus Wirbeltieren bestätigt (Toyoshima *et al.* 2000; Maguire 2006b).

Proteine der MgtA/MgtB Familie transportieren Mg^{2+} und Ni^{2+} mit einer Affinität von 5 - 20 μM bzw. 2 - 5 μM , jedoch weder Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} noch Zn^{2+} (Snavely *et al.* 1989b; Maguire 2006b). Die reguläre Funktion einer P-Typ ATPase ist der Transport von Kationen aus dem Cytosol entgegen ihres elektrochemischen Gradienten unter Aufwendung von Energie, welche durch die hydrolytische Spaltung von ATP gewonnen wird. MgtA und MgtB transportieren Mg^{2+} jedoch entlang dieses Gradienten in das Cytosol. Daher ist die physiologische Notwendigkeit einer ATP-Hydrolyse nach bisherigen Erkenntnissen nicht erklärbar. Die tatsächliche Funktion von MgtA und MgtB ist möglicherweise nicht die eines Mg-Transporters, so dass Mg^{2+} nicht das primäre Substrat sondern einen essentiellen Co-Faktor für den Transport einer bislang unbekannt Substanz darstellt (Smith und Maguire 1998; Kehres und Maguire 2002; Maguire 2006b).

Die Regulation von MgtA und MgtB erfolgt in *Salmonella* durch das PhoP-PhoQ Zwei-Komponenten-System. Wenn im Medium genug Mg^{2+} vorhanden ist, bindet es an die PhoQ Membransensor-Kinase, welche dadurch nicht mehr zur Autophosphorylierung und Transaktivierung des Transkriptionsfaktors PhoP in der Lage ist (García-Véscovi *et al.* 1996; Véscovi *et al.* 1997; Groisman 2001). Im umgekehrten Fall wird bei Abwesenheit von Magnesium zuerst PhoQ und anschließend PhoP phosphoryliert und dadurch unter anderem die Transkription von MgtA und MgtB induziert. Untersuchungen in *Salmonella* zeigen, dass die Regulation biphasisch verläuft und sensitiv gegenüber sauren pH-Werten ist. Die MgtA/MgtB Expression wird bei weniger als 1 mM Magnesium im Medium zum ersten Mal nach 30 - 60 min um mehrere hundertfach indu-

ziert und erreicht ihr Maximum nach 4 - 6 h. Eine zweite Induktion erfolgt bei Konzentrationen im unteren μM Bereich nach 6 - 12 h und erhöht die Transkription mehrtausendfach (Snavely *et al.* 1991b; Tao *et al.* 1998). Der pathogene Befall von eukaryontischen Zellen durch *Salmonella* induziert unmittelbar dessen Expression von MgtA und MgtB um das hundertfache und steigert die Überlebensfähigkeit in Makrophagen und damit die Virulenz der Bakterien (Blanc-Potard und Groisman 1997; Smith *et al.* 1998c). Die 5'-UTR von *MgtA* enthält zusätzlich einen RNA-Sensor für intrazelluläres Mg^{2+} in Form eines *Riboswitch*, welcher über die Bildung einer Haarnadelstruktur die Transkription des Gens regulieren kann (Cromie *et al.* 2006; Cromie und Groisman 2010). Mutationen in diesem Schalter können eine konstitutiv erhöhte Expression von *MgtA* und gesteigerte Resistenz gegenüber hohen Temperaturen bewirken (O'Connor *et al.* 2009).

Struktur und Funktion von MgtE

Das Gen für MgtE wurde ursprünglich aus *Bacillus firmus* OF4 und anschließend aus *Providencia stuartii* kloniert und durch Komplementation der *Salmonella* ΔcorA ΔmgtA ΔmgtB Tripelmutante als funktioneller Mg^{2+} -Transporter identifiziert (Smith *et al.* 1995; Townsend *et al.* 1995). Das Protein besitzt eine Länge von etwa 320 Aminosäuren und ist wahrscheinlich das primäre Transportsystem für Magnesium in den Prokaryonten, die kein CorA Homolog besitzen (Kehres *et al.* 1998). Es ist ähnlich weit verbreitet wie CorA und nur ein Drittel der bislang sequenzierten Mikroorganismen besitzen offenbar beide Systeme. Außerdem sind zwei CorA/MgtE Hybride in *Dechloromonas aromatica* und *Magnetospirillum magnetotacticum* vorhanden (Knoop *et al.* 2005). MgtE kommt sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien und vergleichbar häufig auch in *Archaeen* vor (Townsend *et al.* 1995; Maguire 2006b). Die Kristallstruktur des MgtE Proteins aus *Thermus thermophilus* zeigt, dass der funktionelle Komplex aus zwei Monomeren mit jeweils fünf Transmembransegmenten gebildet wird. Die cytosolische Domäne am N-Terminus enthält zahlreiche saure Seitenreste und ist in zwei Subdomänen unterteilt, welche als N- bzw CBS-Domäne bezeichnet werden (Hattori *et al.* 2007).

Der MgtE Komplex transportiert Mg^{2+} und Co^{2+} mit einer Affinität von $50 \mu\text{M}$ bzw. $80 \mu\text{M}$, aber weder Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} noch Zn^{2+} , welche jedoch die Aufnahme von Mg^{2+} und Co^{2+} inhibieren. Für den Transport ist ein elektrochemischer Gradient nötig, da im Protein keine für die ATP-Hydrolyse notwendige Nukleotidbindestelle vorhanden ist (Smith *et al.* 1995; Kehres und Maguire 2002; Maguire 2006b). MgtE ist an der Anhaftung von *Aeromonas hydrophila* an Säugtierzellen und der Bildung von Biofilmen beteiligt und somit wie auch CorA und MgtA/MgtB ein Virulenzfaktor in pathogenen Bakterien (Merino *et al.* 2001). In *Bacillus subtilis* enthält der *MgtE* Promotor einen Mg^{2+} -abhängigen *Riboswitch* (Dann *et al.* 2007), welcher wie bei *MgtA* die Transkription abhängig von der Magnesiumverfügbarkeit im Cytoplasma reguliert (Cromie *et al.* 2006). Obwohl keine strukturelle Ähnlichkeit zu CorA vorliegt, dienen auch bei MgtE Teile der cytosolischen Domäne als Mg^{2+} -Sensor und ermöglichen durch Konformationsänderung eine allosterische Regulation des Ionentransportes durch die Pore (Hattori *et al.* 2007; Moomaw und Maguire 2008; Hattori *et al.* 2009).

1.2.2. Proteine für den Magnesiumtransport in Eukaryonten

In höheren Organismen sind nach bisherigen Kenntnissen keine eindeutigen MgtA/MgtB Homologe vorhanden. Es besteht jedoch eine hohe Ähnlichkeit zu den P-Typ ATPasen der Säugetiere, welche nicht Mg^{2+} sondern Ca^{2+} transportieren (Smith und Maguire 1998; Kehres und Maguire 2002; Maguire 2006b). In vielen Eukaryonten sind hingegen die CorA-ähnlichen Proteine essentielle Mg^{2+} -Transporter, aber bei den Wirbeltieren sind sie offenbar nur noch für die Magnesiumaufnahme in den Mitochondrien verantwortlich. Die CorA-ähnlichen Proteine der Pilze und vor allem die der Landpflanzen besitzen dagegen eine höhere Vielfalt an (sub)zellulären Funktionen. Einige Eukaryonten und insbesondere die Metazoa wiederum weisen zahlreiche neue Klassen von Mg^{2+} -Transportern auf, die bislang nicht in den Prokaryonten gefunden wurden. Homologe Proteine des prokaryontischen MgtE Transporters hingegen wurden in Tieren wie z.B. *Caenorhabditis elegans* und dem Menschen, jedoch weder in Pflanzen noch in Pilzen gefunden (Moomaw und Maguire 2008). Im Zentrum dieser Arbeit stehen vornehmlich die CorA-ähnlichen Proteine der Eukaryonten und ihre Diversifizierung im Pflanzenreich.

CorA ähnliche Proteine in Pilzen

Die Identität der MRS2 (*Mitochondrial RNA splicing*) Proteine als eukaryontische Magnesiumtransporter wurde erst gut zehn Jahre nach der Entdeckung ihrer Beteiligung am Spleißen der mitochondrialen Gruppe II Introns in den späten 80er Jahren des letzten Jahrhunderts erkannt (Koll *et al.* 1987; Wiesenberger *et al.* 1992; Bui *et al.* 1999). Statt einer ursprünglich angenommenen direkten Mitwirkung am Spleißvorgang im Hefemitochondrium ist es vielmehr das durch Mrs2p transportierte Magnesium, welches als Co-Faktor für die Ribozymfunktion unentbehrlich ist und bei Deletion von Mrs2p zu einem *petite* Phänotyp führt (Waldherr *et al.* 1993; Schmidt *et al.* 1998; Gregan *et al.* 2001a). Mrs2p ist ein essentieller Bestandteil des elektrophoretischen Mg^{2+} -Transportsystems der inneren Mitochondrienmembran, wird wie CorA über das negative Membranpotential ($\Delta\Psi$) von -130 bis -160 mV angetrieben und durch Cobalt(III)hexaammin blockiert. Es besitzt ebenfalls zwei Transmembrandomänen und der funktionelle Komplex ist vermutlich auch ein Homopentamer (Kolisek *et al.* 2003). Der genaue dreidimensionale Aufbau des Mrs2p Transporters wird derzeit durch Kristallstrukturanalysen ermittelt (Khan *et al.* 2010). Durch Mutationsanalysen konservierter Aminosäuren und Transportmessungen mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik ist Mrs2p der mit Abstand am besten charakterisierte Mg^{2+} -Transporter unter allen eukaryontischen CorA-ähnlichen Proteinen (Weghuber *et al.* 2006; Schindl *et al.* 2007). Darüber hinaus ist in der inneren Membran des Hefemitochondriums noch das zu Mrs2p homologe Lpe10p mit ebenfalls zwei Transmembrandomänen sowie GMN Motiv vorhanden, und die beiden Proteine sind zu 32% sequenzidentisch. Eine Deletion von *LPE10* führt wie bei *MRS2* zu einem *petite* Phänotyp und zu Defekten beim Spleißen von Gruppe II Introns. Obwohl die Proteine funktionelle Homologe zu sein scheinen, können sie einander nicht einfach ersetzen. Das bakterielle CorA hingegen kann sowohl die $\Delta mrs2$ als auch die $\Delta lpe10$ Mutante zumindest teilweise komplementieren (Bui *et al.* 1999; Gregan *et al.* 2001b). Der Verlust von

Lpe10p führt zu einem deutlichen Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials und die Interaktion mit dem Mrs2p Kanal ist von zentraler Bedeutung für den Transport von Mg^{2+} in die Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* (Sponder *et al.* 2010).

Die ebenfalls zum bakteriellen CorA homologen Proteine Alr1 und Alr2 sitzen in der Plasmamembran der Hefe und dienen dort vermutlich als hochaffines Aufnahmesystem für Magnesium. Hefemutanten, die keines der beiden *ALR* Gene besitzen, sind in ihrem Wachstum von zusätzlichem Magnesium abhängig, und die Expression von einem der beiden Gene kann diesen Phänotyp wieder aufheben (MacDiarmid und Gardner 1998). Die Überexpression von *ALR1* und *ALR2* vermittelt durch verbesserte Mg^{2+} -Aufnahme Toleranz gegenüber den trivalenten Kationen Al^{3+} und Ga^{3+} , erhöht aber auch die Sensitivität gegenüber Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} und La^{3+} . Die Untersuchung einer *alr1Δ alr2Δ* Doppelmutante mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik zeigt, dass eine erhöhte Expression von *ALR1* mit beträchtlichen Mg^{2+} -abhängigen Stromstärken verbunden ist und Alr1p daher vermutlich einen Kanal darstellt (Liu *et al.* 2002). Darüber hinaus ist Alr1p in *Saccharomyces* bei der Cd^{2+} -Detoxifikation beteiligt (Kern *et al.* 2005). Alr1p und Alr2p besitzen also im Vergleich zu CorA trotz struktureller Ähnlichkeit ein deutlich breiteres Spektrum an Substraten. Die Transkription von *ALR1* ist bei Magnesiummangel hochreguliert und der Abbau des Alr1 Proteins bei Mg^{2+} -Überschuss ist abhängig von Ubiquitinierung und Endozytose (Graschopf *et al.* 2001). Alr1p und Alr2p bilden sowohl Homo- als auch Heterooligomere. Daher können sich Mutationen in einem der beiden Proteine dominant-negativ auf den Magnesiumtransport auswirken (Wachek *et al.* 2006). Ebenso wie bei Mrs2p wurden in Alr1p zahlreiche konservierte Aminosäuren identifiziert, welche für die Mg^{2+} -Transportfunktion essentiell sind (Lee und Gardner 2006).

Mit dem Mnr2 Protein wurde erst kürzlich ein fünftes CorA Homolog in *Saccharomyces* identifiziert, welches ebenfalls an der Magnesiumhomöostase beteiligt ist. Ersten Untersuchungen zufolge dient Mnr2p der Speicherung von Mg^{2+} in der Hefevakuole, kann aber durch Überexpression den Phänotyp der *alr1Δ alr2Δ* Mutante zu einem Großteil aufheben (Pisat *et al.* 2009).

CorA ähnliche Proteine in Protisten und Metazoa

MRS2-ähnliche Proteine existieren auch in Protisten und Metazoa. Die Proteine MGT1 und MGT2 aus *Leishmania major* zeigen durch ihr 2-TM-GMN Bauprinzip Homologie zum bakteriellen CorA und sind für das Überleben des Parasiten bei geringer Magnesiumverfügbarkeit im Phagosom der Makrophagen unverzichtbar (Zhu *et al.* 2009). Die MRS2-ähnlichen Proteine treten innerhalb der Metazoa eigentümlicherweise erst wieder in den Wirbeltieren mit einem Vertreter pro Organismus auf und bilden dort das mitochondriale Mg^{2+} -Transportsystem (Knoop *et al.* 2005). Das humane Mrs2 Protein ist nicht nur in seinem Aufbau gegenüber den homologen *Saccharomyces* Proteinen Mrs2 und Lpe10 sehr ähnlich, sondern kann auch ohne weiteres die *mrs2Δ* Hefemutante komplementieren (Zsurka *et al.* 2001). Ein konditioneller *Knockdown* von *hMRS2* führt zu einem verringerten Mg^{2+} -Gehalt in Mitochondrien sowie einer reduzierten Aufnahmekapazität für Magnesium. Die langfristige Unterdrückung bewirkt den Verlust von Komplex I der Atmungskette, Abfall des Membranpotentials und Zelltod (Piskacek *et al.* 2009).

Darüber hinaus fördert das humane Mrs2 Protein in Magenkrebszellen die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Medikamenten (Chen *et al.* 2009a; Wolf und Trapani 2009). Ein Defekt des entsprechenden Gens in Ratten verursacht Demyelinisation der Nervenzellen und zeigt, dass die Magnesiumhomöostase in den Mitochondrien des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle für dessen Erhalt spielt (Kuramoto *et al.* 2011).

CorA ähnliche Proteine in Pflanzen

Im Vergleich zu den Prokaryonten und den Pilzen ist das Wissen über die molekularen Mechanismen des Mg^{2+} -Transports in Pflanzen sehr begrenzt. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Mrs2 Protein der Hefe wurde in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu Beginn des neuen Jahrtausends eine Genfamilie von entfernt verwandten Homologen durch zwei Arbeitsgruppen entdeckt und unabhängig voneinander unter dem Namen *AtMRS2* bzw. *AtMGT* publiziert (Schock *et al.* 2000; Li *et al.* 2001). Phylogenetische Untersuchungen zeigen eine Expansion der MRS2 Proteine in den Pflanzengenomen bereits ab den frühen Landpflanzen mit einer Unterteilung in fünf Kladen in allen bisher sequenzierten Pflanzengenomen (Knoop *et al.* 2005; Gebert *et al.* 2009). Eine Vielzahl unabhängiger Genduplikationen dient möglicherweise der speziellen Anpassungen einzelner Taxa an bestimmte Umweltbedingungen oder ermöglicht die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression einzelner Mitglieder (Abb. 1.3). Einige der pflanzlichen MRS2 Proteine können die bakterielle $\Delta corA \Delta mgtA \Delta mgtB$ Mutante oder die *mrs2* Δ bzw. *alr1* Δ *alr2* Δ Hefemutanten komplementieren (Schock *et al.* 2000; Li *et al.* 2001; Drummond *et al.* 2006; Li *et al.* 2008; Mao *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b). Über die elf Mitglieder der Kladen A bis E hinaus, von denen im Ökotyp Columbia zwei als Pseudogen vorliegen, existieren in *Arabidopsis* vier weiter entfernte CorA-ähnliche Proteine in zwei Kladen, die bisher noch nicht weiter charakterisiert sind (Knoop *et al.* 2005).

1.3. Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation soll die Erforschung der physiologischen Bedeutung von pflanzlichen MRS2 Proteinen für den Magnesiumtransport unter Verwendung der drei Modellorganismen *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* behandelt werden. Durch vorangegangene Arbeiten war bekannt, dass der *Knockout* von *MRS2-7* als bisher einziges *MRS2* Gen einen Mg-abhängigen Phänotyp bei limitierter Verfügbarkeit hervorruft. Um das bestehende Bild zu erweitern, ist die Herstellung von weiteren *MRS2* Mutanten und deren physiologische Charakterisierung nach dem Genverlust ein wichtiges Ziel dieser Studie. Zusätzlich soll durch die Wiederherstellung bzw. Überexpression von *MRS2-7* in der *Knockout*-Mutante dessen Beteiligung an physiologischen Prozessen, wie z.B. der Toleranz gegenüber toxischem Aluminium, untersucht werden. Ein weiteres Ziel der experimentellen Arbeiten ist die teilweise noch unbekannt subzelluläre Lokalisation von MRS2 Proteinen durch GFP-Fusion und Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* zu bestimmen. Durch Komplementationsversuche in einer Hefe-Mutante soll die Funktionalität von MRS2 Proteinen überprüft und deren Transportkinetik

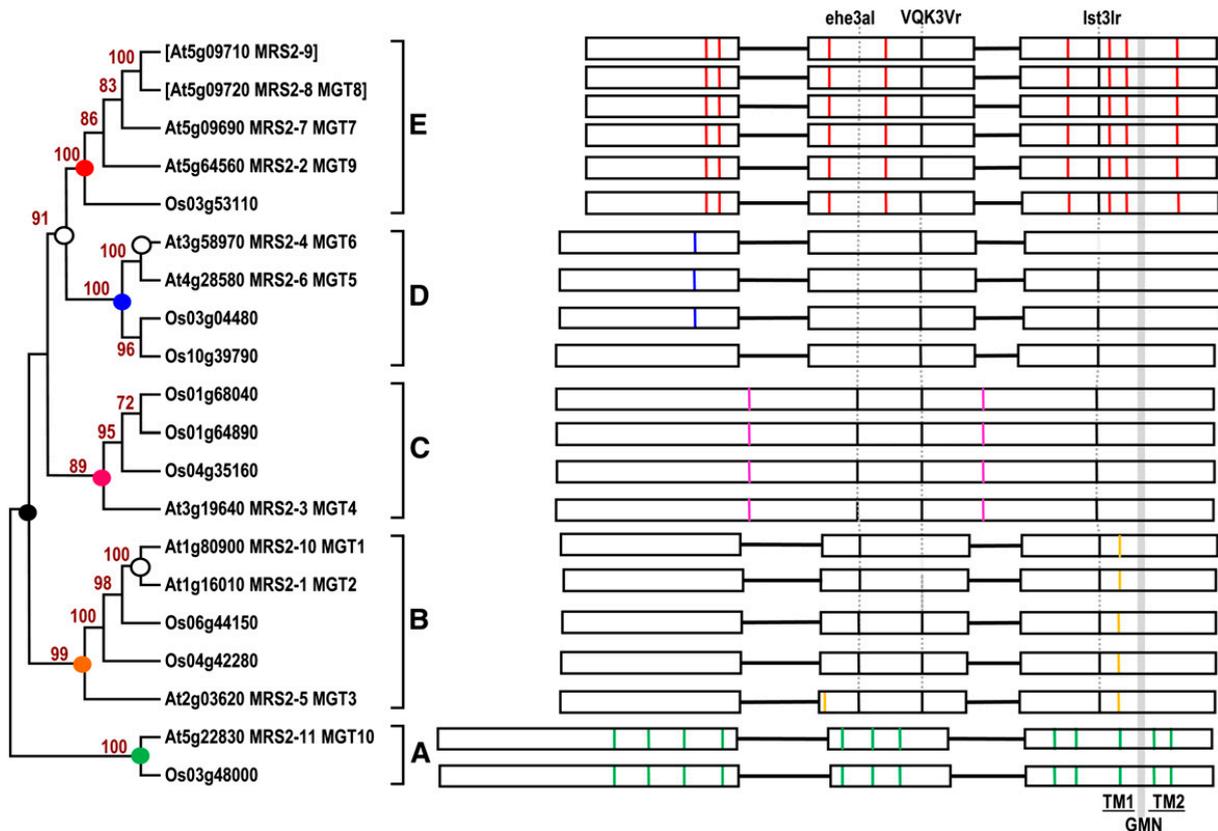


Abbildung 1.3. Phylogenie der *Arabidopsis thaliana* (At) und *Oryza sativa* (Os) MRS2/MGT Mg²⁺-Transporterfamilien.

Verwandtschaftsverhältnis der Familienmitglieder mit *Bootstrap*-Werten zur statistischen Unterstützung der Knoten ab 70% Wahrscheinlichkeit (Kladogramm links). Neben den Standardbezeichnungen der chromosomalen Loci sind die alternativ von Schock *et al.* (2000) und Li *et al.* (2001) vorgeschlagenen *Arabidopsis* MRS2 bzw. MGT Nomenklaturen angegeben. Die Pseudogene MRS2-8 und MRS2-9 im *Arabidopsis* Ökotyp Col-0 sind mit eckigen Klammern gekennzeichnet. Die Kladen A bis E der Genfamilie sind durch statistische Analysen und charakteristische, sehr alte und für jede Klade spezifische Intronmuster unterstützt. Gewinne (bunte Kreise) und Verluste (leere Kreise) von Introns lassen sich nach dem Prinzip der Sparsamkeit auf den sequenzbasierten Baum übertragen. Das Vorhandensein der Introns in der jeweiligen codierenden Sequenz ist durch farbige vertikale Linien im rechten Teil der Darstellung eingezeichnet. Abbildung verändert nach Gebert *et al.* (2009).

durch das mag-fura 2 System charakterisiert werden. Die Herstellung eines alternativen bakteriellen Modellsystems zur Untersuchung von Mg-Transportproteinen ist darüber hinaus ein weiterer Bestandteil dieser Doktorarbeit.

2. Ergebnisse

2.1. Erzeugung und molekulare Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana* *MRS2* Mutanten

Ausgangspunkt für die hier vorliegende Untersuchung waren zwei vorangegangene Diplomarbeiten, in denen die Herstellung und Charakterisierung von ersten Inaktivierungsmutanten der *MRS2* Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* verfolgt wurde (Lee 2005; Gebert 2006). Die von Julia Lee angefertigte Arbeit bediente sich einer Strategie zur Inaktivierung der Mitglieder der *MRS2* Genfamilie via post-transkriptionaler Genregulation (*Knockdown*) durch RNA-Interferenz (RNAi), während in der zweiten Arbeit die Auswirkungen eines vollständigen Genverlustes mit Hilfe von T-DNA-Insertionsmutanten (*Knockout*) untersucht wurden. In beiden Fällen konnten transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzenlinien hergestellt werden, in denen die Transkription einzelner *MRS2* Gene entweder herunterreguliert oder sogar vollständig verloren gegangen war. Phänotypisch ließ sich bei T-DNA-Insertionsmutanten für das Gen *MRS2-7* eine verminderte Toleranz gegenüber niedrigen Magnesiumkonzentrationen in hydroponischen Kultursystemen beobachten. Die Inaktivierung anderer *MRS2* Gene (Abb. 1.3 durch T-DNA-Insertionen konnte entweder nicht erreicht werden (z.B. *MRS2-2* und *MRS2-6*), oder führte zu keinem vergleichbaren Phänotyp (z.B. *MRS2-1* und *MRS2-5*). Die phänotypische Untersuchung der RNAi-Linien auf veränderte Magnesiumanforderungen ergab keine eindeutigen Resultate, da durch die notwendige Selektion der transgenen Pflanzen diese im Wachstum eingeschränkt und daher nicht mit der Wildtypkontrolle vergleichbar waren.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit sollte es unter anderem sein, einzelne T-DNA-Insertionslinien zu kreuzen, um damit multiple *MRS2* Gene auszuschalten. Auf diese Weise könnte die Möglichkeit funktionaler Redundanz innerhalb der Genfamilie mit teils sehr eng verwandten Mitgliedern (z.B. *MRS2-1* und *MRS2-10*) untersucht werden, welche eventuell für das Ausbleiben eines phänotypisch erkennbaren Merkmals bei Inaktivierung nur eines einzelnen Gens verantwortlich ist. Ein anderer Teil dieser Arbeiten war die Herstellung homozygoter RNAi-Pflanzenlinien, um die Notwendigkeit der Selektion durch Antibiotika zu umgehen, und die Bestimmung der verbleibenden *MRS2* Transkriptmenge mittels quantitativer *real-time* Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) in diesen Linien.

2.1.1. Herstellung von multiplen *Knockout*-Linien durch Kreuzung von T-DNA-Insertionsmutanten

Zur Herstellung von Mutanten mit T-DNA-Insertionen in zwei oder mehr *MRS2* Genen wurden die bereits vorhandenen *Knockout*-Linien für *MRS2-1* und *MRS2-5* verwendet und zusätzlich eine bereits homozygote T-DNA-Linie für *MRS2-10* aus der T-DNA-Kollektion des *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bestellt (Alonso *et al.* 2003). Diese drei Gene bilden zusammen die Klade B innerhalb der *MRS2* Genfamilie (Abb. 1.3). *MRS2-1* und *MRS2-10* sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 89 % identisch, während das *MRS2-5* Protein zu 53 % mit *MRS2-1* bzw. zu 51 % mit *MRS2-10* übereinstimmt. Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen legten nahe, dass zwei oder sogar alle drei dieser *MRS2* Proteine in ihrer Funktion redundant sind, so dass die Inaktivierung von nur einem der entsprechenden Gene nicht direkt zu einem sichtbaren Phänotyp führte. Tabelle 2.1 fasst die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Kreuzungen zusammen.

Tabelle 2.1. Zusammenfassung der durchgeführten Kreuzungen von homozygoten T-DNA-Insertionslinien.

Elternlinie 1		Elternlinie 2	F ₁ -Generation
<i>mrs2-1</i> -/-	×	<i>mrs2-5</i> -/-	<i>mrs2-1</i> +/- <i>mrs2-5</i> +/-
<i>mrs2-1</i> -/-	×	<i>mrs2-10</i> -/-	<i>mrs2-1</i> +/- <i>mrs2-10</i> +/-
<i>mrs2-5</i> -/-	×	<i>mrs2-10</i> -/-	<i>mrs2-5</i> +/- <i>mrs2-10</i> +/-
<i>mrs2-1</i> -/- <i>mrs2-5</i> -/-	×	<i>mrs2-5</i> -/- <i>mrs2-10</i> -/-	<i>mrs2-1</i> +/- <i>mrs2-5</i> -/- <i>mrs2-10</i> +/-

Die Symbole hinter der Genbezeichnung zeigen an, ob auf diesem Locus eine T-DNA-Insertion homozygot (-/-) oder heterozygot (+/-) vorliegt.

2.1.2. Genotypisierung der Filialgenerationen via Polymerase-Kettenreaktion

Nach der *Agrobacterium*-vermittelten Insertion einer T-DNA in ein Allel eines Gens liegt dieses heterozygot vor. Dies gilt auch für die F₁-Generation nach Kreuzung reinerbiger T-DNA-Insertionslinien für zwei unterschiedliche Gene, in der beide Loci, in Übereinstimmung mit der ersten Mendelschen Regel, sowohl ein T-DNA- als auch ein Wildtyp-Allel besitzen (Tab. 2.1). Durch Selbstbestäubung einer heterozygoten Elternpflanze können die Nachkommen, gemäß der zweiten Mendelschen Regel, in der F₂-Generation zu 50 % ebenfalls heterozygot (+/-) oder zu jeweils 25 % homozygot für das Wildtyp- (+/+) bzw. das T-DNA-Allel (-/-) sein. Bei T-DNA-Insertionen in mehr als einem Locus fächert sich die Verteilung entsprechend weiter auf.

Die Identifizierung des Genotyps einer Pflanze erfolgt über eine PCR-basierte Strategie mit gen- und insertionsspezifischen Oligonukleotiden (Primer). Liegt in einem Genlocus nur das Wildtyp-Allel (Abb. 2.1 a) vor, können nur die genspezifischen Primer (*C_{up}* und *C_{do}*) an den DNA-Doppelstrang binden und die DNA-Polymerase ein etwa 1.000 bp großes Fragment amplifizieren. Liegt nur das T-DNA-Allel (Abb. 2.1 b) vor, bildet die Kombination eines insertionsspezifischen Primers (A oder B) mit dem genspezifischen Primer *C_{up}* jeweils ein PCR-Produkt. Die Kombination der genspezifischen Primer (*C_{up}* und *C_{do}*) jedoch führt zu keinem PCR-Produkt,

da durch die T-DNA-Insertion deren Bindungsstellen zu weit auseinander liegen, um innerhalb einer normalen Elongationsphase den DNA-Strang zu vervielfältigen. Entsprechend kommt es zur Entstehung von PCR-Produkten für alle drei Kombinationen, wenn beide Alleltypen zugleich vorliegen, die Pflanze also heterozygot ist. Abbildung 2.2 zeigt ein typisches Ergebnis für die

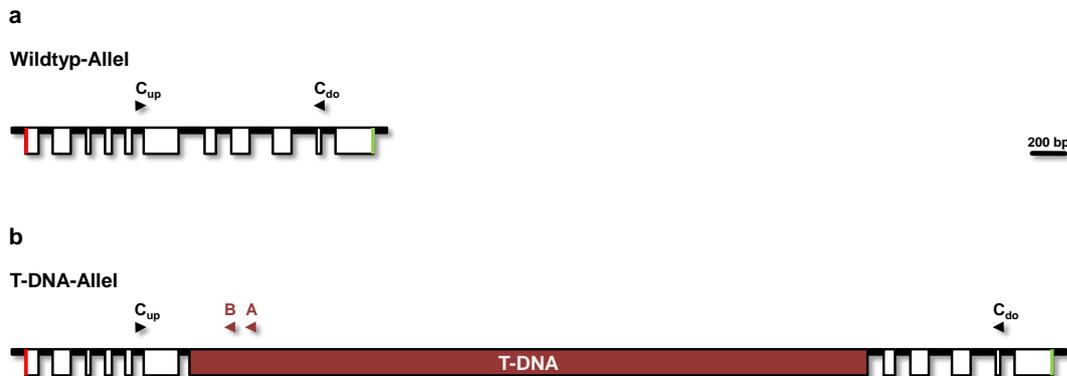


Abbildung 2.1. Primerbindungsstellen zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien am Beispiel von *mrs2-7(3)*.

(a) und (b) Dargestellt sind codierende (weiße Boxen) und nichtcodierende Bereiche (schwarze Linien) von *MRS2-7* mit Start- und Stopcodon (roter bzw. grüner Balken) sowie die T-DNA des Vektors pROK2 (dunkelrote Box). Die Oligonukleotide sind unterteilt in T-DNA-insertionsspezifische Primer (A und B) und genspezifische Primer stromaufwärts (C_{up}) bzw. stromabwärts (C_{do}) der T-DNA-Insertion. Die Pfeile zeigen Bindungsstelle und Orientierung des jeweiligen Primers auf dem DNA-Doppelstrang.

Genotypisierung von Nachkommen aus der F_1 - und der F_2 -Generation nach Kreuzung von homozygoten T-DNA-Insertionslinien für *MRS2-1* und *MRS2-5*. Während in der F_1 -Generation beide Loci heterozygot für das Insertionsallel sind (Abb. 2.2 a, links), konnte unter den Nachkommen der F_2 -Generation ein Individuum gefunden werden, welches das T-DNA-Allel an beiden Genorten homozygot trägt (Abb. 2.2 b, links). Zur Kontrolle ist außerdem der Ökotyp Col-0 gezeigt, der auf beiden Loci das homozygote Wildtyp-Allel besitzt (Abb. 2.2 a und b, rechts). Die Genotypisierung von Nachkommen aus der F_1 - und der F_2 -Generation einer Kreuzung von *mrs2-5* mit *mrs2-10* erbrachte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

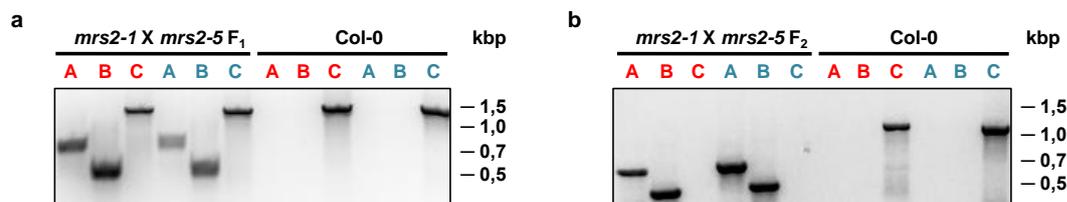


Abbildung 2.2. Genotypisierung von Nachkommen gekreuzter T-DNA-Insertionslinien und Wildtyp *Arabidopsis*.

(a) und (b) PCR-Ergebnisse mit insertions- (A und B) bzw. genspezifischen Primern (C) auf DNA von hetero- bzw. homozygoten Pflanzen der F_1 - (a) und F_2 -Generation (b) im Vergleich zu Wildtyp Col-0. Die hier untersuchten Genloci sind *MRS2-1* (rot) und *MRS2-5* (blau).

Bei dem Versuch zur Herstellung von *mrs2-1 mrs2-10* Doppel- bzw. *mrs2-1 mrs2-5 mrs2-10* Tripel-Knockout-Mutanten hingegen befanden sich unter allen auf Erde ausgesäten und kultivierten F_2 -Nachkommen keine, die auf beiden bzw. allen drei Genloci ein homozygoten T-DNA-

Allel trugen. Daher wurden Samen einer *mrs2-1* $-/-$ *mrs2-10* $+/-$ F₂- und einer *mrs2-1* $+/-$ *mrs2-5* $-/-$ *mrs2-10* $+/-$ F₁-Pflanze auf verfestigtem Medium mit zusätzlichen 10 mM MgSO₄ steril ausgesät, um einer eventuellen Magnesiumdefizienz entgegenzuwirken. Auf diese Weise gelang es, für alle Kreuzungen mindestens einen Nachkommen zu erzeugen, welcher in allen gewünschten *MRS2* Genen die T-DNA-Insertion homozygot trägt (Tab. 2.2 und Abb. 2.3 c, links).

Tabelle 2.2. Ergebnisse der Genotypisierung von Filial-Generationen multipler T-DNA-Insertionslinien.

Gekreuzte Elternlinien	n	Anzahl homozygoter T-DNA-Insertionen			
		0	1	2	3
F₂-Generation					
<i>mrs2-1</i> × <i>mrs2-5</i>	51	25 (29)	25 (19)	1 (3)	-
<i>mrs2-1</i> × <i>mrs2-10</i>	18	11 (10)	7 (7)	0 (1)	-
<i>mrs2-5</i> × <i>mrs2-10</i>	44	25 (25)	15 (17)	4 (3)	-
<i>mrs2-1</i> × <i>mrs2-5</i> × <i>mrs2-10</i>	17*	-	11 (10)	5 (6)	1 (1)
F₃-Generation					
<i>mrs2-1</i> × <i>mrs2-10</i>	13*	-	12 (10)	1 (3)	-

Die Tabelle zeigt die Anzahl untersuchter Nachkommen (n) für die jeweilige T-DNA-Insertionslinie und neben den Ergebnissen auch die gerundete Erwartung gemäß mendelscher Vererbung in Klammern. Pflanzen, die auf MS-Medium mit 10 mM MgSO₄ angezogen wurden, sind durch * gekennzeichnet.

Die Genotypisierung zeigte, dass bei Verwendung der insertionsspezifischen Primer A und B mit dem genspezifischen C_{do} Primer für *MRS2-1* gelegentlich Doppelbanden entstanden (Abb. 2.3 b, rechts und c, links). Dies lässt sich anhand der sehr hohen Übereinstimmung von 85% zwischen den *MRS2-1* und *MRS2-10* cDNA-Sequenzen erklären. Der C_{do} Primer für *MRS2-1* ist zu 90,5% identisch mit einem Bereich stromabwärts der T-DNA-Insertion in *MRS2-10* und bindet dort direkt vor dem C_{do} Primer für *MRS2-10*. Liegt also eine T-DNA in *MRS2-1* und *MRS2-10* vor, entstehen in den Ansätzen A und B (rot) durch beide Insertionen PCR-Produkte leicht unterschiedlicher Größe, so dass im Gelbild eine Doppelbande erscheint. Hierdurch kamen ebenfalls insertionsspezifische PCR-Produkte für die *mrs2-10* Einzel-Knockout-Linie mit den Primerkombinationen für *MRS2-1* zustande, obwohl dort keine T-DNA-Insertion vorlag (Abb. 2.3 b, links). Die anderen homozygoten Einzel-Knockout-Linien (Abb. 2.3 a) und der Wildtyp (Abb. 2.3 c, rechts) zeigten das erwartete Bandenmuster für die jeweiligen Allel-Konfigurationen.

2.1.3. Bestätigung des Genverlustes durch Transkriptionskontrolle

Eine homozygote T-DNA-Insertion innerhalb eines Gens sollte in der Regel durch dessen räumliche Unterbrechung zu einem vollständigen Verlust seines reifen mRNA-Transkripts und damit zu einem Gen-Knockout führen. Dies lässt sich durch Isolation von RNA aus der entsprechenden Mutante und einer anschließenden RT-PCR verifizieren. Aus der Dissertation von Karoline Meschenmoser war bereits bekannt, dass *MRS2-1* und *MRS2-5* beispielsweise in Rosettenblättern adulter *Arabidopsis* Pflanzen exprimiert werden (Meschenmoser 2008).

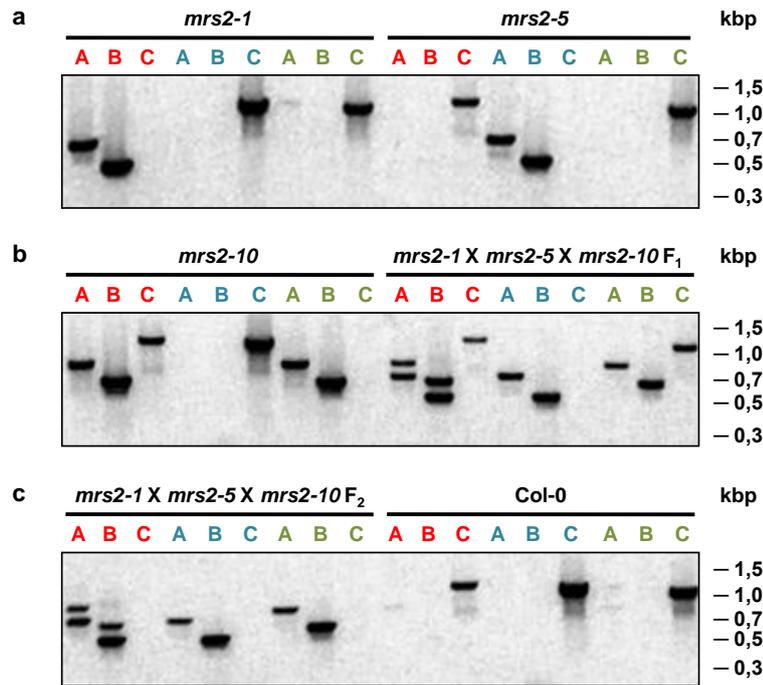


Abbildung 2.3. Genotypisierung von Einfach-*Knockout*-Linien, Nachkommen aus der F₁- und F₂-Generation einer Tripel-T-DNA-Mutante und Wildtyp *Arabidopsis*.

(a) bis (c) PCR-Ergebnisse mit T-DNA-insertions- (A und B) bzw. genspezifischen Primern (C) auf DNA von ausgewählten Genotypen. Bei den hier untersuchten Genen handelt es sich um *MRS2-1* (rot), *MRS2-5* (blau) und *MRS2-10* (grün).

Abbildung 2.4 zeigt am Beispiel der *mrs2-1 mrs2-5* Doppelmutante, dass dort, im Gegensatz zum Wildtyp Col-0, keine intakten Transkripte für *MRS2-1* und *MRS2-5* nachgewiesen werden konnten (Ansatz A und B). Die Expression anderer Mitglieder der *MRS2* Genfamilie (z.B. *MRS2-7*, Ansatz C) oder des Haushaltsgens *GAPC-1* (Ansatz D) blieb hiervon unbeeinflusst. Dies wurde ebenso für die *mrs2-5 mrs2-10* Doppel- bzw. *mrs2-1 mrs2-5 mrs2-10* Tripel-Mutante nicht genug vitales Pflanzenmaterial zur Verfügung stand (Kap. 2.1.4).

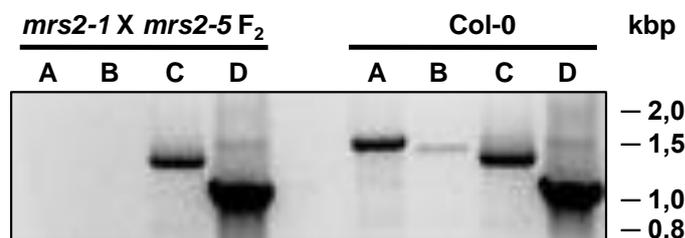


Abbildung 2.4. Transkriptionsanalyse von *MRS2* und Haushaltsgenen in Rosettenblättern der *mrs2-1 mrs2-5* Doppelmutante bzw. Wildtyp *Arabidopsis*.

Ergebnis der RT-PCRs mit Oligonukleotiden für die codierende Sequenz von *MRS2-1* (A), *MRS2-5* (B), *MRS2-7* (C) und *GAPC-1* (D).

2.1.4. Phänotypische Untersuchungen und Bestimmung des Ionenprofils von *MRS2 Knockout*-Mutanten.

Durch vorangegangene Untersuchungen in hydroponischen Kultursystemen mit unterschiedlichen Magnesiumverfügbarkeiten war bekannt, dass ein Unterschreiten einer Konzentration von $150 \mu\text{M MgSO}_4$ im Fall einer homozygoten T-DNA-Insertion in *MRS2-7* zu einem starken Wachstumsdefizit führt. Im Gegensatz hierzu zeigten der Ökotyp Columbia und die *mrs2-1* bzw. *mrs2-5* Mutante unter diesen Bedingungen keinen veränderten Phänotyp (Gebert 2006). Eine vergleichbare Studie mit der *mrs2-10* Einzel- und der *mrs2-1 mrs2-5* Doppelmutante ergab ebenfalls keine sichtbare Änderung im Wachstumsverhalten bei $50 \mu\text{M MgSO}_4$ im Medium (Abb. 2.5 b und c), ebenso wenig mit der Doppel-*Knockout*-Linie *mrs2-5 mrs2-10* (Daten nicht gezeigt).

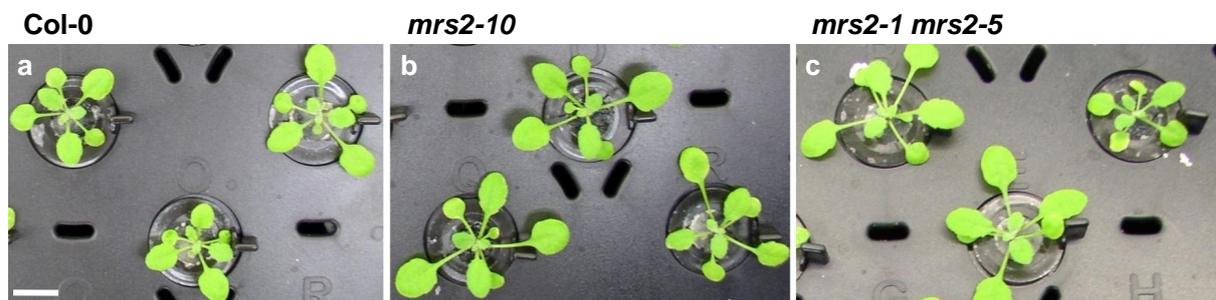


Abbildung 2.5. Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp *Arabidopsis* und verschiedenen *MRS2* Mutanten bei niedriger Mg^{2+} -Verfügbarkeit.

(a) bis (c) Hydroponische Kultur von Wildtyp Col-0 (a), *mrs2-10* (b) und *mrs2-1 mrs2-5* (c) nach drei Wochen Wachstum mit $50 \mu\text{M MgSO}_4$ im Medium. Maßstab (weißer Balken unten links) $\cong 1 \text{ cm}$.

Die auf MS-Medium + 10 mM MgSO_4 kultivierten homozygoten *mrs2-1 mrs2-10* Doppel- und *mrs2-1 mrs2-5 mrs2-10* Tripelmutanten wurden nach der Genotypisierung zur Samengewinnung auf Erde umgesetzt. Nach anfänglich gutem Anwachsen verwelkten jedoch beide Pflanzen innerhalb einer Woche, obwohl weder Wurzeln noch Blätter durch den Transfer auf Erde erkennbar beschädigt worden waren. Aus diesem Grund konnten bislang keine Nachkommen dieser *Knockout*-Linien erhalten und weiter charakterisiert werden.

Für die auf Erde kultivierbaren Nachkommen homozygoter *Knockout*-Linien wurde mit Unterstützung des *Purdue Ionomics Information Management System* (PiiMS) das zugehörige Ionenprofil des Blattgewebes durch hochsensitive Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ermittelt. Das detektierte Ionenspektrum umfasste bis zu 20 der physiologisch relevanten Elemente in Pflanzen: Lithium (Li), Bor (B), Natrium (Na), Magnesium (Mg), Phosphor (P), Schwefel (S), Kalium (K), Calcium (Ca), Mangan (Mn), Eisen (Fe), Cobalt (Co), Nickel (Ni), Kupfer (Cu), Zink (Zn), Arsen (As), Selen (Se), Rubidium (Rb), Strontium (Sr), Molybdän (Mo) und Cadmium (Cd).

Die ausgewerteten Daten für den *mrs2-1 mrs2-5* und *mrs2-5 mrs2-10* Doppel-*Knockout* zeigten in der Ionenzusammensetzung hoch signifikante ($p \leq 0,01$) Mengenänderungen einzelner Isotope im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 2.6 c und d, Tab. 2.3), während bei den ein-

fachen T-DNA-Insertionslinien *mrs2-5* und *mrs2-10* lediglich Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ erreicht wurden (Abb. 2.6 a und b, Tab. 2.3). Besonders auffällig war hierbei die um $\sim 33\%$ gestiegene Selenkonzentration in der *mrs2-5 mrs2-10* Doppelmutante, welche in den beiden zugehörigen Einzelmutanten jedoch nicht nachvollzogen werden konnte. Im Umkehrschluss ließ sich ebenfalls keine der bei *mrs2-5* und *mrs2-10* beobachteten Mengenänderungen in der korrespondierenden Doppelmutante in statistisch verlässlichem Maße nachweisen. Für die Elemente Li, Na, Mg, P, S, Mn, Fe, Cu, As, Rb, Sr und Cd wurde bei keiner Linie eine Veränderung des relativen Anteils an der Trockenmasse (ppm TM) gefunden. Ionenmessungen für die *mrs2-1* Mutante liegen derzeit nicht vor, da das dem PiiMS hierfür zur Verfügung gestellte Saatgut aus unbekanntem Gründen nicht keimfähig war.

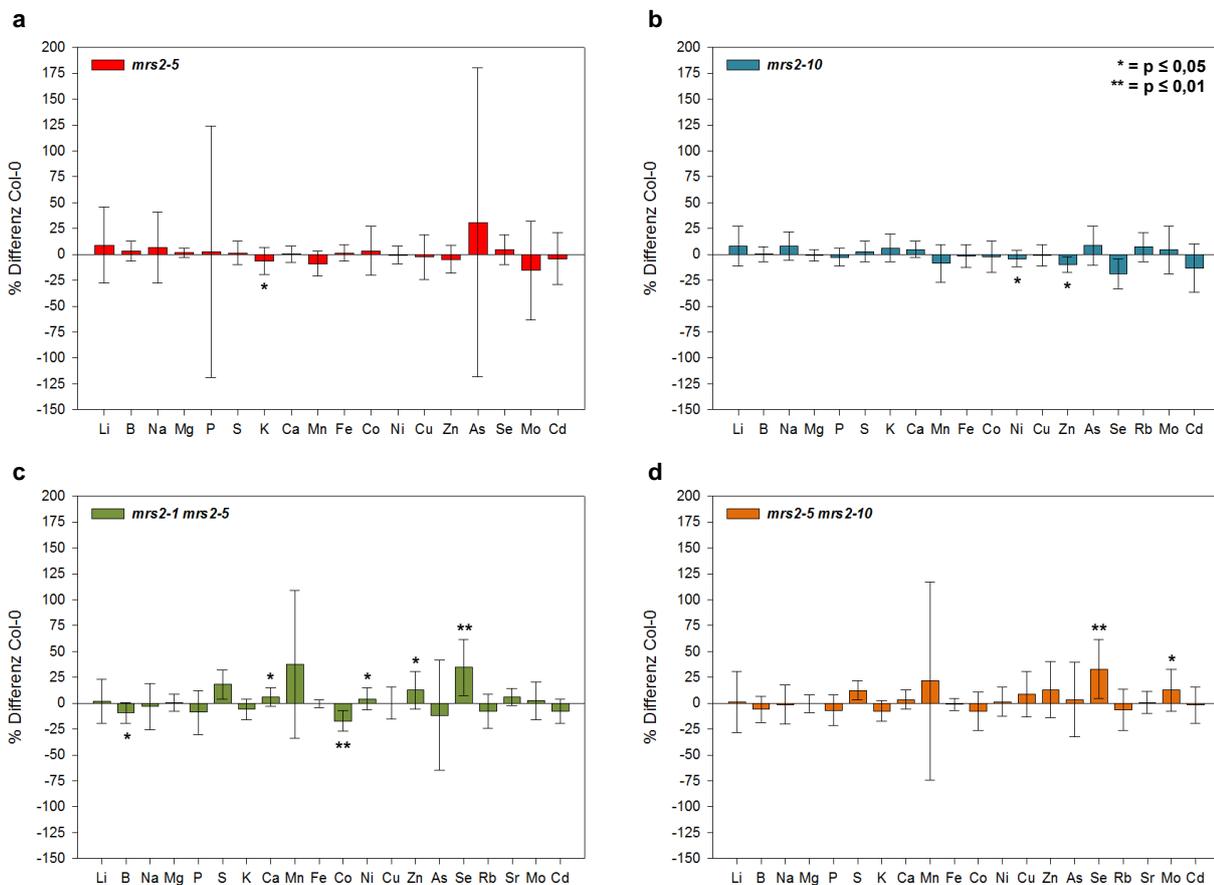


Abbildung 2.6. PiiMS Ionenprofil der Blätter von einzelnen und multiplen T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zum *Arabidopsis* Wildtyp.

(a) bis (d) Mittlere prozentuale Differenz (% Differenz) des Ionengehaltes von *mrs2-5* (a), *mrs2-10* (b), *mrs2-1 mrs2-5* (c) und *mrs2-5 mrs2-10* (d) zur Wildtyp-Referenz Col-0. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren prozentualen Standardabweichung. Die Anzahl untersuchter Pflanzen pro Linie betrug $n = 12$. Signifikante bzw. hoch signifikante Unterschiede nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test sind durch * ($p \leq 0,05$) bzw. ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

Tabelle 2.3. Signifikante Abweichungen des Ionengehaltes einzelner und multipler T-DNA-Insertionslinien vom *Arabidopsis* Wildtyp.

Linie	Isotop	Med. ppm TM	Med. % Diff.	Std. % Diff.	p-Wert	Signifikanz
<i>mrs2-5</i>	³⁹ K	51258,7 (54718,5)	-6,32	12,96	0,019	*
<i>mrs2-10</i>	⁶⁰ Ni	6,23789 (6,51146)	-4,20	7,88	0,050	*
	⁶⁶ Zn	127,605 (141,529)	-9,84	7,83	0,043	*
<i>mrs2-1 mrs2-5</i>	¹¹ B	78,6785 (86,8711)	-9,43	9,82	0,034	*
	⁴³ Ca	23183,7 (21847,6)	6,12	8,76	0,024	*
	⁵⁹ Co	0,31495 (0,38017)	-17,16	9,79	0,007	**
	⁶⁰ Ni	0,83241 (0,79989)	4,07	10,66	0,022	*
	⁶⁶ Zn	82,9421 (73,5461)	12,78	18,24	0,049	*
	⁸² Se	2,66780 (1,98192)	34,61	26,85	0,005	**
<i>mrs2-5 mrs2-10</i>	⁸² Se	2,63795 (1,98192)	33,10	28,72	0,003	**
	⁹⁸ Mo	8,88509 (7,87993)	12,76	20,30	0,043	*

Aufgeführt sind die Mediane (Med.) der ICP-MS-Daten für den relativen Anteil (ppm) des jeweiligen Isotops an der Trockenmasse (TM) in *MRS2 Knockout*-Linien bzw. der Wildtyp-Referenz Col-0 (Werte in Klammern). Außerdem zeigt die Tabelle die mittlere prozentuale Differenz (Med. % Diff.) der *Knockout*-Linien zum Wildtyp und deren Standardabweichung (Std. % Diff.). Die Anzahl untersuchter Pflanzen pro Linie betrug n = 12. Als signifikant bzw. hoch signifikant gelten Unterschiede, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (p) nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) entspricht oder unterschreitet.

2.1.5. Bestimmung von T-DNA-Insertionsorten in *MRS2* RNAi-Linien

Die Sequenzierung einer kurzen, T-DNA-flankierenden Region, eines sogenannten *flanking sequence tag* (FST), zur Bestimmung des chromosomalen Insertionsortes für die RNAi-Linie *MRS2-3:GRI5* geschah bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit. Ebenso konnte im Anschluss durch Genotypisierung mit der bereits erwähnten PCR-Strategie (Abb. 2.1) eine RNAi-Pflanze identifiziert werden, in der das T-DNA-Allel mit dem post-transkriptionellen Gen-*Silencing* (PTGS) Konstrukt für *MRS2-3* homozygot vorlag und damit auch in allen Nachfahren vorhanden war (Gebert 2006). Dieses Verfahren sollte nun verbessert und auf weitere RNAi-Linien aus der Arbeit von Julia Lee angewendet werden, da eine vollständige Inaktivierung der Gene *MRS2-2*, *MRS2-4*, *MRS2-6* und *MRS2-11* durch T-DNA-Insertionsmutanten nicht realisiert werden konnte. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis einer zweistufigen PCR mit verschachtelten Primern auf genomische DNA-Fragmente, welche mit dem Restriktionsenzym *HindIII* und anschließende Ligation eines Adaptorenfragments gewonnen wurden (Abb. 2.7 a). Durch Sequenzierung der PCR-Produkte für *MRS2-2:GRI3*, *MRS2-4:GRI19* und *MRS2-4:GRI27* und Identifikation entsprechender Bereiche im *Arabidopsis* Genom über den BLAST-Algorithmus ergaben sich drei neue T-DNA-Insertionsorte von RNAi-Konstrukten (Abb. 2.7 b). Alle ermittelten Insertionsorte liegen in intergenischen Bereichen, so dass durch die Integration der T-DNA alleine wahrscheinlich keine Genfunktionen gestört wurden. Mit nachfolgenden Genotyp-PCRs unter Verwendung von flankierenden bzw. insertionsspezifischen Primern

konnten für alle drei RNAi-Linien homozygote Nachkommen gefunden (Daten nicht gezeigt) und die Auswirkungen des PTGS näher analysiert werden.

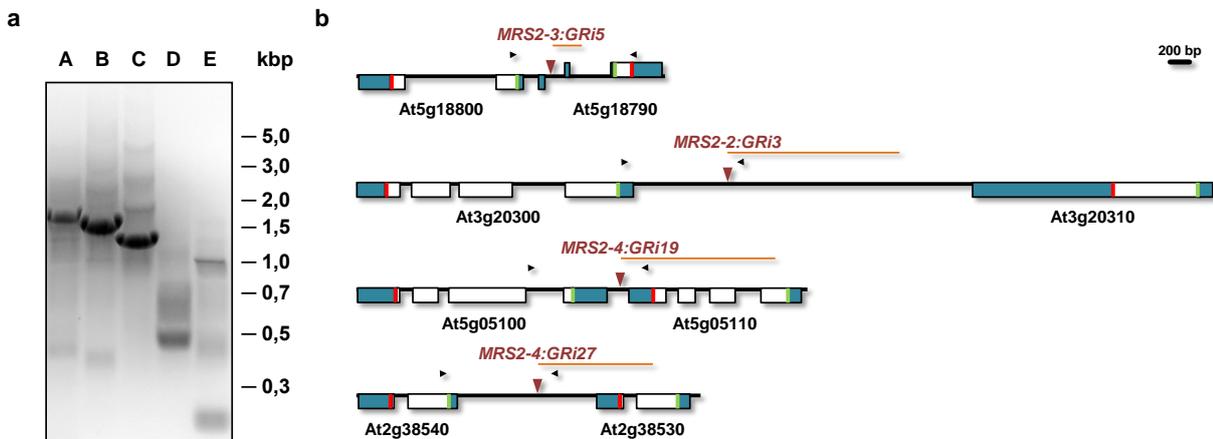


Abbildung 2.7. Sequenzierung von T-DNA-Insertionsorten im Genom von *Arabidopsis* RNAi-Linien für verschiedene *MRS2* Gene.

(a) PCR-Produkte mit T-DNA-flankierenden Bereichen (FST) für die RNAi-Linien *MRS2-2:GRI3* (A), *MRS2-4:GRI19* (B), *MRS2-4:GRI27* (C), *MRS2-11:GRI3* (D) und Wildtyp Col-0 (E). (b) Schematisierte Ausschnitte der *Arabidopsis* Chromosomen 2, 3 und 5 mit eingezeichneten T-DNA-Insertionsorten (rote Dreiecke), flankierenden Sequenzen (orange Striche) und Primerbindungsstellen für die Genotypisierung (schwarze Pfeile). Dargestellt sind außerdem Exonbereiche (weiße Boxen), untranslatierte 3'- und 5'-Regionen (blaue Boxen) sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) benachbarter Gene.

2.1.6. Quantitative Expressionsanalyse von homozygoten RNAi-Linien

Um den *Silencing*-Effekt in den nun als homozygot charakterisierten RNAi-Linien näher zu untersuchen, wurde das Transkriptionsniveau einer endogenen Kontrolle (*GAPC-2*) mit dem einzelner *MRS2* Gene durch qRT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode verglichen (Livak und Schmittgen 2001). Abbildung 2.8 a und b zeigen die Bindungsstellen der hierfür verwendeten Oligonukleotide auf dem jeweiligen Transkript und das Schmelzverhalten des resultierenden Amplikons. Eine starke Abnahme der Fluoreszenzintensität des in den DNA-Doppelstrang eingelagerten Reporters in Abhängigkeit zu einer bestimmten Temperatur gibt Aufschluss, ob ein spezifisches PCR-Produkt oder eine Mischung aus mehreren unterschiedlichen PCR-Produkten vorliegt. Die Ergebnisse der qRT-PCR mit den homozygoten RNAi-Linien *MRS2-2:GRI3*, *MRS2-3:GRI5*, *MRS2-4:GRI19* und *MRS2-4:GRI27* deuteten auf keine veränderte Expression von *MRS2-2* im Vergleich zum Wildtyp hin, während die Transkriptmengen von *MRS2-3* auf $\sim 20\%$ und von *MRS2-4* auf 30 - 50 % des ursprünglichen Expressionsniveaus reduziert sind (Abb. 2.8 c). Trotz der erfolgreichen Verringerung der relativen Genexpression von *MRS2-3* auf 1/5 der Vergleichsgruppe konnte in einem hydroponischen Wachstumsvergleich bei $50 \mu\text{M}$ MgSO_4 kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp Col-6 festgestellt werden (Abb. 2.8 d).

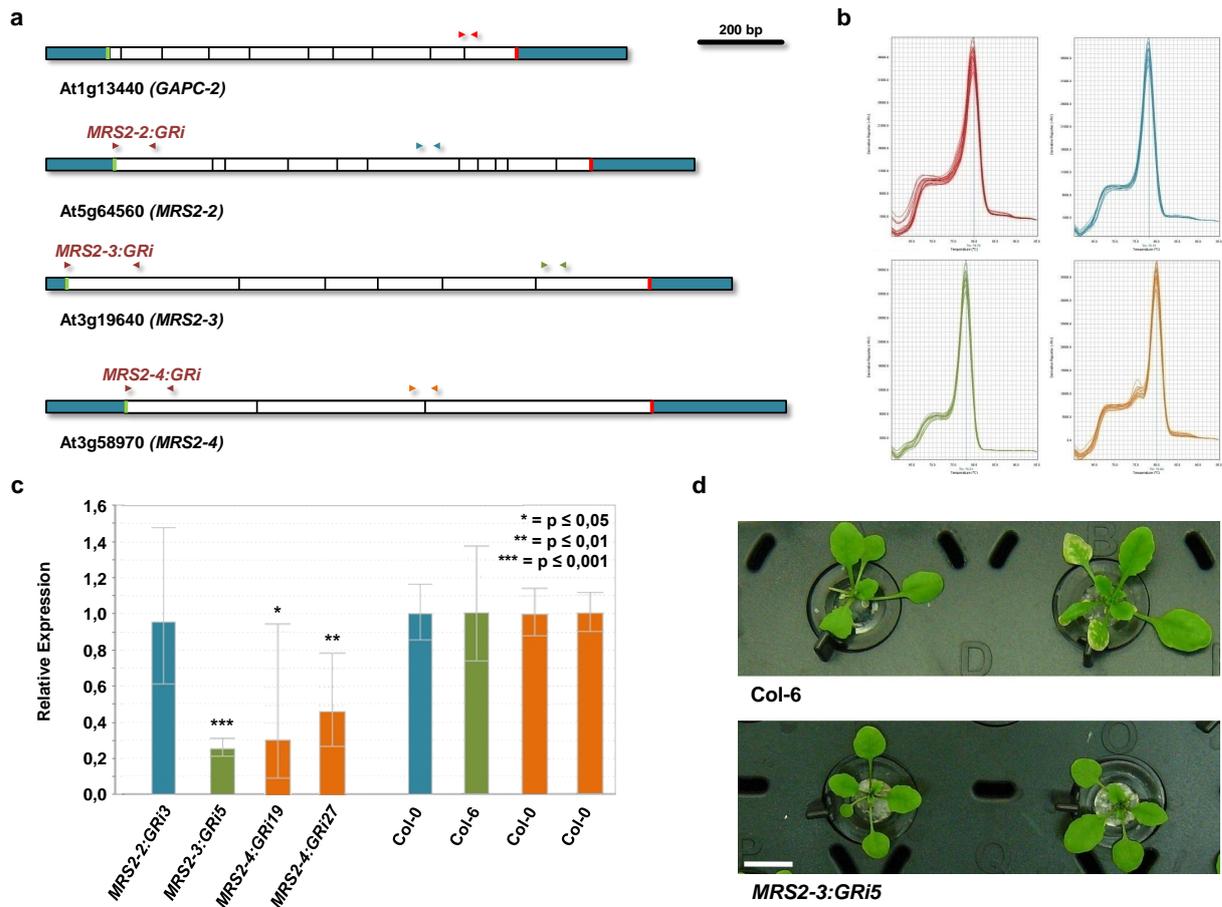


Abbildung 2.8. Analyse der relativen Expression von *MRS2* Genen in RNAi-Linien und *Arabidopsis* Wildtyp durch quantitative *real-time* RT-PCR.

(a) Schematischer Aufbau der cDNA von *GAPC-2*, *MRS2-2*, *MRS2-3* und *MRS2-4*. Dargestellt sind die Zielbereiche der siRNA für das entsprechende *MRS2* Gen (dunkelrote Pfeile), Exonbereiche (weiße Boxen), untranslatierte 3'- und 5'-Regionen (blaue Boxen) und Bindungsstellen der qRT-PCR-Primer (bunte Pfeile) sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken). (b) Schmelzkurven der Amplikons für *GAPC-2* (rot), *MRS2-2* (blau), *MRS2-3* (grün) und *MRS2-4* (orange). Die Diagramme stellen die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur dar und geben Aufschluss über die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte. (c) Relative Expression von *MRS2-2* (blau), *MRS2-3* (grün) und *MRS2-4* (orange) in den RNAi-Linien im Vergleich zum jeweiligen *Arabidopsis* Wildtyp. Die Balkenhöhe entspricht dem arithmetischen Mittel und die Fehlerbalken der Standardabweichung aus je drei biologischen und drei technischen Replikaten ($n = 9$) nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit *GAPC-2* als endogener Kontrolle. Signifikante bzw. hoch signifikante Unterschiede nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test sind durch * bzw. ** oder *** gekennzeichnet. (d) *Arabidopsis* Ökotyp Col-6 und *MRS2-3:GRI5* nach drei Wochen hydroponischer Kultur bei niedriger Magnesiumverfügbarkeit ($50 \mu\text{M MgSO}_4$). Maßstab (weißer Balken unten links) $\cong 1$ cm.

2.2. Funktionelle Komplementation von *mrs2-7* Knockout-Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Durch die vorangegangene Diplomarbeit konnte erstmals ein Wachstumsdefekt in Abhängigkeit zur verfügbaren Mg^{2+} -Konzentration im Außenmedium durch den Verlust eines pflanzlichen Magnesiumtransporters gezeigt werden (Gebert 2006). Dieser Phänotyp für den *Knockout* von *MRS2-7* aus *Arabidopsis* wird erst bei einem Unterschreiten von $150 \mu M$ $MgSO_4$ in hydropnischen Kulturen sichtbar. Ergebnisse aus GUS-Reporterstudien zeigten eine Promotoraktivität des stromaufwärtsliegenden, intergenischen Bereichs von *MRS2-7* vor allem in Spitze und Zentralzylinder adulter bzw. in der meristematischen Zone junger Wurzeln (Meschenmoser 2008). In diesem Teil der Arbeit sollten nun die Expression von *MRS2-7* unter Kontrolle verschiedener Promotoren wiederhergestellt und die daraus resultierenden Pflanzen auf ihr Wachstumsverhalten unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht werden. Neben der unterschiedlichen Toleranz gegenüber niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen wurde unter anderem auch die Reaktion auf Zugabe von toxischem Aluminium bei sauren pH-Bedingungen im Medium ermittelt.

2.2.1. Klonierung der Komplementationskonstrukte und Transformation von *Arabidopsis*

Zur funktionellen Charakterisierung der *MRS2* Genfamilie durch Überexpression wurden die codierenden Bereiche aller Mitglieder mit Hilfe der GATEWAYTM Technologie in den Vektor pK7WG2D.1 (Karimi *et al.* 2002) unter die Kontrolle des starken *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S Promotors (Pro_{35S}) kloniert und in *Arabidopsis* Ökotyp Col-0 transformiert (Lenz 2007). Das aus dieser Arbeit stammende Vektorkonstrukt für *MRS2-7* (Abb. 2.9 a) wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation in die drei *Knockout*-Linien *mrs2-7(1-3)* eingebracht und durch die Kanamycinresistenz der transgenen Nachkommen selektiert. Hierbei zeigte sich, dass in der Linie *mrs2-7(1)* die Kanamycinresistenz der pROK2 T-DNA im *MRS2-7* Gen immer noch aktiv ist, so dass alle Nachkommen resistent gegenüber Kanamycin und daher für weitere Untersuchungen ungeeignet waren.

Um die Komplementation unter nativen Expressionbedingungen zu untersuchen, wurde die genomische Region von *MRS2-7* (At5g09690.1), inklusive der stromaufwärts liegenden 5'-UTR und des intergenischen Bereichs mit putativen regulatorischen Elementen (Meschenmoser 2008), in den Vektor pMDC99 (Curtis und Grossniklaus 2003) integriert (Abb. 2.9 b, rechts oben), zur Überprüfung sequenziert und in die gleichen *MRS2-7* *Knockout*-Linien transformiert. Die Selektion der transgenen Nachkommen erfolgte hierbei durch Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin. Im weiteren Verlauf wurden zwei zusätzliche Vektorkonstrukte, z.T. auch durch klassische Klonierung, hergestellt, in denen nur die codierenden Exonbereiche von *MRS2-7* zusammen mit den untranslatierten und putativ-regulatorischen Regionen enthalten waren (Abb. 2.9 b, rechts unten). Diese konnten allerdings bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich in *Arabidopsis* transformiert werden, so dass keine Daten zu eventuellen Phänotypen vorliegen.

Die Aussaat und Selektion aufeinanderfolgender Generationen ergab für die Linien *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* und *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* jeweils eine homozygote Elternpflanze, deren Nachkommen alle Resistent gegenüber Kanamycin bzw. Hygromycin waren und für Untersuchungen bei verschiedenen physiologischen Bedingungen verwendet wurden.

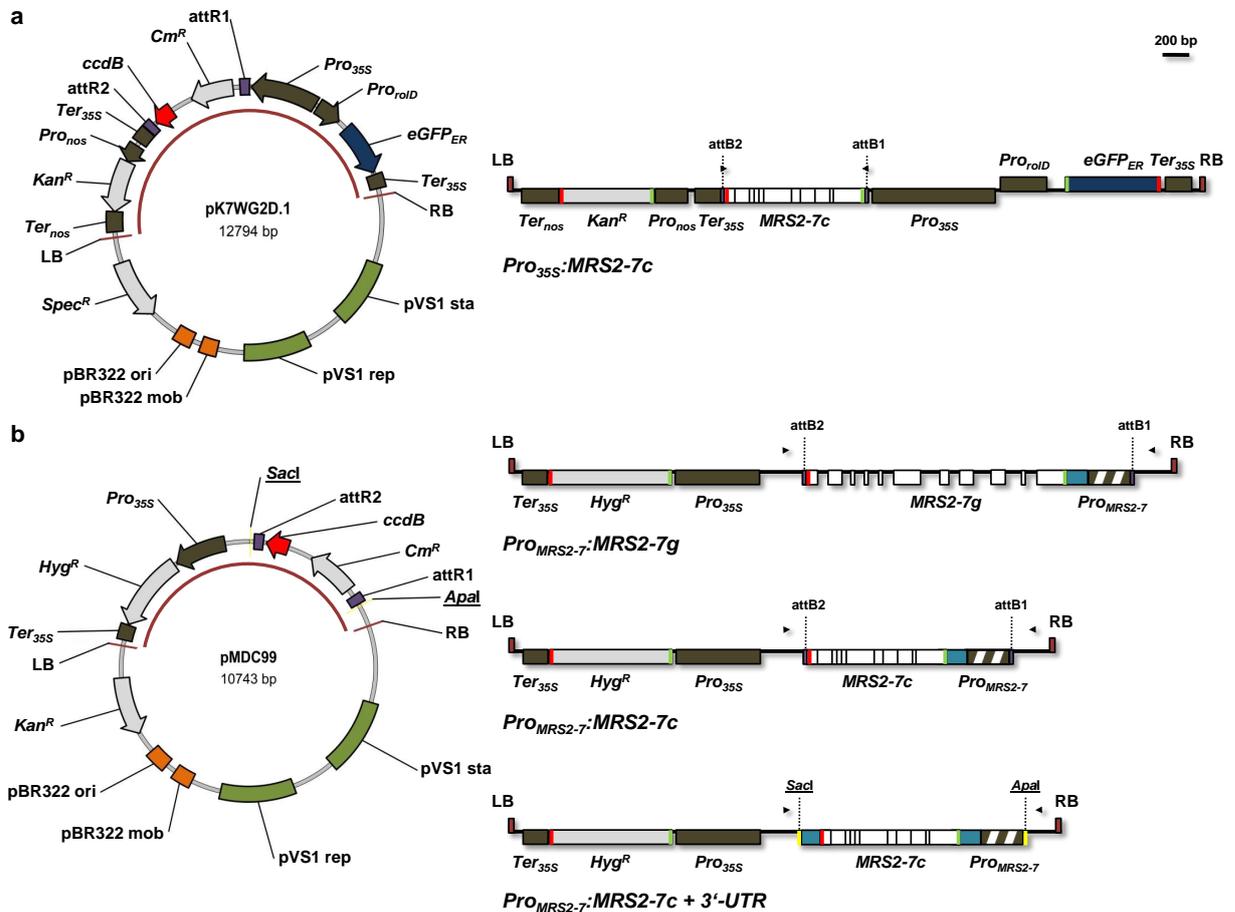


Abbildung 2.9. Vektorkarten von pK7WG2D.1 und pMDC99 mit zugehöriger T-DNA für *MRS2-7* Komplementationsversuche in *Knockout*-Mutanten.

Farbig hervorgehobene Abschnitte repräsentieren den negativen Selektionsfaktor *ccdB* (rot), Antibiotikaresistenzen (hellgrau), Promotor- und Terminatorbereiche (dunkelgrau), GATEWAY™ *attachment sites* (*attB/R*, violett), *eGFP_{ER}* (dunkelblau), *left* und *right border* Regionen (dunkelrote Balken), Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (gelbe Balken), Replikationselemente (*ori*, *rep*) und mobilisierende (*mob*) bzw. stabilisierende (*sta*) Bereiche aus pBR322 (orange) bzw. pVS1 (grün). In den im rechten Teil herausvergrößerten T-DNA-Bereichen der unterschiedlichen Konstrukte (dunkelrot-unterlegte Vektorabschnitte) sind außerdem putative Promotorelemente (weiß-dunkelgrau), 3'- und 5'-UTR (hellblau), *MRS2-7* Exonregionen (weiß), Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) sowie die Bindungsstellen der Sequenzierungsprimer (schwarze Pfeile) eingezeichnet. Die Namen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen, wenn ihre Erkennungssequenz in den Vektoren nur einmalig vorkommt.

2.2.2. Wachstumsphänotyp der *MRS2-7* Komplementationslinien unter verschiedenen Magnesiumbedingungen

Zur physiologischen Charakterisierung wurden die bereits vorhandene *mrs2-7(2) Knockout*-Linie sowie die neu erzeugten *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* und *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g*

Komplementationslinien in hydroponischen Kultursystemen mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen untersucht. Wie schon bekannt, zeigte die *MRS2-7 Knockout*-Mutante bei 50 μM MgSO_4 einen starken Wachstumsdefekt, während der Col-0 Wildtyp unter diesen Bedingungen normal wachsen konnte. Die Linie *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* mit den codierenden Bereichen des *MRS2-7* Gens unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors zeigte ebenfalls normales Wachstum, wohingegen die Linie *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* mit der genomischen Sequenz und dem nativen Promotor unverändert den *Knockout*-Phänotyp aufwies (Abb. 2.10 a). Das Wachstum aller drei Linien ließ sich bei 150 μM MgSO_4 nicht mehr vom *Arabidopsis* Wildtyp unterscheiden (Abb. 2.10 b).

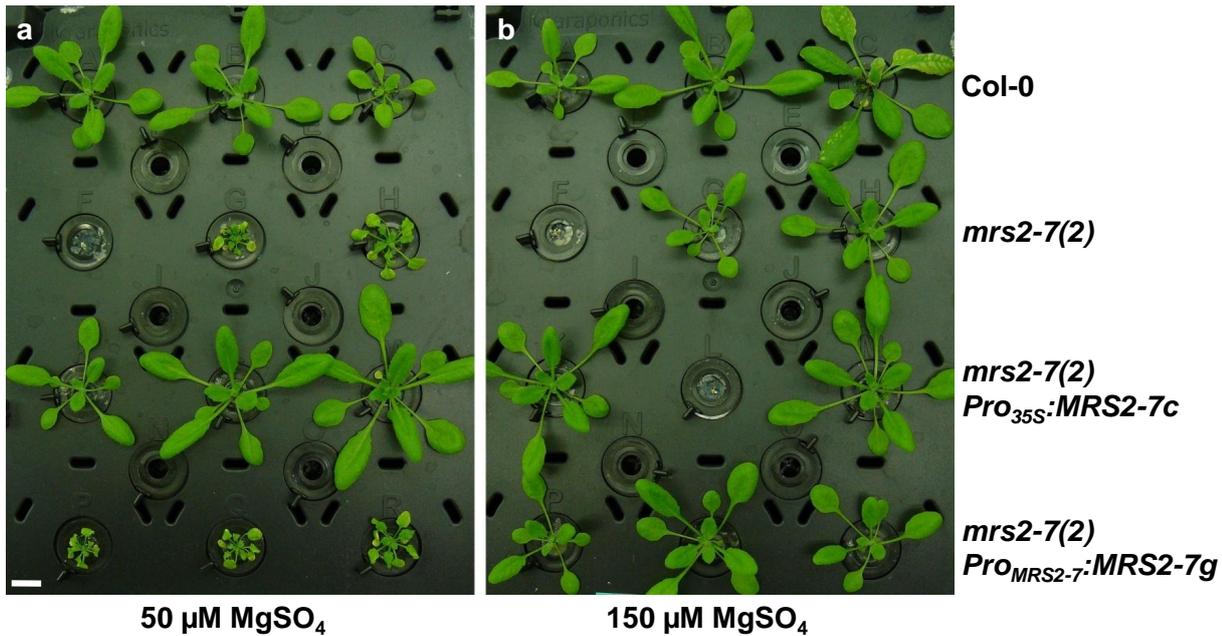


Abbildung 2.10. Hydroponische Kultur von *Arabidopsis* Wildtyp Col-0, *mrs2-7(2)* *Knockout*- und *MRS2-7* Komplementationslinien.

(a) und (b) Effekt von unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen auf das Wachstum von *Arabidopsis* Col-0 und der homozygoten *mrs2-7(2)* Linie sowie von Expressionskonstrukten mit CaMV 35S und nativem Promotor im *Knockout*-Hintergrund nach fünf Wochen im Arapronics System. Die im Medium verfügbaren Magnesiumkonzentrationen entsprechen 50 μM (a) und 150 μM MgSO_4 (b). Maßstab (weißer Balken unten links) \cong 1 cm.

2.2.3. Expressionsanalyse der *MRS2-7* Komplementationslinien und Kontrollsequenzierung der Transkripte

Die Genotypisierung der erzeugten Pflanzenlinien bestätigte, dass in allen Nachkommen der *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* Linie die T-DNA-Insertion im *MRS2-7*-Gen nach wie vor homozygot vorlag und die *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* Pflanzen eine heterozygote Allelkonfiguration aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt sich durch das neu hinzugekommene dritte Allel in der T-DNA des genomischen Komplementationskonstruktes erklären. Die genspezifischen Primer binden jedoch nicht an den codierenden Bereich des Überexpressionskonstruktes.

Da beide Komplementationslinien unterschiedliche Phänotypen bei niedriger Magnesiumverfügbarkeit zeigten, sollte die Analyse von cDNA-Populationen Aufschluss über die Transkriptionsstärke von *MRS2-7* in den entsprechenden Pflanzen geben sowie das Spleißen für das genomische Konstrukt untersuchen. Hierzu wurde aus Rosettenblättern von zwei unterschiedlichen Nachkommen der homozygoten Elternpflanzen die Gesamt-RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und *MRS2-7* Transkripte durch PCR isoliert und sequenziert. Die gewonnene cDNA wurde außerdem für eine vorläufige Bestimmung der Expressionsstärke durch semi-quantitative PCR mit Primern für *MRS2-7* und *GAPC-1* verwendet. Hierbei bestätigte sich, dass die Transkription von *MRS2-7* unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors stärker ausfällt als unter nativen Bedingungen. Außerdem waren in den *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* Pflanzen und teilweise auch im Wildtyp neben dem erwarteten PCR-Produkt von 1,2 bzw. 0,35 kbp noch weitere Banden mit höherem Molekulargewicht erkennbar (Abb. 2.11 a und b).

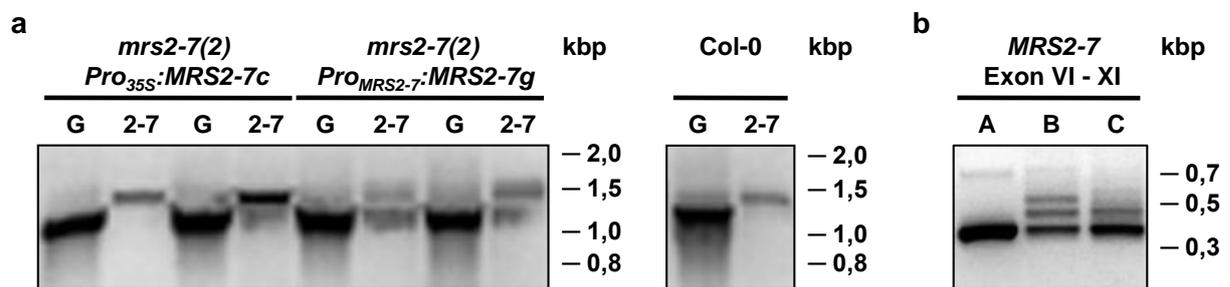


Abbildung 2.11. Transkriptionsanalyse von *MRS2-7* und endogenen Kontrollen in *MRS2-7* Komplementationslinien und *Arabidopsis* Wildtyp.

(a) Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCRs auf jeweils zwei unterschiedliche Nachkommen verschiedener *MRS2-7* Komplementationslinien und Col-0 mit Primern für die gesamte codierende Region von *GAPC-1* (G) und *MRS2-7* (2-7). (b) RT-PCR Produkte mit Primern für die letzten fünf Introns und Exons von *MRS2-7* Transkripten aus *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* (A), *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* (B) und *Arabidopsis* Wildtyp (C).

Die Sequenzierung der cDNA-Populationen zeigte erwartungsgemäß, dass in den Pflanzen mit der 35S-überexprimierten cDNA-Sequenz von *MRS2-7* im *mrs2-7(2) Knockout*-Hintergrund auch nur diese als Transkript nachgewiesen werden konnte. Sowohl bei *Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* Pflanzen als auch im Col-0 Wildtyp konnten jedoch neben korrekt gespleißten Transkripten auch unvollständig oder falsch gespleißte cDNAs amplifiziert werden. Die Abweichungen der untersuchten vollständigen Transkripte zur reifen bzw. intakten CDS zeigten sich ausschließlich zwischen Exon VI und XI, so dass im weiteren Verlauf nur noch dieser Bereich näher betrachtet wurde (Abb. 2.12). Jedes nicht gespleißte Intron führt zu einer Verschiebung des Leserasters, was in allen Fällen einen vorzeitigen Translationsabbruch und damit eine Zerstörung des konservierten C-Terminus des *MRS2-7* Proteins zur Folge hat.

Als Ergebnis der Sequenzierungen lässt sich zusammenfassen, dass Intron x in 5 von 14 Fällen (36 %) bei *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* nicht gespleißt wurde, während es in allen untersuchten cDNAs des Wildtyps immer gespleißt vorlag. In zwei dieser Transkripte (14 %) wurde zusätzlich auch Intron ix nicht entfernt. Im Wildtyp war Intron ix in 3 von 11 und bei *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* in 2 von 14 Fällen (27 bzw. 14 %) falsch gespleißt, so dass durch Ver-

schiebung des Leserahmens kein korrektes Transkript mehr entstehen konnte. In jeweils einem Fall waren bei *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* und Wildtyp die Introns vi und vii noch in der cDNA vorhanden, in je einem weiteren Fall beim Wildtyp nur Intron vi oder ix. Insgesamt lagen in der Linie *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* 57 % und im Wildtyp Col-0 36 % aller analysierten *MRS2-7* Transkripte in unreifer oder defekter Form vor (Abb. 2.12).

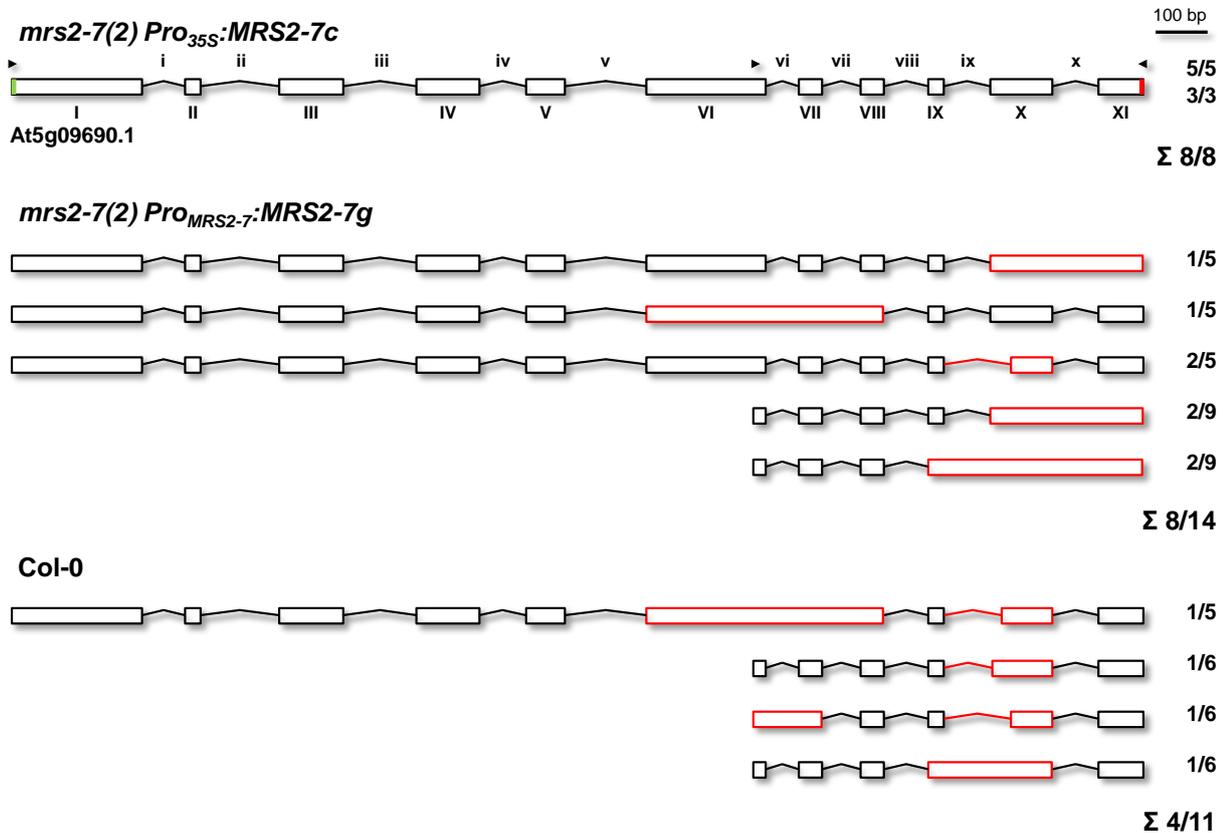


Abbildung 2.12. Quantifizierung und Analyse von verkürzten und vollständigen *MRS2-7* Transkripten aus *MRS2-7* Komplementationslinien und *Arabidopsis* Wildtyp.

Aufbau der sequenzierten *MRS2-7* Transkripte aus den drei unterschiedlichen Linien mit Exon- (Boxen) und Intronbereichen (Linien), Start- und Stoppcodon (grüner bzw. roter Balken) und Nummerierung in römischen Ziffern sowie Primerbindungsstellen für die RT-PCR (schwarze Pfeile). Falsch oder nicht gespleißte Abschnitte sind in rot dargestellt und nachfolgende Zahlen geben an, wieviele der untersuchten cDNAs diesem Typus entsprachen.

2.2.4. ICP-MS-Ionenprofile von *mrs2-7* Mutanten und *Pro_{35S}:MRS2-7c* Komplementationslinien

Wie schon zuvor beschrieben (Kap. 2.1.4) wurde die Ionenzusammensetzung im Blattgewebe von Nachkommen homozygoter *MRS2-7 Knockout*- bzw. Überexpressionslinien bestimmt. Der Vergleich zum *Arabidopsis* Wildtyp zeigte eine leichte, aber hochsignifikante ($p \leq 0,01$) Verringerung des Kaliumgehaltes um 10 - 15 % in allen drei unabhängigen *mrs2-7* Mutanten (Abb. 2.13 a - c), welche in der *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* Linie nicht erkennbar war (Abb. 2.13 d). Signifikante Änderungen ($p \leq 0,5$) in der Zusammensetzung der Ionenprofile bei Anzucht auf

Erde sind in Tabelle 2.4 aufgelistet, lassen jedoch keine weiteren auffälligen Gemeinsamkeiten zwischen allen drei *Knockout*-Linien erkennen. In den Linien *mrs2-7(2)* und *mrs2-7(3)* war der Kupfergehalt um 20 bzw. 9% niedriger als im Wildtyp, während nur in Linie *mrs2-7(1)* die Menge an Magnesium um 4% verringert war.

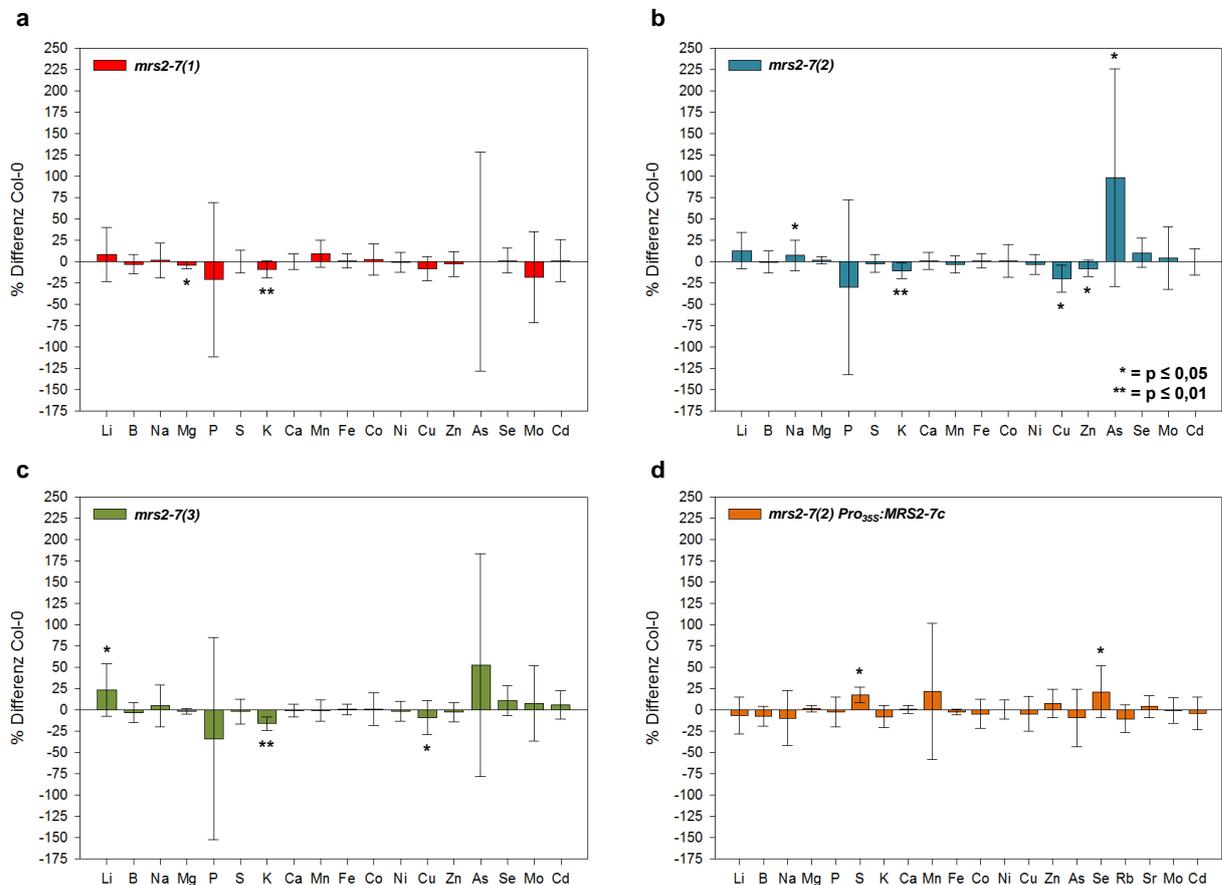


Abbildung 2.13. Ionenprofil von *mrs2-7* *Knockout*- und *MRS2-7* Komplementationslinien im Vergleich zum *Arabidopsis* Wildtyp.

(a) bis (d) Mittlere prozentuale Differenz (% Differenz) des Ionengehaltes von *mrs2-7(1)* (a), *mrs2-7(2)* (b), *mrs2-7(3)* (c) und *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* (d) zur Wildtyp-Referenz Col-0. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren prozentualen Standardabweichung. Die Anzahl untersuchter Pflanzen pro Linie betrug $n = 12$. Signifikante bzw. hoch signifikante Unterschiede nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test sind durch * ($p \leq 0,05$) bzw. ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

2.2.5. Untersuchung der *MRS2-7* *Knockout*- und Komplementationslinien auf veränderte Aluminiumtoleranz

Vorangegangene Studien zeigten, dass die Überexpression des *Arabidopsis* Magnesiumtransporters *MRS2-10/MGT1* in Tabak eine erhöhte Aluminiumtoleranz bei niedrigem pH im Anzuchtmedium vermittelt (Deng *et al.* 2006). Die folgende Untersuchung sollte nun klären, ob neben dem Mg^{2+} -Mangelphänotyp und dessen Komplementation auch eine unterschiedliche Reaktion auf toxische Aluminiumkonzentrationen bei den *MRS2-7* *Knockout*- bzw. Überexpres-

Tabelle 2.4. Signifikante Abweichungen des Ionengehaltes verschiedener *MRS2-7* Mutanten vom *Arabidopsis* Wildtyp.

Linie	Isotop	Med. ppm TM	Med. % Diff.	Std. % Diff.	p-Wert	Signifikanz
<i>mrs2-7(1)</i>	²⁵ Mg	22619,8 (23570,1)	-4,03	4,16	0,019	*
	³⁹ K	49779,9 (54718,5)	-9,03	9,91	0,003	**
<i>mrs2-7(2)</i>	²³ Na	1184,16 (1103,26)	7,33	18,19	0,043	*
	³⁹ K	48913,4 (54718,5)	-10,61	9,30	0,002	**
	⁶⁵ Cu	4,14434 (5,18258)	-20,03	15,81	0,017	*
	⁶⁶ Zn	114,050 (123,626)	-7,75	9,75	0,041	*
	⁷⁵ As	0,72191 (0,36330)	98,71	127,27	0,050	*
<i>mrs2-7(3)</i>	⁷ Li	18,7822 (15,1849)	23,69	30,71	0,033	*
	³⁹ K	45968,7 (54718,5)	-15,99	8,13	0,000	**
	⁶⁵ Cu	4,71749 (5,18258)	-8,97	19,66	0,022	*
<i>mrs2-7(2)</i>	³⁴ S	7869,66 (6684,56)	17,73	9,29	0,030	*
<i>Pro_{35S}:MRS2-7c</i>	⁸² Se	2,40720 (1,98192)	21,46	30,33	0,050	*

Aufgeführt sind die Mediane (Med.) der ICP-MS-Daten für den relativen Anteil (ppm) des jeweiligen Isotops an der Trockenmasse (TM) in *MRS2-7 Knockout*- und Überexpressionslinien bzw. der Wildtyp-Referenz Col-0 (Werte in Klammern). Außerdem zeigt die Tabelle die mittlere prozentuale Differenz (Med. % Diff.) der *MRS2-7* Mutanten zum Wildtyp und deren Standardabweichung (Std. % Diff.). Die Anzahl untersuchter Pflanzen pro Linie betrug $n = 12$. Als signifikant bzw. hoch signifikant gelten Unterschiede, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (p) nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) entspricht oder unterschreitet.

sionsmutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen erkennenbar ist. Hierzu erfolgte die Kultivierung der entsprechenden Linien unter sterilen Bedingungen in modifiziertem MS-Flüssigmedium mit saurem pH-Wert und optionaler Zugabe von AlCl_3 , gefolgt von der Bestimmung des Frischgewichtes der Keimlinge durch Auswiegen nach 14 Tagen.

Abbildung 2.14 zeigt die Pflanzenentwicklung und Biomassenproduktion bei pH 4,3 und damit verglichen ein unterschiedlich stark reduziertes Wachstum bei Zugabe von $100 \mu\text{M AlCl}_3$ in allen drei untersuchten Linien. Bei niedrigem pH wiesen die beiden transgenen Linien ein tendenziell schlechteres Wachstum als der Wildtyp auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Zugabe von toxischen Aluminiumkonzentrationen führte bei Überexpression von *MRS2-7* zu einer signifikant ($p \leq 0,5$) erhöhten Toleranz im Vergleich zu *Arabidopsis* Wildtyp Col-0 und der *MRS2-7 Knockout*-Mutante (Abb. 2.14 a und b). Während beim Wildtyp und *MRS2-7 Knockout* die Biomassenproduktion um 80 - 85 % verringert war, reduzierte sie sich bei Überexpression von *MRS2-7* nur um 50 %. Dieser Trend ließ sich in insgesamt fünf unabhängigen Experimenten reproduzieren (Abb. 2.14 b, kleines Diagramm).

Neben der hochsignifikant ($p \leq 0,01$) geringeren Biomasse (Abb. 2.14 a und b) äußerte sich bei *mrs2-7(2)* eine verstärkte Aluminiumsensitivität auch durch ausgeprägtere Hemmung des Wurzelwachstums (Abb. 2.14 c). Weitere Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber den divalenten Kationen Co^{2+} und Mn^{2+} in Flüssigkulturen mit $150 \mu\text{M Co}(\text{NO}_3)_2$ und $200 - 300 \mu\text{M MnCl}_2$ zeigten hingegen keinen Unterschied zwischen den drei Linien (Daten nicht gezeigt).

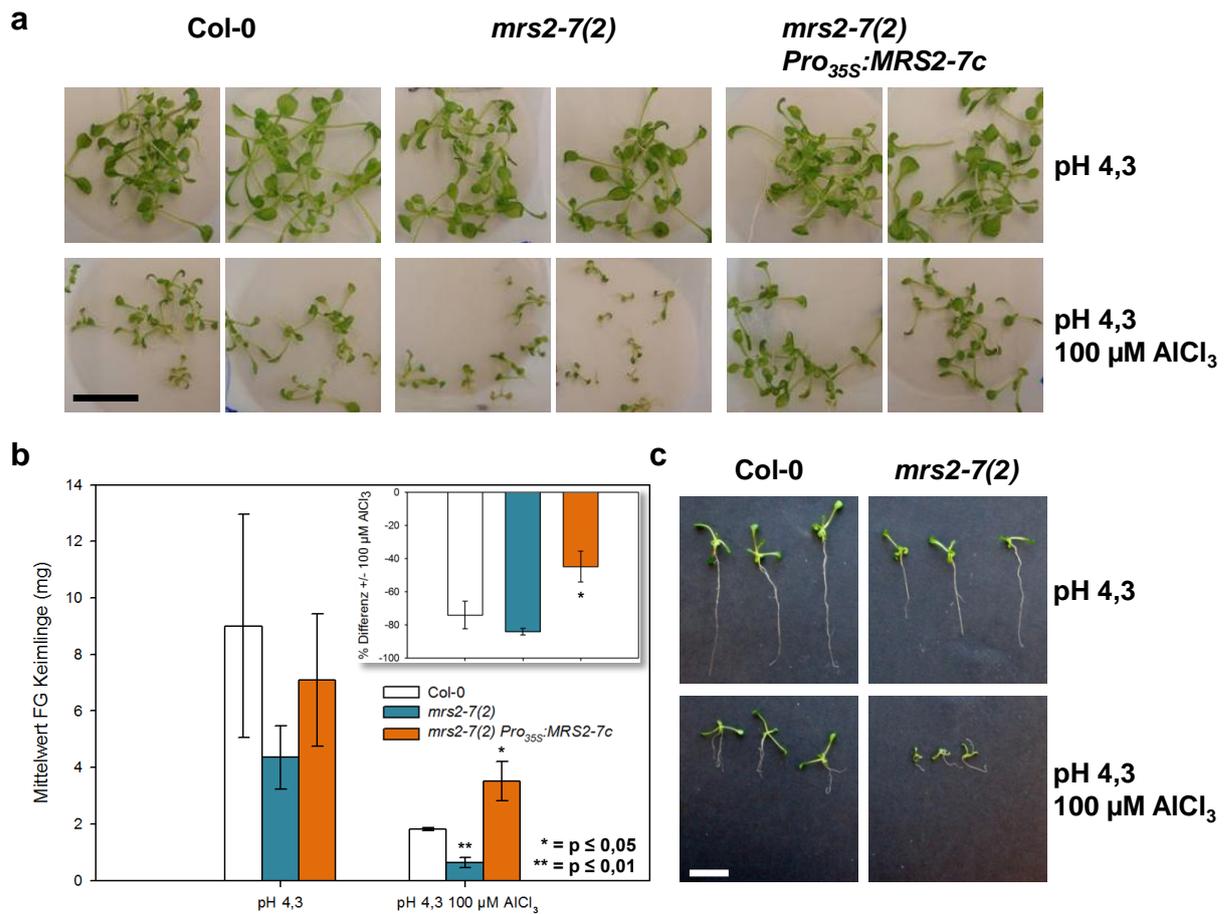


Abbildung 2.14. Aluminiumtoleranz von *MRS2-7 Knockout*- und Überexpressionsmutanten im Vergleich zu *Arabidopsis* Wildtyp

(a) bis (c) *Arabidopsis* Pflanzen nach zwei Wochen Kultivierung in MS-Flüssigmedium bei pH 4,3 mit und ohne 100 μ M $AlCl_3$. Wachstumsphänotyp (a) und durchschnittliches Frischgewicht (b) von Keimlingen aus mindestens zwei unabhängigen technischen Replikaten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte aller Pflanzen aus einem Ansatz. Das eingesetzte Diagramm zeigt die mittlere prozentuale Verringerung der Biomassenproduktion aller drei Linien bei Zugabe von 100 μ M $AlCl_3$ im Vergleich zur Kontrolle aus fünf unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler. Als signifikant bzw. hoch signifikant gelten Unterschiede zur entsprechenden Wildtypkontrolle, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (p) nach einem einseitigen Zweistichproben t-Test 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) entspricht oder unterschreitet. (c) Vergleich des Einflusses von pH-Wert und Aluminiumzugabe auf die Wurzellänge von *Arabidopsis* Wildtyp und einer *MRS2-7 Knockout*-Mutante. Maßstab (schwarzer und weißer Balken unten links) \cong 1 cm.

2.3. Subzelluläre Lokalisation von MRS2 Proteinen in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana*

Neben der phänotypischen Charakterisierung von Geninaktivierungsmutanten ist die Lokalisation des entsprechenden Proteins innerhalb der unterschiedlichen Kompartimente einer Zelle ein wichtiger experimenteller Ansatz, um Aussagen über dessen mögliche Funktion treffen zu können. Ein weit verbreitetes und gut etabliertes Hilfsmittel ist die Fusion des zu analysierenden Proteins an ein fluoreszierendes Reporterprotein mit anschließender mikroskopischer Bestimmung seines Zielortes *in vivo*. Die Expression des Fusionsproteins kann direkt im Ursprungs- oder in einem geeigneten Modellorganismus entweder dauerhaft oder nur vorübergehend erfolgen. In den Pflanzenwissenschaften wird vor allem die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation eingesetzt, um wahlweise stabile transgene Pflanzen oder nur bestimmte Gewebe mit transienter Expression zu erzeugen und zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Proteins zu verwenden.

In den folgenden Abschnitten der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung und Analyse von Expressionskonstrukten beschrieben, in denen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) sowohl an den C- als auch den N-Terminus verschiedener MRS2 Proteine fusioniert und transient in der Epidermis von Tabakblättern exprimiert wurde. In einzelnen Fällen sollte durch zusätzliche Expression von spezifischen Markern für bestimmte Zellkompartimente eine mögliche Co-Lokalisation gezeigt werden. Im weiteren wurden physiologische Komplementationstudien in *Arabidopsis Knockout*-Mutanten durchgeführt, um die Funktionalität des Fusionsproteins zu belegen oder mögliche Artefakte aufzudecken.

2.3.1. Herstellung und mikroskopische Untersuchung von MRS2:GFP Fusionsproteinen in Tabakblättern

Die Analyse von MRS2 Proteinen durch c-terminale GFP-Fusion ermöglichte in vorangegangenen Studien an *Arabidopsis* eine Lokalisation von MRS2-6 in Mitochondrien, MRS2-10 in der Plasmamembran und MRS2-11 in Chloroplasten nachzuweisen (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Drummond *et al.* 2006). Allerdings konnte bei weiteren Untersuchungen von MRS2:GFP-Fusionsproteinen in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen oder Tabakprotoplasten keine zweifelsfreie Lokalisation festgestellt werden (Schock *et al.* 2000; Weyand 2006). Als alternativer Ansatz zu diesen Arbeiten wurden die codierenden Sequenzen von MRS2-1, MRS2-2, MRS2-3, MRS2-4, MRS2-5 und MRS2-7 in translatorischer Fusion vor das *mGFP6* Gen in den binären T-DNA-Vektor pMC83 (Curtis und Grossniklaus 2003) entweder über Restriktionsschnittstellen oder das GATEWAYTM System kloniert und zur Überprüfung sequenziert (Abb. 2.15). In allen Vektorsequenzen wurde eine Abweichung beim Basentriplet 700 - 702 von *mGFP6* gegenüber der veröffentlichten Sequenz (http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html) festgestellt (GAT → GTA), welche zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch führt (D234V). Diese Konstrukte wurden im Anschluss in *Agrobacterium* transformiert und durch Infiltration von *Nicotiana benthamiana* Blättern zusammen mit dem viralen p19 RNA-silencing-Suppressor zur Verminderung des PTGS (Voinnet *et al.* 2003) exprimiert. Nach 48 Stunden

Inkubation folgte die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie der Epidermis von transformierten Blattscheiben mit dem Nikon ECLIPSE TE2000-U (IMBIO, Abt. Molekulare Physiologie, Prof. Bartels) oder dem Olympus FV1000 (IZMB, Abt. Zellbiologie der Pflanzen, Prof. Menzel) unter Verwendung von spezifischen Filtersätzen für das GFP und die Autofluoreszenz der Chlorophyllmoleküle in Chloroplasten.

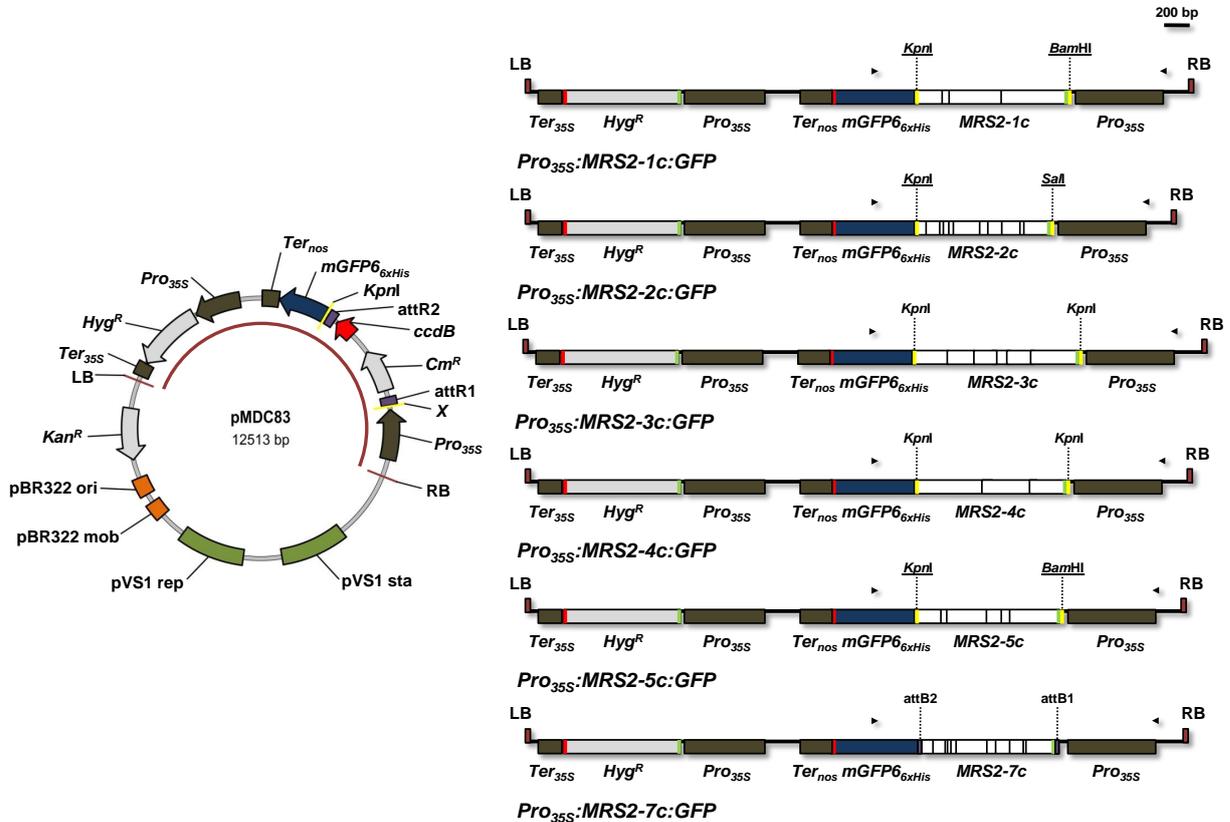


Abbildung 2.15. Vektorkarte von pMDC83 mit zugehörigen T-DNAs für *MRS2-x:GFP* Reporterstudien in *Arabidopsis* und *Nicotiana*.

Farbig hervorgehobene Abschnitte repräsentieren den negativen Selektionsfaktor *ccdB* (rot), Antibiotikaresistenzen (hellgrau), Promotor- und Terminatorbereiche (dunkelgrau), GATEWAY™ *attachment sites* (attB/R, violett), *mGFP6_{6xHis}* (dunkelblau), *left* und *right border* Regionen (dunkelrote Balken), Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (gelbe Balken), Replikationselemente (ori, rep) und mobilisierende (mob) bzw. stabilisierende (sta) Bereiche aus pBR322 (orange) bzw. pVS1 (grün). In den im rechten Teil herausvergrößerten T-DNA-Bereichen der unterschiedlichen Konstrukte (dunkelrot unterlegter Vektorabschnitt) sind außerdem *MRS2* Exonregionen (weiß), Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) sowie die Bindungsstellen der Sequenzierungsprimer (schwarze Pfeile) eingezeichnet. Die Namen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen, wenn ihre Erkennungssequenz in den Vektoren nur einmalig vorkommt.

Trotz des nicht-konservativen Aminosäureaustausches in der GFP-Sequenz war im mikroskopischen 2-Kanal-Bild deutliche Fluoreszenz im Bereich von 500 - 530 nm erkennbar. Das GFP-Signal war bei allen sechs *MRS2* Fusionskonstrukten im Cytoplasma lokalisiert, welches sich bei ausdifferenzierten Pflanzenzellen nur am Rand des Symplasten und in der Peripherie des Zellkerns befindet oder vereinzelt in Strängen durch die zentrale Vakuole zieht (Abb. 2.16 a - f). In einigen mikroskopischen Aufnahmen mit sehr hoher Auflösung waren darüber hinaus

netzartige Strukturen erkennbar, die sich über die gesamte basale und apikale Zellebene erstreckten (Abb. 2.16 d). Das Signal zeigte keine Co-Lokalisation mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Plastiden, weiterhin ließ sich keine Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns oder der Vakuole detektieren (Abb. 2.16 e und f).

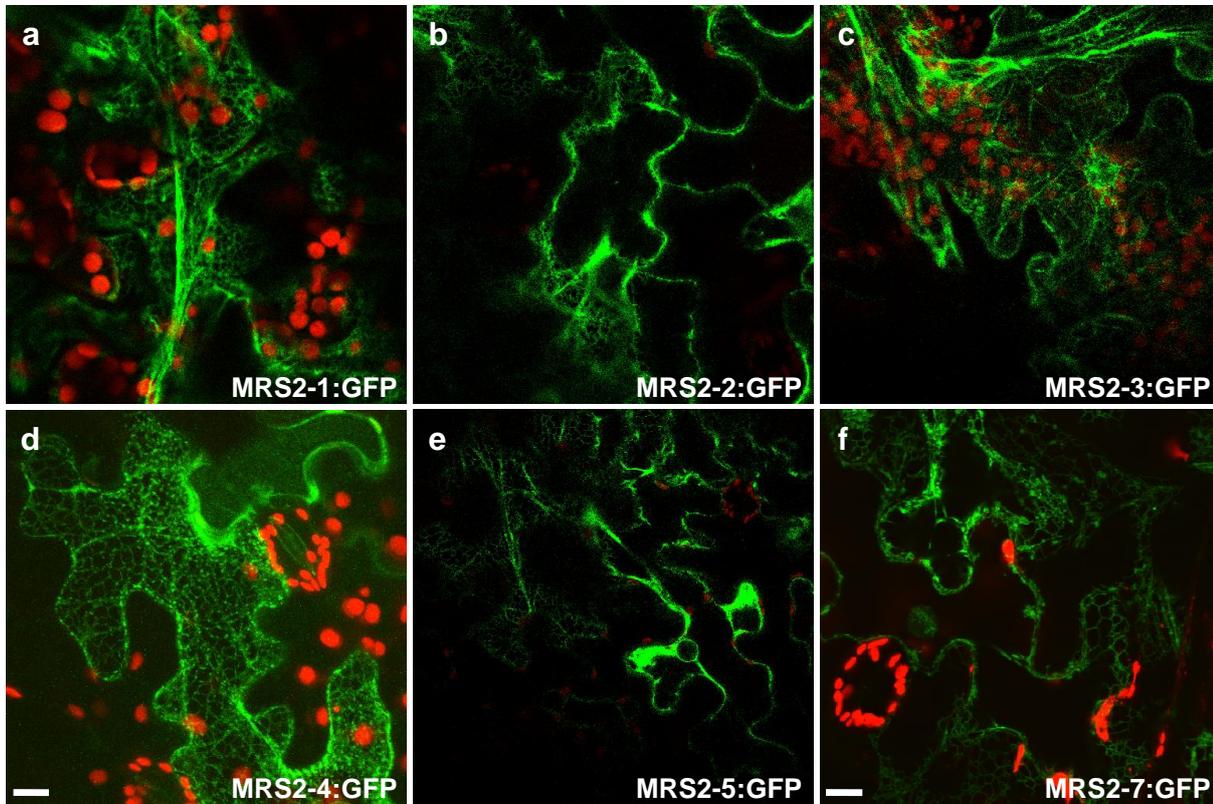


Abbildung 2.16. Fluoreszenz von verschiedenen MRS2-x:GFP Fusionsproteinen bei transienter Expression in Tabakepidermiszellen.

(a) bis (f) Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von transformierten *Nicotiana*-Epidermiszellen 48 Stunden nach Infiltration mit *Agrobacterium* unter Verwendung von Emissionsfiltern für die Autofluoreszenz des Chlorophylls (rot) und GFP (grün). Die Bilder wurden entweder mit dem Nikon TE2000 ([a] bis [c] und [e]) oder dem Olympus FV1000 ([d] und [f]) konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Maßstab (weißer Balken unten links) $\approx 10 \mu\text{m}$.

2.3.2. Herstellung und mikroskopische Untersuchung von GFP:MRS2 Fusionsproteinen in Tabakblättern

Aufgrund des engen Zusammenhanges von Funktion und räumlicher Anordnung der verschiedenen Sekundär- und Tertiärstrukturen eines Polypeptides kann die Fusion mit einem Reporterprotein die native Faltung oder Komplexbildung einer oder beider Komponenten stören oder verhindern. Neben der biologischen Aktivität können auch der gezielte Transport zu bestimmten Zellkompartimenten oder die Integration in deren Membransystem durch eine solche Modifikation beeinflusst werden. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen und derartige Artefakte auszuschließen, und auch weil alle MRS2:GFP-Konstrukte eine identische Lokalisation in netzartigen Kompartimenten des Cytoplasmas zeigten, sollte ein alternatives Experiment durchge-

führt werden. Diese neuen GFP-Konstrukte entsprechen den bereits zuvor beschriebenen, nur erfolgte die Positionierung des Reportergens hierbei an den N-Terminus von MRS2-1, MRS2-2, MRS2-3, MRS2-4, MRS2-5 und MRS2-7 im binären T-DNA-Vektor pMDC43 (Curtis und Grossniklaus 2003) durch unterschiedliche Klonierungsstrategien (Abb. 2.17). Die anschließende Transformation in *Agrobacterium*, die Infiltration und Proteinexpression in *Nicotiana*-Blättern sowie deren Mikroskopie erfolgten wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben (Kap. 2.3.1).

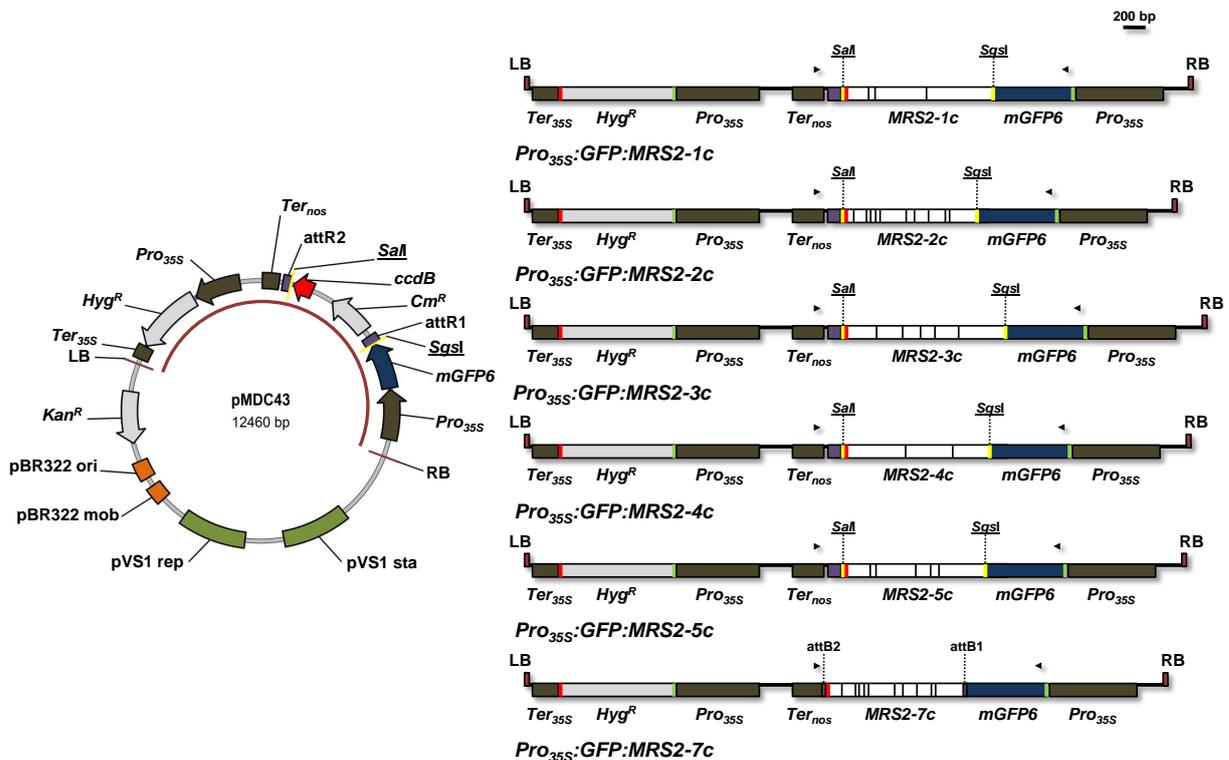


Abbildung 2.17. Vektorkarte von pMDC43 mit zugehörigen T-DNAs für *GFP:MRS2-x* Reporterstudien in *Arabidopsis* und *Nicotiana*.

Farbig hervorgehobene Abschnitte repräsentieren den negativen Selektionsfaktor *ccdB* (rot), Antibiotikaresistenzen (hellgrau), Promotor- und Terminatorbereiche (dunkelgrau), GATEWAY™ attachment sites (*attB/R*, violett), *mGFP* (dunkelblau), *left* und *right border* Regionen (dunkelrote Balken), Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (gelbe Balken), Replikationselemente (*ori*, *rep*) und mobilisierende (*mob*) bzw. stabilisierende (*sta*) Bereiche aus pBR322 (orange) bzw. pVS1 (grün). In den im rechten Teil herausvergrößerten T-DNA-Bereichen der unterschiedlichen Konstrukte (dunkelrot unterlegter Vektorabschnitt) sind außerdem *MRS2* Exonregionen (weiß), Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) sowie die Bindungsstellen der Sequenzierungsprimer (schwarze Pfeile) eingezeichnet. Die Namen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen, wenn ihre Erkennungssequenz in den Vektoren nur einmalig vorkommt.

Auch hier war in den Epidermiszellen der transformierten Tabakblätter bei allen sechs Konstrukten das GFP-Signal im cytoplasmatischen Saum und im Bereich um den Nukleus, vereinzelt auch in den trans-vakuolären Plasmasträngen erkennbar (Abb. 2.18 a - f). Ebenso waren bei Aufnahmen mit sehr hohen Auflösungen wieder die netzartigen Strukturen in den basalen bzw. apikalen Zellebenen erkennbar (Abb. 2.18 f). Die räumliche und zeitliche Überlagerung mit dem Signal der pflanzlichen Autofluoreszenz im 2-Kanal-Bild ergab keine Co-Lokalisation mit

den Chloroplasten, außerdem wurde in keinem Fall ein GFP-Signal im Inneren der zentralen Vakuole oder des Zellkerns detektiert (Abb. 2.18 d, e).

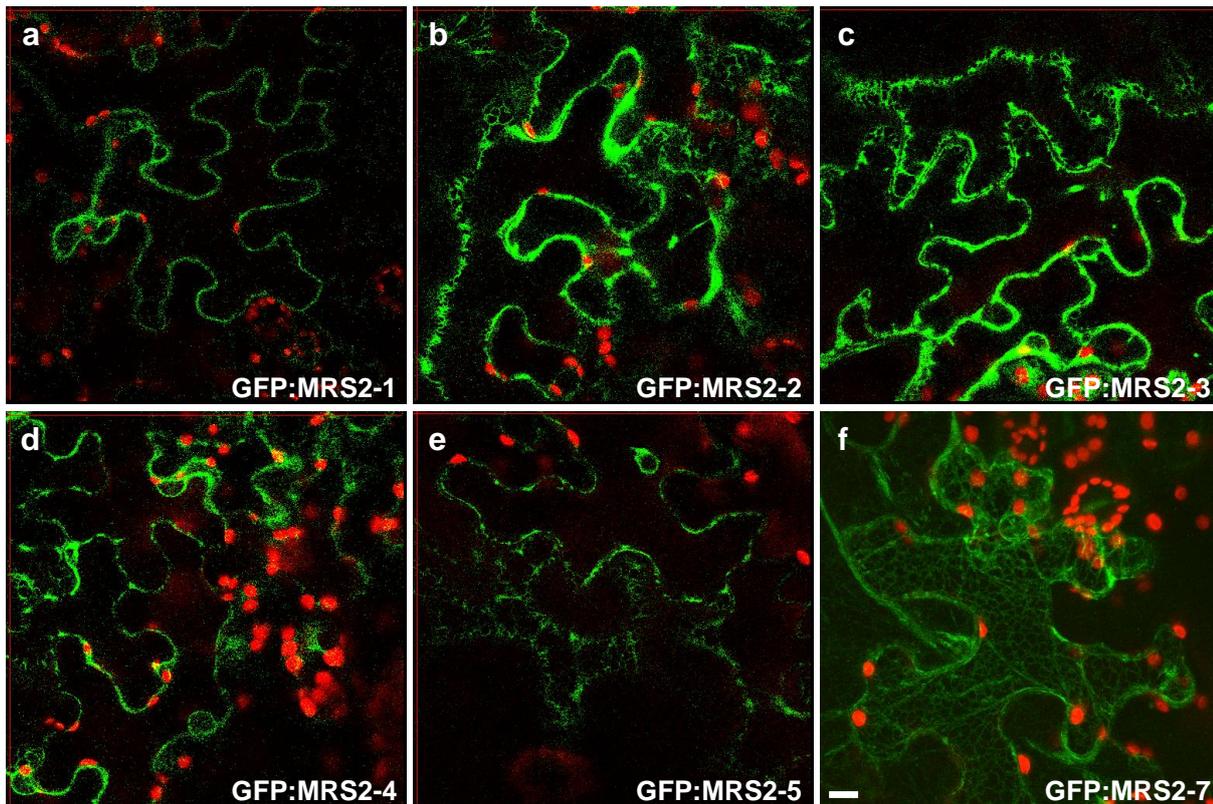


Abbildung 2.18. Fluoreszenz von verschiedenen GFP:MRS2-x Fusionsproteinen bei transienter Expression in Tabakepidermiszellen.

(a) bis (f) Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von transformierten *Nicotiana*-Epidermiszellen 48 Stunden nach Infiltration mit *Agrobacterium* unter Verwendung von Emissionsfiltern für die Autofluoreszenz des Chlorophylls (rot) und GFP (grün). Die Bilder wurden entweder mit dem Nikon TE2000 [(a) bis (e)] oder dem Olympus FV1000 (f) konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Maßstab (weißer Balken unten links) $\approx 10 \mu\text{m}$

2.3.3. Co-Lokalisation der MRS2-7:GFP-Fusion mit dem DsRED-ER-Marker und Untersuchung der Mobilität durch Zeitrafferaufnahmen

Weitere mikroskopische Untersuchungen sollten bestätigen, ob es sich bei den netzartigen Strukturen um das Endomembransystem der Zelle handelt. Die Markierung der einzelnen Systemkomponenten, insbesondere des endoplasmatischen Retikulums (ER), erfolgte durch das rot-fluoreszierende Protein DsRED, welches mit einem Signalpeptid und dem ER-Retentionssignal HDEL gekoppelt wurde (IZMB, Abt. Zellbiologie der Pflanzen). Dieses wurde dann entweder mit dem unveränderten GFP (nach Entfernung von *ccdB* mit *KpnI*) oder dem MRS2-7:GFP Fusionsprotein mit Hilfe des Vektors pMDC83 (Abb. 2.15) in *Nicotiana*-Blättern co-exprimiert und im LSM detektiert (Kap. 2.3.1). Die Transformation mit GFP alleine ergab auf der medialen Zellebene grüne Fluoreszenzsignale in Cytoplasma und Zellkern, aber keine Lokalisation

in netzartigen Strukturen oder ausschließlich in der Zellkernperipherie wie bei den roten Fluoreszenzsignalen von HDEL:DsRED (Abb. 2.19 a - c). Bei Expression von MRS2-7:GFP zeigte sich in apikalen oder basalen Zellebenen eine perfekte Co-Lokalisation der grünen und roten Fluoreszenz in den netzartigen ER-Kompartimenten (Abb. 2.19 d - f). Bei keinem der detektierten Fluoreszenzsignale gab es eine räumliche Übereinstimmung mit den Chloroplasten oder der zentralen Vakuole.

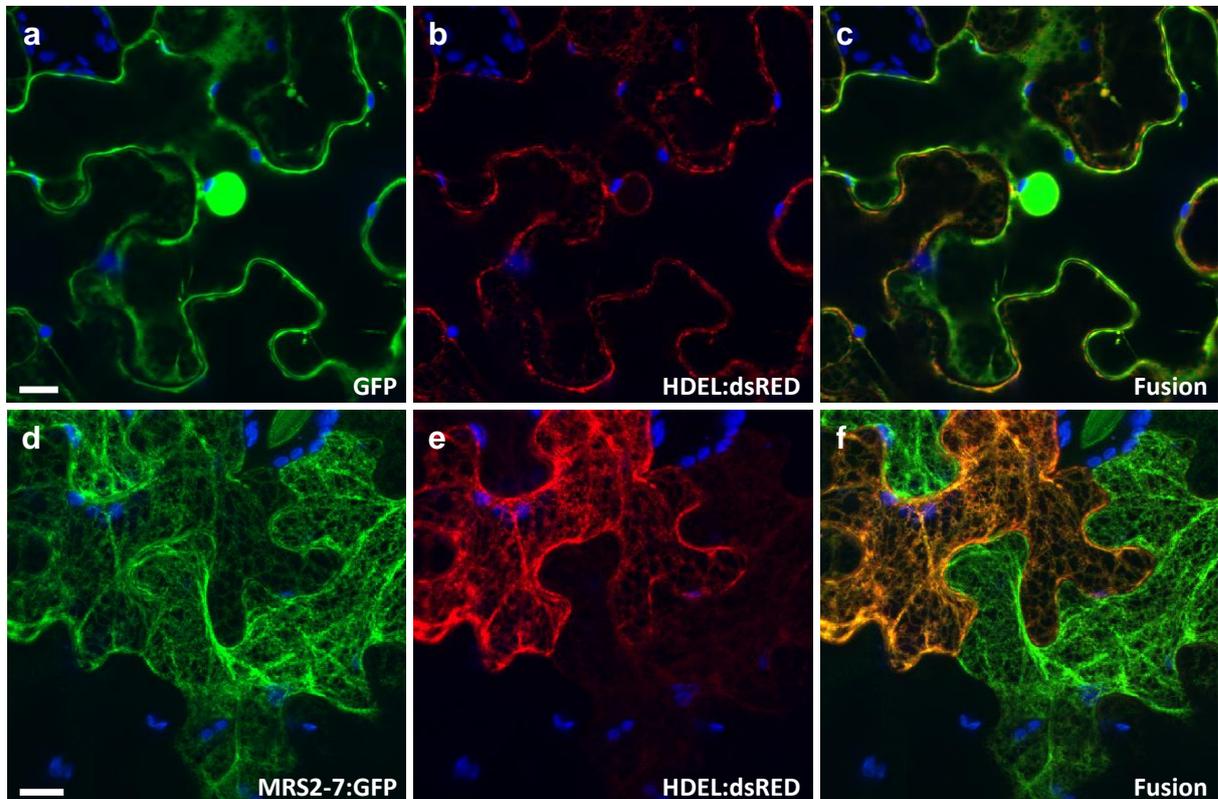


Abbildung 2.19. Fluoreszenzbilder von Tabakepidermiszellen mit HDEL:DsRED markiertem Endomembransystem und Co-Expression von GFP bzw. MRS2-7:GFP.

(a) bis (f) Mikroskopische Drei-Kanal-Fluoreszenzaufnahmen von transformierten *Nicotiana*-Epidermiszellen 48 Stunden nach Infiltration mit *Agrobacterium* unter Verwendung von Emissionsfiltern für die Autofluoreszenz des Chlorophylls (blau), GFP (grün) und DsRED (rot). Die Bilder wurden mit dem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop Olympus FV1000 aufgenommen. Maßstab (weißer Balken unten links) $\cong 10 \mu\text{m}$.

Mikroskopische Aufnahmen über ein Zeitintervall von 15 Minuten zeigten darüber hinaus eine Lokalisation von MRS2-7:GFP in Transportvesikeln des Golgi-Netzwerkes und deren Bewegung entlang der Röhren und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 2.20, weiße Pfeile) sowie die Dynamik der Cytoplasmastränge. Die beobachtete Motilität der Golgi-Vesikel und die kontinuierliche Umgestaltung des ERs durch Verkürzung, Verlängerung oder Fusion von Membrantubuli hängen hierbei unter anderem von den Aktinfilamenten und assoziierten Proteinen des Cytoskeletts ab (Boevink *et al.* 1998). Insgesamt wurde das MRS2-7:GFP Fusionsprotein in allen durch Vesikeltransport verbundenen Kompartimenten des Endomembransystems, also in ER, Golgi-Apparat, Plasmamembran und perinuklearem Raum, detektiert.

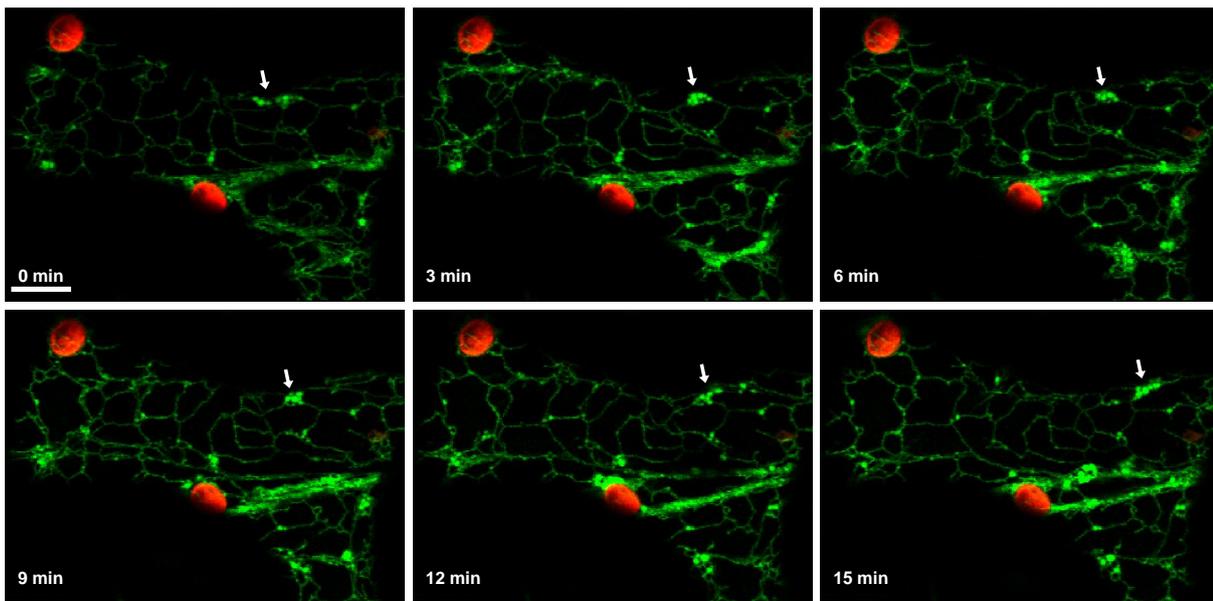


Abbildung 2.20. Zeitreihe von MRS2-7:GFP Fluoreszenzsignalen im endoplasmatischen Retikulum und in Transportvesikeln des Golgi-Netzwerks von Tabakepidermiszellen.

Abfolge von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen transformierter *Nicotiana*-Epidermiszellen 48 Stunden nach Infiltration mit *Agrobacterium* unter Verwendung von Emissionsfiltern für die Autofluoreszenz des Chlorophylls (rot) und GFP (grün). Die Bilder wurden mit dem Olympus FV1000 konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop im Abstand von jeweils 3 Minuten aufgenommen. Eine Ansammlung von beweglichen Vesikeln ist mit einem Pfeil markiert. Maßstab (weißer Balken unten links) $\cong 2 \mu\text{m}$.

2.3.4. Expressionsnachweis von MRS2-7:GFP und Komplementationsversuche in *Arabidopsis*

Neben der transienten Expression in Tabak wurde das *Pro*_{35S}:*MRS2-7c*:*GFP* Konstrukt stabil in verschiedene *Arabidopsis*-Linien transformiert, um zusätzlich Lokalisations- und Komplementationsstudien im Ursprungorganismus durchzuführen. In keiner der erzeugten transgenen Linien ließ sich GFP-Fluoreszenz erkennen (Daten nicht gezeigt), auch wenn die vollständigen Transkripte (2 kb) durch RT-PCR detektiert werden konnten (Abb. 2.21 a). Der immunologische Nachweis des MRS2-7:GFP-Fusionproteins mit einem α -GFP-Antikörper nach SDS-PAGE ergab gegenüber der Computervorhersage von 74 kDa ein kleineres Molekulargewicht von etwa 55 kDa (Abb. 2.21 b). Zur funktionellen Komplementation wurde das MRS2-7:GFP-Fusionskonstrukt in die *Knockout*-Linie *mrs2-7(3)* transformiert, durch Selektion auf Hygromycin-haltigem Medium eine homozygote Elternpflanze identifiziert (Abb. 2.21 c) und diese zusammen mit *Knockout*- und Wildtyp-Pflanzen in Flüssigmedium unter Mg-Mangelbedingungen kultiviert. Das Frischgewicht von zwei Wochen alten Keimlingen war bei beiden Konzentrationen für die transgenen Pflanzen untereinander gleich, jedoch gegenüber dem Wildtyp signifikant bzw. hochsignifikant geringer. Das kleinere Diagramm zeigt eine Zusammenfassung aus zwei unabhängigen Experimenten mit reduzierter Biomasse von 50 - 60 % bei 50 μM und 30 - 40 % bei 150 μM MgSO_4 für beide transgenen Linien im Vergleich zu Col-0 (Abb. 2.21 d).

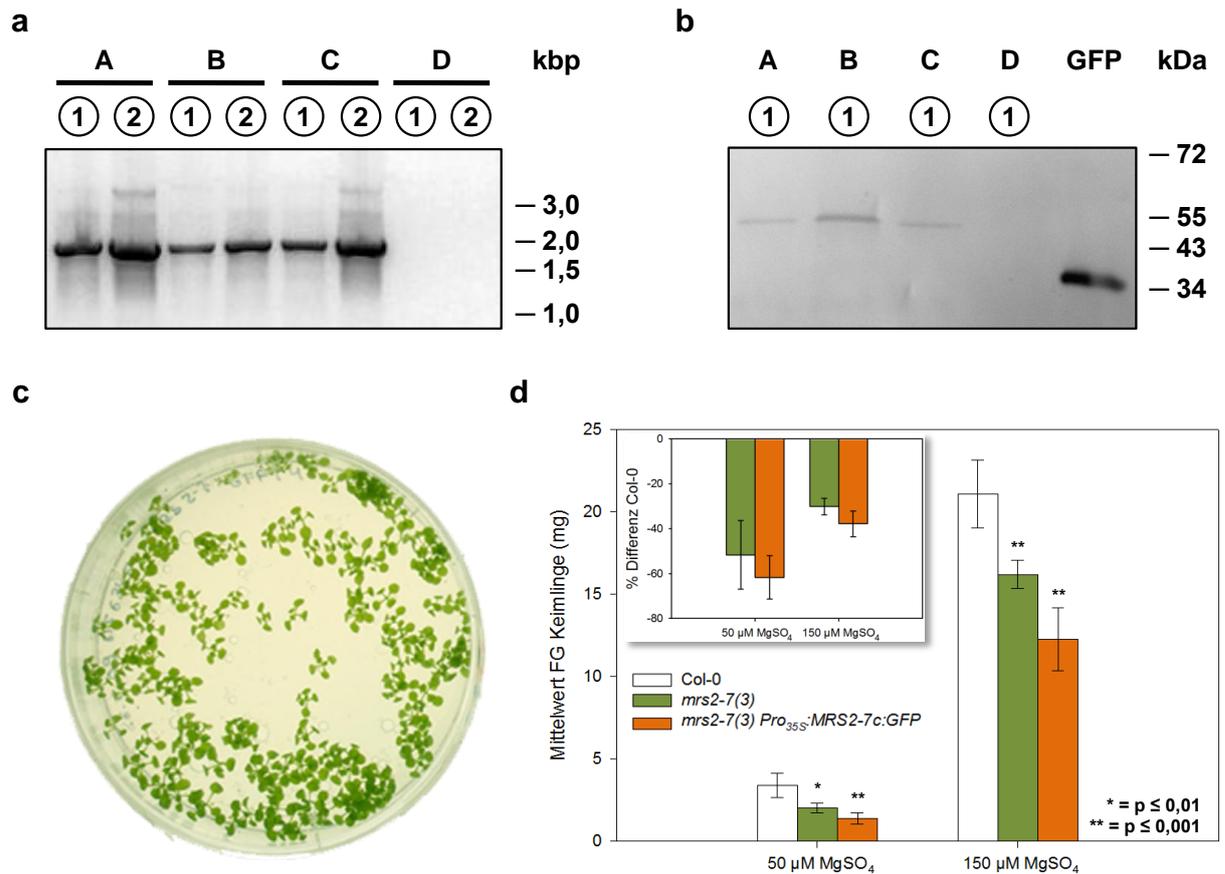


Abbildung 2.21. Nachweis der *MRS2-7:GFP* Transkription und Translation sowie Komplementationsstudien in *mrs2-7* Linien im Vergleich zu Wildtyp *Arabidopsis*.

(a) und (b) Nachweis der *MRS2-7c:GFP* Transkription und Translation in den drei mit *Pro_{35S}:MRS2-7c:GFP* transformierten *Knockout*-Linien *mrs2-7(1)* (A), *mrs2-7(3)* (B), *mrs2-7(2)* (C) gegenüber Wildtyp Col-0 (D). Ergebnis der RT-PCRs (a) mit Primern für das vollständige Transkript aus jeweils zwei Pflanzen und *Western-Blot* (b) nach SDS-PAGE mit Proteinnachweis durch α -GFP-Antikörper für je eine der beiden Pflanzen. (c) Selektion auf Hygromycinresistenz von Nachkommen einer homozygoten *mrs2-7(3) Pro_{35S}:MRS2-7c:GFP* Pflanze auf Kulturschale mit MS-Medium. (d) Mittleres Frischgewicht von *Arabidopsis*-Keimlingen nach zwei Wochen Flüssigkultur mit 50 μ M oder 150 μ M MgSO₄ im Medium und deren Standardabweichung. Das eingesetzte Diagramm zeigt die mittlere prozentuale Verringerung der Biomassenproduktion der beiden transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp aus zwei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichung.

2.4. Komplementation von *mrs2Δ* Mutanten und Mg^{2+} -Transportmessungen in *Saccharomyces cerevisiae*

Immer wenn die Untersuchung eines Gens oder seines Produktes im Ursprungsorganismus nicht oder nur sehr schwer und zeitaufwändig realisierbar ist, braucht man alternative Modellsysteme, um dennoch Rückschlüsse auf dessen mögliche Bedeutung ziehen zu können. Die funktionelle Komplementation von Mutanten des Ascomyceten *Saccharomyces cerevisiae* ist ein weit verbreiteter Ansatz, um in einem einfach zu kultivierenden, aber trotzdem eukaryontischen Organismus unbekannte Gene zu exprimieren und ihre Funktionsweise zu studieren.

Die Hefe *mrs2Δ* Mutante ist seit den frühen 1990er Jahren bekannt und inzwischen sehr gut charakterisiert. Sie zeigt als Phänotyp einen *petite* (*pet⁻*) Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerin und ist nicht mehr in der Lage, mitochondriale Gruppe-II-Introns aus der prä-mRNA zu spleißen (Wiesenberger *et al.* 1992). Dadurch bedingt fehlen das Cytochrom b (COB) und die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase (COX1) aus den Komplexen III und IV der mitochondrialen Atmungskette, was die Energiegewinnung dieser Mutante auf die Fermentation von Kohlenhydraten beschränkt. Bisher war bereits die Komplementation der *mrs2Δ* Mutante durch Expression des bakteriellen *CorA* aus *Salmonella typhimurium*, des pflanzlichen MRS2-1 aus *Arabidopsis* und des humanen Mrs2 Proteins erfolgreich (Bui *et al.* 1999; Schock *et al.* 2000; Zsurka *et al.* 2001), während das paraloge Lpe10p hierzu nicht in der Lage war (Gregan *et al.* 2001b; Sponder *et al.* 2010).

Für die im folgenden beschriebenen Experimente war es wichtig, dass die zu untersuchenden Proteine in dasselbe zelluläre Kompartiment wie das deletierte Mrs2p gelangen konnten, um dessen Funktion als Magnesiumtransporter in der inneren Mitochondrienmembran zu übernehmen. Daher wurden die *CorA*/*Mrs2*/*Lpe10* Proteinsequenzen aller Organismen auf das Vorhandensein von charakteristischen Sekundärstrukturen, konservierten Aminosäuremotiven und potentiellen Transitpeptiden untersucht. Daraufhin erfolgte die Klonierung und Expression der neun funktionalen *MRS2* Gene aus *Arabidopsis* in der *mrs2Δ* Mutante, der Test auf funktionelle Komplementation durch selektive Nährmedien und die Quantifizierung der Magnesiumaufnahme anhand isolierter Hefemitochondrien.

2.4.1. Vergleichende Analyse von *CorA*/*Mrs2*/*Lpe10* Proteinen auf strukturelle Gemeinsamkeiten

Vorangegangene phylogenetische Untersuchungen zeigten eine Verwandtschaft von *CorA* und *MRS2* Proteinen und das Vorhandensein von hochkonservierten Aminosäuresequenzen, z.B. dem Tripeptid GMN im c-terminalen Bereich des Proteins (Knoop *et al.* 2005). In *Arabidopsis thaliana* ist das erste universell vorhandene Motiv innerhalb der *MRS2*/*MGT* Genfamilie (Schock *et al.* 2000; Li *et al.* 2001) ein "RDLR" nahe des N-Terminus, es gibt allerdings weitere *CorA*-ähnliche Proteine ohne derartige Motive. Ein weiteres konserviertes Motiv ist ein "EMLLE" zu Beginn der $\alpha 7$ -Helix. Analog hierzu besitzen *Lpe10p* und *Mrs2p* aus der Bäckerhefe diese Motive, die Proteine *Alr1p*, *Alr2p* und *Mnr2p* hingegen nicht. Diese Motive entstanden

wahrscheinlich mit der Entwicklung der Eukaryonten, da Proteine mit RDLR und EMLLE Sequenz bereits im Genom der amöboiden Einzeller *Naegleria gruberi* und *Dictyostelium discoideum*, aber nicht in Prokaryonten vorhergesagt sind. Daneben gibt es in diesen Organismen auch Proteinvorhersagen ohne derartige Motive (Daten nicht gezeigt). Die *Arabidopsis* Proteine MRS2-6 und MRS2-11 zeigen je einen konservativen Aminosäureaustausch innerhalb des RLDR Motivs (KDLR bzw. RDIR), der wahrscheinlich nach der Diversifikation der Genfamilie in den Landpflanzen geschehen ist.

Neben den homologen Aminosäuresequenzen teilen sich alle bisher bekannten Mitglieder der CorA Proteinfamilie ein identisches Bauprinzip, bestehend aus zwei Transmembrandomänen am C-Terminus. Der Vergleich von Röntgenstrukturanalysen des CorA Proteins aus *Thermotoga maritima* (Abb. 2.22 a) und bioinformatischen Vorhersagemodellen der Sekundärstruktur von MRS2 Proteinen (Abb. 2.22 b) zeigte außerdem eine hohe Übereinstimmung in der Anordnung und Länge von Regionen mit α -Helices oder β -Faltblättern. Während das GMN Motiv immer am Ende des membrandurchspannenden Abschnittes von $\alpha 7$ lag, war das RLDR Motiv in dem zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4$ entsprechenden Bereich zu finden. Bei den bereits bekannten mitochondrialen Mg-Transportern aus Mensch und Hefe und drei weiteren MRS2 Proteinen aus *Arabidopsis* wurde durch den TargetP 1.1 Algorithmus (Emanuelsson *et al.* 2007) ein Transitpeptid vorhergesagt. Diese Vorhersage erwartete eine Sortierung von MRS2-11 in die Chloroplasten und der anderen fünf Proteine in die Mitochondrien, wobei MRS2-4 möglicherweise in beiden Kompartimenten lokalisiert sein könnte. MRS2-1 und MRS2-10 besitzen durch SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.* 2004) vorhergesagte Signalsequenzen und könnten über ER und Golgi-Apparat weiter zur Plasmamembran oder zum Tonoplasten transportiert werden.

2.4.2. Klonierung von chimären *MRS2* Expressionskonstrukten und Transformation in *mrs2* Δ Mutanten

Wie vorangegangene Komplementationsstudien in Hefe zeigten, können CorA und MRS2-1 die *mrs2* Δ Mutante nur dann komplementieren, wenn die ersten 48 bzw. 95 Aminosäuren von Mrs2p an den N-Terminus fusioniert sind und das Protein dadurch in die Mitochondrien dirigiert wird (Bui *et al.* 1999; Schock *et al.* 2000), während das humane Mrs2 Protein aufgrund seines eigenen mitochondrialen Transitpeptides (mtTP) selbstständig in das Zielkompartiment gelangen kann (Zsurka *et al.* 2001). Alle bisher untersuchten *Arabidopsis* MRS2:GFP Fusionsproteine zeigten nach Expression in *Saccharomyces cerevisiae* keine Co-Lokalisation mit dem Fluoreszenzsignal des *Mitotracker Red* Farbstoffes (Drummond *et al.* 2006). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die nativen *Arabidopsis* MRS2 Proteine, ob mit oder ohne vorhergesagtem Transitpeptid, in die innere Membran der Hefemitochondrien importiert werden können.

Um sicherzustellen, dass die Proteine dennoch ihren vorgesehenen Zielort erreichen können, sollten Proteinchimären, bestehend aus dem mtTP von Mrs2p und den neun funktionalen *Arabidopsis* MRS2 Proteinen unter regulatorischer Kontrolle der 240 bp langen 5'-Region vom *MRS2* der Hefe exprimiert werden. Diese Fusionskonstrukte enthalten die ersten 95 Aminosäuren vor dem konservierten RDLR Motiv von Mrs2p und die entsprechend N-terminal verkürzten MRS2 Proteine ab diesem Bereich. Die Klonierungsstrategie sah vor, zuerst die einzelnen Be-

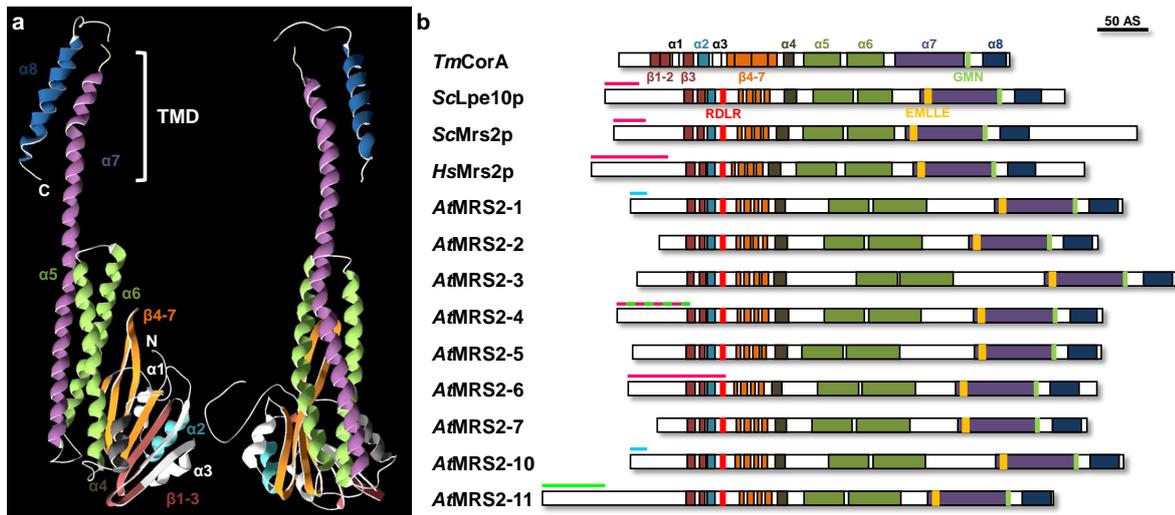


Abbildung 2.22. Tertiäre Proteinstruktur von CorA aus *Thermotoga maritima* (Tm) und Sekundärstrukturmodelle von homologen MRS2 Proteinen in Hefe (*Sc*), Mensch (*Hs*) und Arabidopsis (*At*).

(a) 3D-Modell von *TmCorA* (PDB_2IUB) nach Kristallstrukturanalyse (Eshaghi *et al.* 2006) mit unterschiedlich eingefärbten α -Helices und β -Faltblattregionen. (b) Schematische Übersicht der mit Jpred 3 (Cole *et al.* 2008) vorhergesagten Sekundärstrukturen bzw. Signalsequenzen (hellblau) oder Transitpetide für Mitochondrien (pink) oder Chloroplasten (hellgrün) des SignalP 3.0 bzw. TargetP 1.1 Algorithmus (Bendtsen *et al.* 2004; Emanuelsson *et al.* 2007) von ausgewählten CorA/Mrs2/Lpe10 Proteinen. Eingezeichnet ist außerdem die jeweilige Lage der konservierten "GMN" (grün), "EMLLE" (gelb) und "RDLR" (rot) Peptidmotive.

reiche aus den beiden Organismen zu vervielfältigen, anschließend über eine so genannte *overlap extension*-PCR zu verknüpfen und letztendlich in einen für Bakterien und Hefen geeigneten *Shuttle*-Vektor zu integrieren.

Der N-terminale Bestandteil *Pro_{MRS2}:MRS2 Δ _C* wurde durch eine PCR mit einem Primerpaar, welches die Positionen 1 - 525 der *ScMRS2*-Nukleotidsequenz (GenBank M82916) umfasste, von Plasmid YEp351/MRS2 (Wiesenberger *et al.* 1992) amplifiziert. Für den zweiten Teil des Fusionskonstruktes wurde die PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden, welche in der RDLR Region und vor dem Stopcodon binden, auf vorhandene cDNAs aller neun funktionalen *MRS2* Gene von *Arabidopsis* durchgeführt. Der hintere Primer enthielt zusätzlich die 27 bp lange codierende Sequenz für ein Hämagglutinin-Epitop (YPYDVPDYA), gefolgt von einem Stopcodon, um insgesamt *MRS2-xc Δ _N:HA* zu erhalten.

Die Verbindung der PCR-Produkte geschah durch einen 18 bp Überhang komplementär zum Ende der *Pro_{MRS2}:MRS2 Δ _C* Region in einer *overlap extension*-PCR mit dem vorderen Primer für *ScMRS2* und dem hinteren Primer des jeweiligen *AtMRS2* Gens (Abb. 2.23). Über die in diesen Primern ebenfalls vorhandenen Restriktionsschnittstellen wurden die Fusionskonstrukte in den Vektor YEp351 (Hill *et al.* 1986) integriert und zur Vermehrung in *Escherichia coli* transformiert. Nach einer Kontrollsequenzierung wurden die fertigen Expressionskonstrukte zur AG Schweyen an das Max F. Perutz Labor (MFPL) in Wien verschickt, dort erfolgte die Transformation in die *mrs2Δ* Mutante mit anschließender Selektion auf Minimalmedium zur Komplementation der Leucin-Auxotrophie durch das *LEU2* Gen des Vektors.

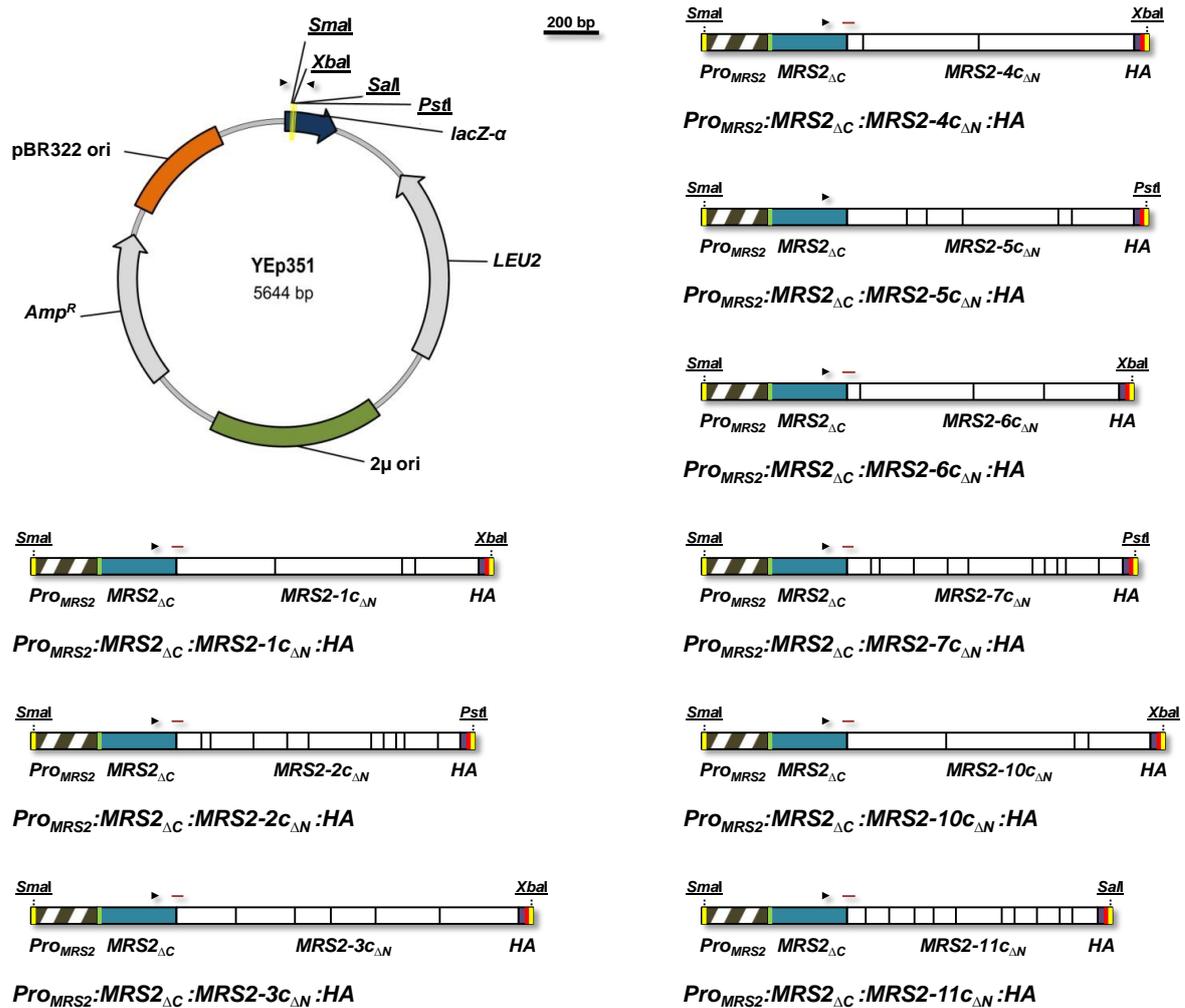


Abbildung 2.23. Vektorkarte von YEp351 und *MRS2* Fusionskonstrukte für funktionelle Komplementationsstudien in Hefe *mrs2Δ* Mutanten.

Farbig hervorgehobene Abschnitte des Vektors repräsentieren den *LEU2*-Selektionsfaktor und das Ampicillin-Resistenzgen *bla* (hellgrau), *lacZ-α* mit Polylinker (dunkelblau), Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (gelbe Balken), Replikationselemente aus pBR322 (orange) bzw. dem 2μ Plasmid (grün) und die Bindungsstellen der Sequenzierungsprimer (schwarze Pfeile). Daneben sind zusätzlich bei den Fusionskonstrukten der putative Promotorbereich (weiß-dunkelgrau) und der N-Terminus des verkürzten *MRS2* (hellblau) aus *Saccharomyces*, sowie die *MRS2-x* Exonregionen von *Arabidopsis* (weiß), das HA-Epitop (violett), Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) und die Primerbindungsstelle der *overlap extension* PCR (dunkelroter Strich) eingezeichnet.

2.4.3. Wachstumstest auf selektivem Medium und Mg²⁺-Aufnahmemessungen mit transformierten *mrs2Δ* Hefen

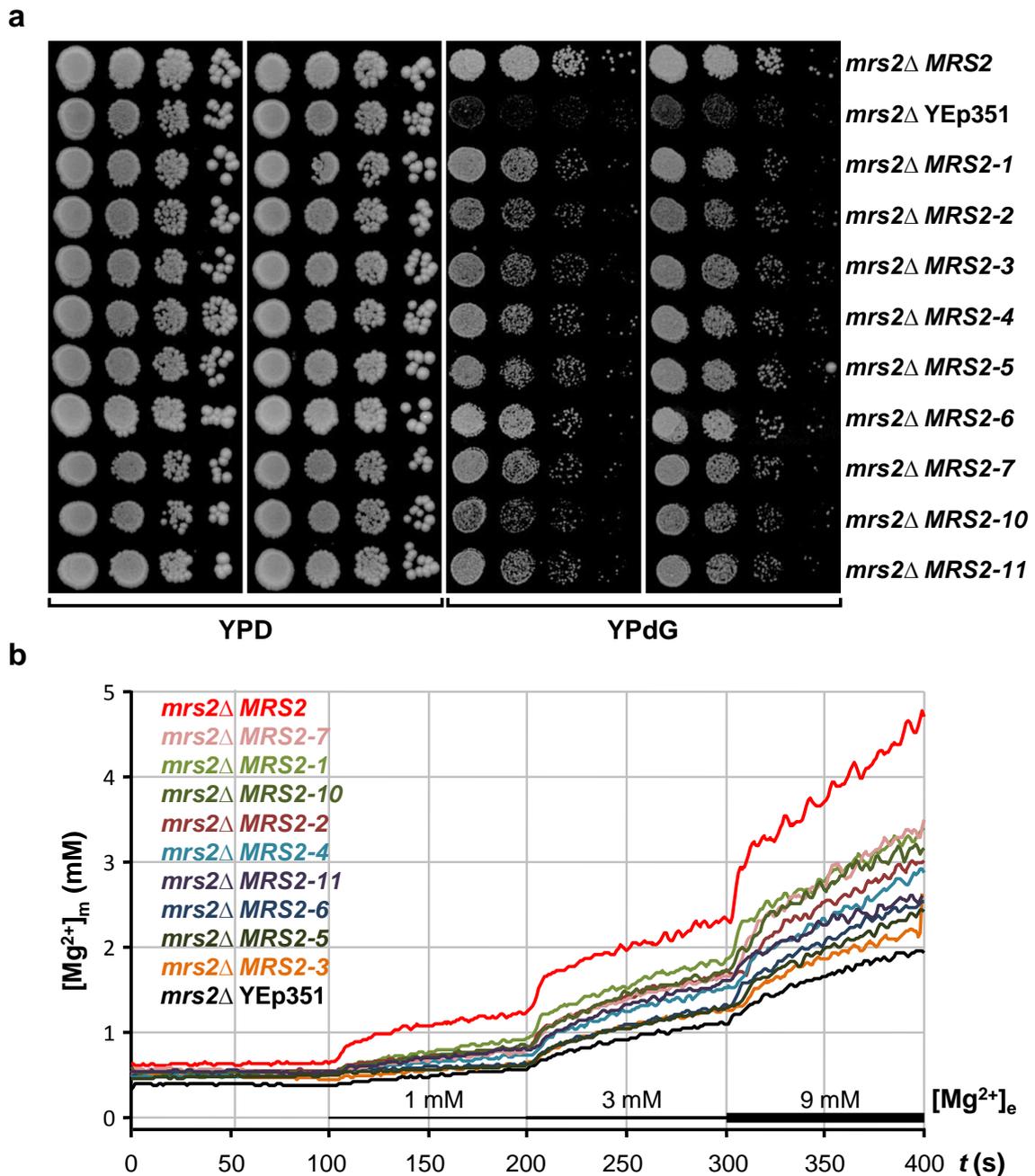
Neben der funktionellen Komplementation der *mrs2Δ* Mutante und Aufhebung des *pet⁻*-Phänotyps auf Medien mit nicht-fermentierbaren Kohlenhydraten als C-Quelle ist ein System etabliert, mit dem der Magnesiumtransport in isolierte Hefemitochondrien oder *Salmonella enterica*-Zellen bestimmt werden kann (Kolisek *et al.* 2003; Froschauer *et al.* 2004). Die freie

Mg²⁺-Konzentration lässt sich hierbei über die Veränderung der Fluoreszenzintensität eines Mg-komplexierenden Farbstoffes, dem mag-fura 2, durch eine Verschiebung der Anregungswellenlänge von 380 nm (ungebunden) auf 340 nm (gebunden) bestimmen. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden alle im Rahmen einer Kooperation von Soňa Svidová aus der AG Schweyen am MFPL in Wien durchgeführt.

Die transformierten *mrs2Δ* Hefen sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden, ausgehend von Leu-selektiven Flüssigkulturen mit einer OD₆₀₀ von 1, in 1:10 Verdünnungsschritten auf Medium mit und ohne fermentierbare Kohlenstoffquelle (YPD bzw. YPdG) getropft. Auf nichtselektivem YPD-Medium war sowohl bei allen Fusionskonstrukten als auch bei den Kontrollen ein der jeweiligen Ausgangskonzentration entsprechendes gleichförmig starkes Koloniewachstum zu erkennen. Wie erwartet konnte die *mrs2Δ* Mutante bei Transformation mit dem leeren YEp351 Vektor nicht auf dem selektiven YPdG-Medium wachsen. Alle der neun getesteten *Arabidopsis* MRS2 Proteine waren in der Lage, auf dem Medium mit nichtfermentierbarer Kohlenstoffquelle Wachstum zu vermitteln. Untereinander verglichen wuchsen die Hefen mit MRS2-6 ein wenig stärker, aber immer noch deutlich schlechter als mit dem endogenen Mrs2p (Abb. 2.24 a).

Für die Transportmessung wurden die Hefemitochondrien aus den transformierten Hefen isoliert, mit einer membrangängigen Variante des mag-fura 2 Farbstoffes beladen und das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensität bei kontinuierlichem Wechsel zwischen Anregung bei 340 und 380 nm aufgezeichnet (R). Es folgte die Zugabe von 1, 3 und 9 mM MgCl₂ in das externe Medium ($[Mg^{2+}]_e$) nach jeweils 100, 200 und 300 s Inkubation. Die Mg²⁺-Konzentration innerhalb der Mitochondrien ($[Mg^{2+}]_m$) wurde mit der Formel $[Mg^{2+}]_m = K_d \times \frac{R - R_{Min}}{R_{Max} - R}$ berechnet (Gryniewicz *et al.* 1985). Die hierfür nötige Kalibrierung des Systems erfolgte über die abschließende Zugabe von SDS (R_{Max}) gefolgt von EDTA (R_{Min}). Als Dissoziationskonstante (K_d) des mag-fura 2/Mg²⁺-Komplexes wurde der Wert 1,52 verwendet.

Das Kurvendiagramm (Abb. 2.24 b) fasst den zeitlichen Verlauf der Mg-Aufnahme für alle MRS2 Fusionskonstrukte und die Kontrollen aus dem Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten zusammen. Interne *steady-state* Mg-Konzentration lagen bei etwa 0,5 mM zu Beginn der Messungen, in Mitochondrien mit endogenem MRS2 etwas höher. Alle *Arabidopsis* MRS2 Proteine vermittelten eine stärkere Mg-Aufnahme als der leere Vektor, transportierten aber schlechter als das MRS2 der Hefe. MRS2-1, MRS2-10 und MRS2-7 besaßen die höchste Aufnahmekapazität, gefolgt von den sechs anderen *Arabidopsis* MRS2 Proteinen. Unter diesen zeigte MRS2-3 den schwächsten mitochondrialen Mg²⁺-Import. Der Kurvenverlauf deutet eine individuelle Aufnahmesättigung bei den einzelnen MgCl₂-Außenkonzentration an, und der erneut stärkere Anstieg bei Zugabe von höheren Konzentrationen fiel ebenfalls unterschiedlich aus. Beides war aber für das jeweilige Protein vergleichbar mit dessen gesamter Aufnahmekapazität. Eine Bestimmung der absoluten Proteinmenge über einen Western-Blot mit Antikörpern gegen das HA-Epitop war nicht erfolgreich, so dass letztendlich die Transportkinetik (K_m -Wert) für die einzelnen Proteine nicht errechnet werden konnte.



2.5. Etablierung von *Escherichia coli* Magnesiumtransportmutanten für funktionelle Untersuchungen

Neben der Bäckerhefe sind vor allem Prokaryonten wie beispielsweise das Bakterium *Escherichia coli* als Modellsystem für die Charakterisierung von bisher unbekannt Genen oder Proteinen gut geeignet. Sie sind leicht zu kultivieren, und funktionelle Mutanten sind entweder schon in Kollektionen verfügbar oder mit einfachen Mittel selber herzustellen. Daher gehören sie zu den bisher am besten untersuchten Organismen und bieten eine vielseitige Palette an molekularen und physiologischen Techniken zur Grundlagenforschung und darüber hinaus für biotechnologische Anwendungen.

Für das γ -Proteobakterium *Salmonella typhimurium* wurden seit 1989 verschiedene *Knock-out*-Mutanten isoliert, die auf Standardmedien wie z.B. *lysogeny broth* (LB) nur durch 10 mM Mg-Supplementation wachsen können. Die dafür verantwortlichen Genloci sind *CorA*, *MgtA* und *MgtB* (Hmiel *et al.* 1986; Hmiel *et al.* 1989; Snavely *et al.* 1989a; Snavely *et al.* 1989b). Die aus diesen Untersuchungen stammende *Salmonella*-Tripelmutante MM281 ($\Delta corA \Delta mgtA \Delta mgtB$) wurde im vergangenen Jahrzehnt bereits erfolgreich zur funktionellen Komplementation mit den *Arabidopsis* Genen *MRS2-10*, *MRS2-6*, *MRS2-7* und *MRS2-2* verwendet (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Mao *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b).

Gemäß den Empfehlungen der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) sind alle *S. typhimurium* LT2-Stämme in Deutschland grundsätzlich der Risikogruppe 2 zuzuordnen. Um einen risikoärmeren, aber dennoch gleichwertigen Modellorganismus für Forschungszwecke zur Verfügung zu haben, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine dem MM281-Stamm entsprechende *E. coli*-Mutante als Alternative für funktionelle Komplementationsstudien erzeugt werden.

2.5.1. Herstellung und Charakterisierung von $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Mutanten

Eine vielfach bewährte und einfache Methode, um *E. coli*-Mutanten herzustellen, ist das Ersetzen eines Zielgens durch einen selektierbaren Marker mithilfe der homologen Rekombination (Datsenko und Wanner 2000). Hierzu verwendet man in der Regel ein aufgereinigtes PCR-Produkt, das aus einem Resistenzgen wie z.B. der Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*) oder Neomycin-Phosphotransferase II (*nptII*) besteht. Flankiert wird dieses von 30 - 50 bp langen Bereichen, die identisch bzw. ähnlich zu der als Insertionsort gewünschten Genregion sind. Dieses DNA-Fragment wird in den zur Aufnahme von linearer DNA optimierten *E. coli*-Stamm BW25113 transformiert und das *red*-Rekombinasesystem des Bakteriophagen λ ersetzt mit ihm das Zielgen. Die Selektion auf erfolgreiche Rekombination erfolgt über die Antibiotikumresistenz, welche anschließend über eine Flippase (FLP) und die im Fragment vorhandenen *FLP-recombinase target*-Sequenzen (FRT) wieder entfernt werden kann. Zusätzlich läßt sich der Genotyp über einen PCR-basierten Ansatz verifizieren

E. coli besitzt zwei bislang identifizierte Gene für funktionelle Magnesiumtransporter, *CorA* und *MgtA*, jedoch kein *MgtB* wie *Salmonella*. Das folgende Schema verdeutlicht, wie die homologe Rekombination der beiden Zielgene mit den zwei Resistenzgenen *Kan^R* und *Cm^R* ablaufen

sollte. Weiterhin zeigt es die Bindungsstellen der Oligonukleotide, mit welchen der Genotyp der Bakterien per Kolonie-PCR verifiziert werden kann (Abb. 2.25 a - d). Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte von allen verwendeten Primerkombinationen sind für jeden Genotyp in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

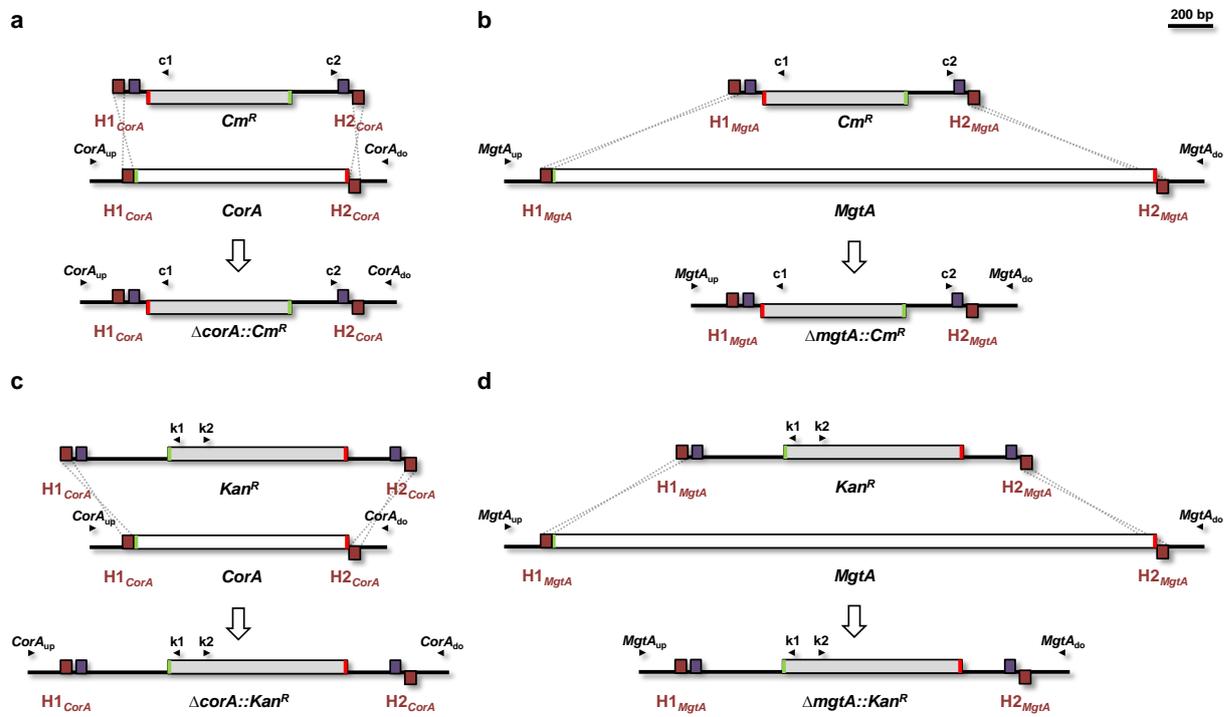


Abbildung 2.25. Rekombinationsschema für *CorA* und *MgtA* mit PCR-Produkten bestehend aus Antibiotikumsresistenz und flankierenden homologen Bereichen.

(a) bis (d) Die farblich hervorgehobenen Bereiche entsprechen den Antibiotikaresistenzgenen (grau), codierenden Genregionen in *E. coli* (weiß), homologen Sequenzbereichen (dunkelrot) und Flippase-Erkennungsstellen (violett). Eingezeichnet sind außerdem Primerbindungsstellen für die Genotypisierung (schwarze Pfeile) sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken).

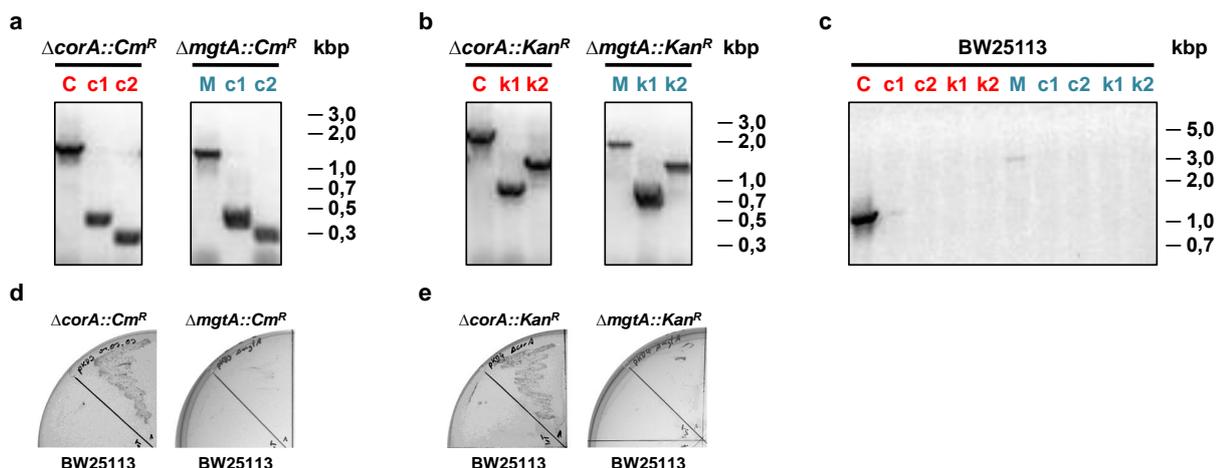
Nach Transformation mit den linearen DNA-Fragmenten und anschließender Selektion auf LB-Medium mit Kanamycin oder Chloramphenicol wurden einzelne resistente Klone ausgewählt und mit dem *E. coli*-Stamm BW25113 als Wildtypkontrolle genotypisiert. Die dabei erhaltenen PCR-Fragmentmuster entsprachen den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 2.5), lediglich das Produkt für das *MgtA* Gen in Ansatz M war beim Wildtyp nur sehr schwach zu erkennen (Abb. 2.26 a - c).

Wenn das *CorA* Protein erfolgreich deletiert wurde, sollten die entsprechenden Bakterien gegenüber hohen Cobalt-Konzentrationen resistent sein (Park *et al.* 1976). Daher wurden alle verifizierten *Knockout*-Klone zusätzlich auf LB-Medium mit 3 mM CoCl_3 ausgestrichen und drei Tage inkubiert. Alle $\Delta corA$ Mutanten waren in der Lage, unter diesen toxischen Bedingungen zu wachsen, die $\Delta mgtA$ Mutanten und der unveränderte BW25113-Stamm hingegen nicht (Abb. 2.26 d und e).

Tabelle 2.5. Primerkombinationen und PCR-Fragmentgrößen für die Genotypisierung von *Escherichia coli* $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Mutanten und Wildtyp BW25113.

<i>E. coli</i> Genotyp	Primerkombination			Abk.	PCR-Produkt (kbp)		
	vorwärts	/	zurück		KO	/	WT
BW25113 $\Delta corA::Cm^R$	<i>CorA_{up}</i>	/	<i>CorA_{do}</i>	C	1,4	/	1,3
	<i>CorA_{up}</i>	/	c1	c1	0,4	/	–
	c2	/	<i>CorA_{do}</i>	c2	0,3	/	–
BW25113 $\Delta mgtA::Cm^R$	<i>MgtA_{up}</i>	/	<i>MgtA_{do}</i>	M	1,5	/	3,1
	<i>MgtA_{up}</i>	/	c1	c1	0,4	/	–
	c2	/	<i>MgtA_{do}</i>	c2	0,3	/	–
BW25113 $\Delta corA::Kan^R$	<i>CorA_{up}</i>	/	<i>CorA_{do}</i>	C	1,9	/	1,3
	<i>CorA_{up}</i>	/	k1	k1	0,7	/	–
	k2	/	<i>CorA_{do}</i>	k2	1,1	/	–
BW25113 $\Delta mgtA::Kan^R$	<i>MgtA_{up}</i>	/	<i>MgtA_{do}</i>	M	1,9	/	3,1
	<i>MgtA_{up}</i>	/	k1	k1	0,7	/	–
	k2	/	<i>MgtA_{do}</i>	k2	1,1	/	–

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: Cm^R = Chloramphenicolresistenz, Kan^R = Kanamycinresistenz, KO = *Knockout*-Mutante und WT = Wildtyp BW25113.

**Abbildung 2.26.** Genotypisierung von *E. coli* *Knockout*-Mutanten und Wildtyp BW25113 mit Test auf veränderte Cobaltsensitivität.

(a) bis (c) PCR-Ergebnisse mit Primerkombinationen für *CorA* (C) in rot und *MgtA* (M) in blau sowie den spezifischen Oligonukleotiden für die Resistenzgene Cm^R (c1 und c2) und Kan^R (k1 und k2). (d) und (e) Wachstum von verschiedenen *CorA* und *MgtA* Genotypen auf 3 mM $CoCl_2$ nach drei Tagen Inkubation.

2.5.2. Herstellung und Charakterisierung von $\Delta corA$ $\Delta mgtA$ Doppelmutanten

Wie bei *Salmonella* zeigten in *E. coli* die $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Mutanten keinen magnesium-abhängigen Phänotyp, da immer noch das jeweilige andere Mg^{2+} -Transportprotein vorhanden war. Daher sollte nun in einem weiteren Schritt dieser zweite Mg^{2+} -Transporter deletiert wer-

den. Hierzu wurden in die existierenden Mutanten DNA-Fragmente mit der jeweils anderen Antibiotikumresistenz, flankiert von homologen Regionen für das noch intakte Gen, eingebracht. Daraus abgeleitete Mutanten zeigten beide Resistenzen, aber das PCR-Fragmentmuster nach einer Gelelektrophorese entsprach nicht den Erwartungen, da die Molekulargewichte der PCR-Produkte für die Ansätze C, c2 und M zu hoch waren und in den Ansätzen k1 und k2 keine DNA amplifiziert wurde (Tab. 2.5 und Abb. 2.27 a). Die Sequenzierung des PCR-Produktes aus Ansatz C ergab, dass nicht die 50 bp großen, homologen Regionen $H1_{MgtA}$ und $H2_{MgtA}$, sondern die weiter innen liegenden, 46 bp großen FRT-Erkennungssequenzen zur Rekombination in den hinteren FRT-Abschnitt der in dem *CorA* Gen bereits vorhandenen Cm^R -Insertion verwendet wurden (Abb. 2.27 b) und der erzeugte Stamm entsprechend kein Doppel-Knockout war. In einem weiteren Fall geschah diese unbeabsichtigte Rekombination in den vorderen FRT-Abschnitt dieses Insertionsfragmentes (Daten nicht gezeigt). Die bereits beschriebene Metho-

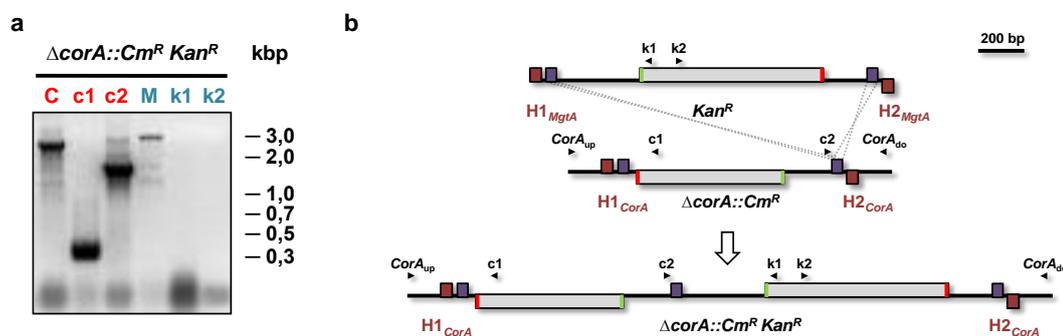


Abbildung 2.27. Genotypisierung von potentiellen *E. coli* Doppelmutanten und Rekombinationsschema für falsch inserierte Resistenzgene.

(a) PCR-Ergebnisse mit Primerkombinationen für *CorA* (C) in rot und *MgtA* (M) in blau sowie den spezifischen Oligonukleotiden für die Resistenzgene Cm^R (c1 und c2) und Kan^R (k1 und k2). (b) Die im Rekombinationsschema farbig hervorgehobenen Bereiche entsprechen den Antibiotikaresistenzgenen (grau), homologen Sequenzbereichen (dunkelrot) und Flippase-Erkennungsstellen (violett). Eingezeichnet sind außerdem Primerbindungsstellen für die Genotypisierung (schwarze Pfeile) sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken).

de wurde mit einem verkürzten DNA-Fragment ohne FRT-Erkennungssequenzen wiederholt und der erwartete Genotyp durch das PCR-Fragmentmuster verifiziert (Tab. 2.5 und Abb. 2.28 a und b). Der nun vorhandene $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppel-Knockout konnte nur wachsen, wenn das LB-Medium mit 10 mM $MgSO_4$ supplementiert wurde (Abb. 2.28 c). Die Aufzeichnung von OD_{600} -Wachstumskurven für Wildtyp und $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Einzelmutanten in Flüssigmedium mit und ohne $MgSO_4$ -Zusatz zeigten zu Beginn ein exponentielles Wachstum mit Übergang in ein Plateau nach etwa drei Stunden. Der $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppel-Knockout konnte ohne zusätzliches Magnesium erneut nicht wachsen, mit Supplementation im Vergleich zu BW25113 und den Einzel-Knockouts jedoch nur leicht verzögert. Die $\Delta corA$ bzw. $\Delta mgtA$ Einzelmutanten erreichten mit zusätzlichem Magnesium im Medium höhere OD_{600} -Werte, während der Wildtyp davon unbeeinflusst blieb (Abb. 2.28 d). Die $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante kann im Gegensatz zur $\Delta corA$ Einzelmutante auf 3 mM $CoCl_2$ trotz zusätzlichen 10 mM $MgSO_4$ nicht wachsen, der Wildtyp hingegen zeigt ein stärkeres Wachstum als auf cobalthaltigem Medium ohne Magne-

siumsupplementation (Abb. 2.28 e, Abb. 2.26 d und e). Erste Versuche mit MRS2 Konstrukten in dem bakteriellen Expressionsvektor pBluescript II führten zu keiner Komplementation der $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante auf LB-Medium ohne zusätzliches $MgSO_4$ (Daten nicht gezeigt).

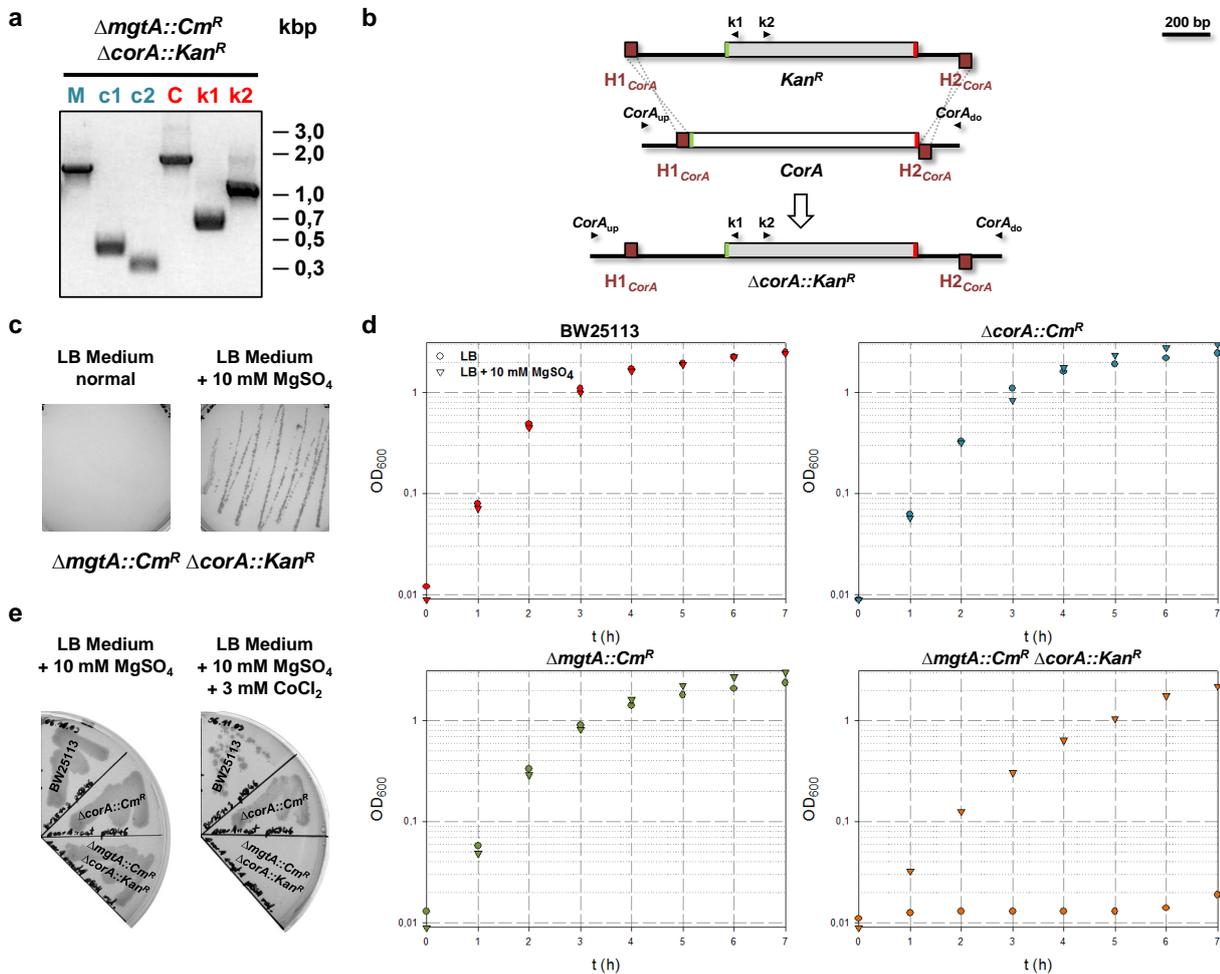


Abbildung 2.28. Genotypisierung von *E. coli* Doppelmutanten und Rekombinationsschema ohne FRT-Sequenzen sowie Mg^{2+} bzw. Co^{2+} -abhängiger Wachstumsdefekt.

(a) PCR-Ergebnisse mit Primerkombinationen für *CorA* (C) in rot und *MgtA* (M) in blau sowie den spezifischen Oligonukleotiden für die Resistenzgene Cm^R (c1 und c2) und Kan^R (k1 und k2). (b) Die im Rekombinationsschema farblich hervorgehobenen Bereiche entsprechen den Antibiotikaresistenzgenen (grau), codierenden Genregionen in *E. coli* (weiß) und homologen Sequenzbereichen (dunkelrot). Eingezeichnet sind außerdem Primerbindungsstellen für die Genotypisierung (schwarze Pfeile) sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken). (c) Wachstum einer $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante auf LB Medium mit und ohne Zusatz von 10 mM $MgSO_4$ nach zwei Tagen Inkubation. (d) Wachstumskurve von verschiedenen *CorA* und *MgtA* Genotypen in Medium mit (Dreieck) und ohne (Kreis) Zusatz von 10 mM $MgSO_4$. Gemessen wurde die OD_{600} in LB-Flüssigkulturen ausgehend von 0,01 über einen Zeitraum von sieben Stunden. (e) Wachstum des $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppel-Knockouts auf LB Medium mit 10 mM $MgSO_4$ und optionalen 3 mM $CoCl_2$ im Vergleich zu Wildtyp und $\Delta corA$ Mutante nach drei Tagen Inkubation.

3. Diskussion

3.1. Welche *MRS2* Gene sind redundant, und welche essentiell? Eigenarten der pflanzlichen Genfamilien

Funktionelle Redundanz ist weit verbreitet in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, insbesondere in den zahlreichen Genfamilien, die zum Teil im Zuge der Polyploidisierung aus der Duplikation genomischer Regionen hervorgegangen sind (*The Arabidopsis Genome Initiative* 2000; Bouché und Bouchez 2001; Briggs *et al.* 2006). Ein Beispiel für solche Genduplikationen sind zwei große Regionen auf Chromosom 1, in denen sich die jeweils darin codierten Proteine nur geringfügig unterscheiden. In diesen Bereichen liegen die zum Großteil identischen Gene *MRS2-1* und *MRS2-10*, jedoch weichen die Sequenzen der putativen Promotorregionen und 5' UTRs voneinander ab. Die benachbarten Gene *At1g16000* und *At1g80890* codieren für 86 bzw. 80 AS große uncharakterisierte Proteine, die Gene *At1g16020* und *At1g80910* für 515 bzw. 497 AS große Proteine mit einer DUF1712 Domäne unbekannter Funktion (Abb. 3.1). Das entfernter verwandte *MRS2-5* liegt in einem Abschnitt auf Chromosom 2, der zu diesen Regionen keinerlei Ähnlichkeit zeigt.

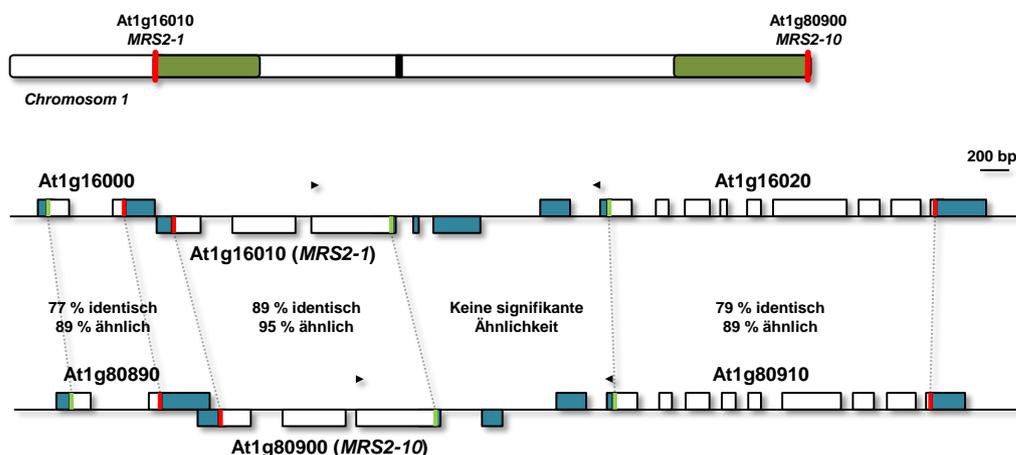


Abbildung 3.1. Vergleich der genomischen Regionen von *MRS2-1* und *MRS2-10* auf *Arabidopsis* Chromosom 1.

Oben: Die dunkelgrün hervorgehobenen Abschnitte auf Chromosom 1 sind durch Duplikation entstanden, der schwarze entspricht dem Centromer. **Unten:** Dargestellt sind codierende (weiße Boxen) und nichtcodierende Bereiche (blaue Boxen) mit untranslatierten 3'- und 5'-Regionen sowie Start- und Stoppcodons (grüner bzw. roter Balken) von *MRS2-1* bzw. *MRS2-10* und benachbarten Genen. Außerdem sind die Primerbindungsstellen (schwarze Pfeile) der Promotor-GUS-Studien eingezeichnet. Die Prozentwerte geben die Anzahl identischer bzw. konservativer Aminosäuren zwischen den Proteinhomologen an.

3.1.1. Die Gene *MRS2-1*, *MRS2-5* und *MRS2-10* sind in *Arabidopsis* entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert

Der *in-situ*-Nachweis von Promotor-GUS-Aktivitäten in *Arabidopsis* zeigt für *Pro_{MRS2-1}:GUS* und *Pro_{MRS2-5}:GUS* ein gemeinsames Expressionsprofil im gesamten Keimling, hingegen für *Pro_{MRS2-10}:GUS* nur in dessen Wurzel. Die putativen Promotorbereiche der Gene *MRS2-1* und *MRS2-5* vermitteln GUS-Färbung in Spreite und Nervatur von Rosettenblättern adulter Pflanzen, während *Pro_{MRS2-1}:GUS* und *Pro_{MRS2-10}:GUS* hauptsächlich in deren primären Wurzeln aktiv sind (Meschenmoser 2008). Die Analyse der Promotoraktivitäten legt nahe, dass *MRS2-1* und *MRS2-5* in den gleichen Geweben und zum selben Entwicklungszeitpunkt exprimiert werden und das Expressionsmuster von *MRS2-10* nur zum Teil Überschneidungen zeigt.

Eine Auswertung von gesammelten Transkriptomdaten der *AtGenExpress*-Initiative durch den *Arabidopsis eFP Browser* (Winter *et al.* 2007) belegt die Expression von *MRS2-1* in allen Pflanzengewebe, am stärksten jedoch in seneszenten Blättern und reifenden Samen. Transkripte von *MRS2-10* sind ebenfalls überall vorhanden, am ausgeprägtesten in der Infloreszenz und im Keimling. Die absolute Expression von *MRS2-10* ist insgesamt deutlich schwächer als die von *MRS2-1* (Abb. 3.2 a). Der relative Vergleich zeigt, dass im Verhältnis zur durchschnittlichen Expression der Gene in Blättern mehr *MRS2-1*- und in Blüten mehr *MRS2-10*-Transkripte gebildet werden (Abb. 3.2 b). Für das Gen *MRS2-5* existiert keine Sonde auf dem weit verbreiteten *Arabidopsis Genome ATH1 Array*, so dass keine vergleichbaren Daten aus cDNA-hybridisierten Genchips vorliegen.

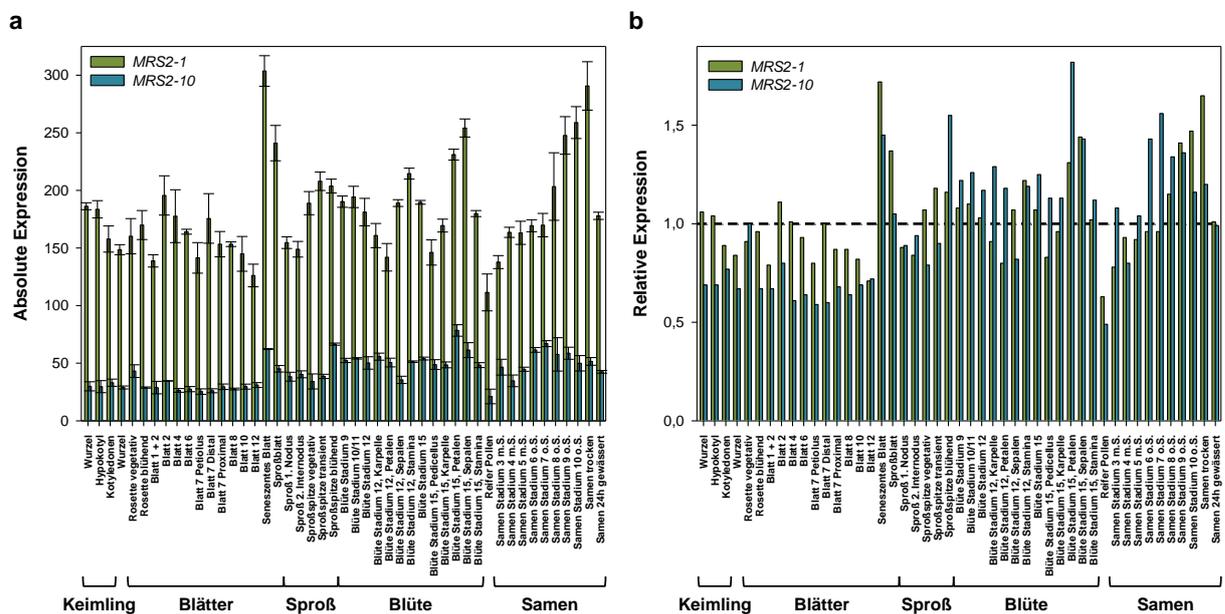


Abbildung 3.2. Expressionsanalyse von *MRS2-1* und *MRS2-10* durch den Affymetrix *ATH1 GeneChip*.

(a) und (b) Transkriptionsstärke von *MRS2-1* und *MRS2-10* in unterschiedlichen *Arabidopsis*-Geweben mit Hilfe von cDNA-hybridisierten Genchips durch die *AtGenExpress*-Initiative. Dargestellt sind die Mittelwerte der absoluten Expression (a) mit der zugehörigen Standardabweichung aus Triplikaten und die relative Expression (b) berechnet aus der Differenz zur mittleren Expression in allen Geweben.

Ein Vorteil der Promotor-GUS-Studien liegt in der Möglichkeit, gewebespezifische Genexpression in mikroskopischen Details sichtbar machen zu können, die in den *Microarrays* mit RNA-Präparationen aus ganzen Pflanzenorganen untergehen. So zeigt *Pro_{MRS2-10}:GUS* beispielsweise distinkte Aktivität in den Hydathoden der Keimblätter und den epidermalen Trichomen adulter Blätter. Bei den Stamina der geöffneten Blüte ist beispielsweise die GUS-Expression in den Filamenten, aber nicht in den Antheren sichtbar (Meschenmoser 2008).

Alternative Expressionsanalysen via RT-PCR zeigen, dass Transkripte von *MRS2-1*, *MRS2-5* und *MRS2-10* in allen Pflanzenorganen von *Arabidopsis* vorhanden sind (Li *et al.* 2001). Die cDNA-Hybridisierung eines maßgeschneiderten $4 \times 44 \text{ k}$ *Microarrays* und qRT-PCRs mit Transkripten aus unterschiedlichen Blattgeweben detektieren die Expression von *MRS2-1*, *MRS2-5* und *MRS2-10* hauptsächlich in Palisadenzellen des Mesophylls. Den Ergebnissen der qRT-PCR zufolge sind nur die *MRS2-10*-Transkripte auch in den adaxialen Epidermiszellen nachzuweisen (Conn *et al.* 2011b).

Die bisherigen Untersuchungen kommen zu unterschiedlichen Aussagen, ob und wie die drei Gene einer transkriptionellen Regulation unterliegen. Eigene semi-quantitative Analysen zeigten bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen ($50 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ und $1,5 \text{ mM}$) keine Änderung des Expressionsniveaus der neun funktionellen *MRS2*-Gene (Gebert *et al.* 2009). Diese Ergebnisse werden durch Transkriptomdaten unterstützt, in denen nur das Pseudogen *MRS2-9* als einziges Mitglied der *MRS2*-Familie, sowohl bei kurz- (28 h) als auch langzeitigem (7 d) Magnesiumdefizit, in Blättern zu 50 % herunterreguliert ist (Hermans *et al.* 2010a; Hermans *et al.* 2010b). Eine Induktion der *MRS2*-Genexpression durch Mg-Mangel ist diesen Erkenntnissen nach nicht vorhanden.

In normalen Böden liegt das Konzentrationsverhältnis von Calcium zu Magnesium zwischen 2:1 und 3:1, wird dieses unterschritten spricht man von *serpentine soils* (Epstein und Bloom 2005). Die Transkriptionsanalyse nach sieben Tagen hydroponischer Kultivierung in einem Medium mit geringerem Ca:Mg-Verhältnis ($[\text{Ca}]:[\text{Mg}] = 1:40$) zeigt in *Arabidopsis*-Blättern eine Zunahme der Expressionsstärke von *MRS2-1*, *MRS2-5*, *MRS2-10* und *MRS2-11* im Vergleich zur Kontrolle (Conn *et al.* 2011b). Das Vorhandensein der Transkripte von *MRS2-1* und *MRS2-5* ist hierbei besonders stark um 250 - 280 % gesteigert. In *mrs2-1* und *mrs2-5* *Knockout*-Mutanten ist unter normalen Bedingungen und bei geringem Ca:Mg-Verhältnis die Expression von *MRS2-5* bzw. *MRS2-1* im Vergleich zum Wildtyp um 60 - 80 % erhöht. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene miteinander in transkriptioneller Wechselwirkung stehen und durch Ca-Mangel induziert werden. In einer anderen Studie mit einem ähnlichen Medium ($[\text{Ca}]:[\text{Mg}] = 1:15$) ist von diesen vier Genen nur *MRS2-10* nach 90 bzw. 180 min um etwa 20 % hochreguliert, möglicherweise bedingt durch den höheren Anteil an Calcium in der Nährlösung (Visscher *et al.* 2010).

3.1.2. In *mrs2-1*, *mrs2-5* und *mrs2-10* Mutanten ist die Zusammensetzung des Ionenprofils verändert

Im Vergleich zum *Arabidopsis* Wildtyp zeigten Ionenprofile der Blätter von *mrs2-5* oder *mrs2-10* Pflanzen Verringerungen im Kalium- bzw. Nickel- und Zinkgehalt von 4 - 10%. Der *mrs2-1 mrs2-5* Doppel-*Knockout* dagegen besaß eine elementare Zusammensetzung mit sechs ver-

änderten Ionenkonzentrationen ($[B]_{\downarrow}$, $[Co]_{\downarrow}$, $[Ca]_{\uparrow}$, $[Ni]_{\uparrow}$, $[Zn]_{\uparrow}$, $[Se]_{\uparrow}$) gegenüber Col-0. In der *mrs2-5 mrs2-10* Doppel-Knockout-Linie ist neben Selen (+ 33 %) auch Molybdän (+ 13 %) in seiner Konzentration erhöht (Abb. 2.6, Tab. 2.3). Die Zusammensetzung der Elemente in diesen Linien deutet darauf hin, dass insbesondere die Kationenhomöostase beeinträchtigt war und darüber hinaus eine Wechselwirkung von Selenat oder Molybdat mit Mg^{2+} , z.B. als Ladungsausgleich, vorhanden sein könnte. Die Aufnahme dieser Mikroelemente erfolgt in Pflanzen als SeO_4^{2-} und MoO_4^{2-} über Mitglieder der Sulfat-Transporter-Familie (SEL1/Sultr1.2 und Sultr5.2), was einen direkten Transport durch MRS2-Proteine unwahrscheinlich macht (Kassis *et al.* 2007; Tomatsu *et al.* 2007). Der SEL1/Sultr1.2 Transporter ist in der Plasmamembran lokalisiert (Shibagaki und Grossman 2004) und Transkriptomanalysen zeigen, dass seine Expression durch Kultivierung unter Mg-Mangelbedingungen nach sieben Tagen um das zweifache hochreguliert ist (Hermans *et al.* 2010b).

In *Arabidopsis* vermitteln BOR1 und NIP5;1/NIP6;1 Aufnahme und Transport von Bor (Miwa und Fujiwara 2010), doch ist bislang nicht bekannt, ob hierbei eine direkte Abhängigkeit zur Magnesiumverfügbarkeit besteht. Divalente Kationen wie Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} werden unspezifisch durch CorA/ALR/MRS2-Proteine transportiert (Hmiel *et al.* 1989; MacDiarmid und Gardner 1998; Li *et al.* 2001; Mao *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b) und könnten aus diesem Grund bei den *Knockout*-Linien in verminderter Konzentration vorliegen. Darüber hinaus werden diese Ionen Mg-ATP-abhängig durch *heavy metal ATPases* (HMAs) über die Plasmamembran transportiert (Yeo und Flowers 2007).

Die Kationen Kalium, Calcium und Magnesium konkurrieren miteinander beim Transport über Membranen oder bei der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase und des osmotischen Potentials (Marschner 1995). In Mesophyllvakuolen sind bei Fütterung von abgetrennten Blättern mit künstlichem Pflanzensaft, der mit 20 mM $MgCl_2$ supplementiert wurde, Ca^{2+} und K^+ als Antagonisten zum erhöhten Mg^{2+} in ihrer Konzentration verringert ($[Mg]_{\uparrow} = [Ca]_{\downarrow}$, $[K]_{\downarrow}$). Im Gegensatz dazu sind Mg^{2+} und K^+ für den Ausgleich geringer Ca^{2+} -Konzentrationen ($[Ca]_{\downarrow} = [Mg]_{\uparrow}$, $[K]_{\uparrow}$) bei Kultivierung in Medium mit geringem Ca:Mg-Verhältnis verantwortlich (Conn *et al.* 2011b). *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen nach acht Tagen Hydroponik ohne Magnesium ein aberrantes Ionenprofil ($[Mg]_{\downarrow}$, $[P]_{\downarrow}$, $[K]_{\downarrow}$, $[Ca]_{\uparrow}$, $[Fe]_{\uparrow}$, $[Cu]_{\uparrow}$, $[Zn]_{\uparrow}$) in Wurzeln und Blättern (Hermans *et al.* 2010b) und ähnliche Veränderungen waren auch in den Ergebnissen der PiiMS *Ionomics* der drei *Knockout*-Mutanten zu erkennen, allerdings nur für Calcium statistisch signifikant (Abb. 2.6, Tab. 2.3).

Die Expression von einzelnen Mitglieder aus den Genfamilien der *CAX* (Ca^{2+}/H^+ exchanger), *ACA* (Ca^{2+} -ATPase) und *CPA/CHX* ($Cation/H^+$ exchanger) Membrantransporter ist bei Mg-Mangel nach sieben Tagen in *Arabidopsis* um das zweifache hochreguliert und könnte daher für $[Ca]$ -Zunahme verantwortlich sein (Hermans *et al.* 2010b). Die Expression von *CAX1* ist bei Mg-Überschuss im Vergleich zur Kontrolle schon nach 45 Minuten auf 67 % reduziert, bei *CAX3* ist nach 90 Minuten sogar nur noch 44 % der Transkriptmenge vorhanden (Visscher *et al.* 2010). Eine vergleichbare, transkriptionelle Regulation lässt sich für *CAX1* bei limitierter Ca-Verfügbarkeit nachweisen (Conn *et al.* 2011b). Möglicherweise sind zumindest einige dieser Gene auch in den *mrs2-1*, *mrs2-5* und *mrs2-10* Einzel- bzw. Doppel-*Knockout*-Linien

abweichend reguliert, selbst wenn keine veränderte Mg-Konzentration in den Ionenprofilen der Rosettenblätter erkennbar war.

In Pflanzen sind, neben zahlreichen Kaliumkanälen des *Shaker-like*, *TPK/KCO* (*Tandem pore K⁺ channel*) und *Kir-like* (*K⁺ inwardly rectifying channel*)-Typus, auch drei Familien von Kaliumtransportern, die *KT/HAK/KUP* (*K⁺ uptake permeases*), *Trk/HKT* (*K⁺/Na⁺ co-transporter*) und *CPA/CHX* (*Cation/H⁺ exchanger*), identifiziert und charakterisiert worden (Lebaudy *et al.* 2007; Gierth und Mäser 2007; Karley und White 2009). Die physiologische Konzentration von cytosolischem bzw. vakuolärem Mg²⁺ reduziert die Aktivität von *Fast Vacuolar* (FV) Ionenkanälen, was wiederum den Austritt von K⁺ aus der Vakuole bei niedrigen [Mg] bewirkt (Pei *et al.* 1999). Andererseits benötigt der für die K⁺-Aufnahme in Wurzeln verantwortliche Kanal AKT1 für seine Aktivierung Mg-ATP und Ca²⁺ (Li *et al.* 2006; Geiger *et al.* 2009). Darüber hinaus sind [Ca]_{vac} und [K]_{vac} Antagonisten bei der Regulation von osmotischem Potential und Ionen- bzw. Ladungsbalance (Conn *et al.* 2011a). Diese komplexen Wechselwirkungen bei der Ionenhomöostase sind unter Umständen für den verringerten Kaliumgehalt in MRS2-*Knockout*-Linien verantwortlich.

Ein Nachteil der durch das PiiMS gemessenen Ionenprofile ist, dass für die Bestimmungen immer nur ganze Rosettenblätter adulter, auf Erde kultivierter Pflanzen verwendet wurden. Es ist von Fall zu Fall aber sinnvoller, isolierte Blattgewebe in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu betrachten, da einzelne Ionentransporter sehr gewebespezifisch aktiv zu sein scheinen und sich einzelne Veränderungen in ihrer Gesamtheit ausgleichen könnten. Darüber hinaus ließen sich durch *Ionomics* von Pflanzen, die auf Medien mit ungewöhnlichen Nährstoffkonzentrationen kultiviert wurden, Veränderungen in der elementaren Zusammensetzung nachweisen, die unter Standardbedingungen vielleicht nicht messbar sind.

3.1.3. Einzel-, Doppel- oder Trippel-*Knockouts* von *mrs2-1*, *mrs2-5* und *mrs2-10* zeigen unterschiedliche Phänotypen

Wie schon zu Anfang des Kapitels erwähnt, können sich oftmals mehrere Mitglieder einer Familie untereinander partial oder sogar vollständig in ihrer Funktion ersetzen, ohne dass die betroffenen Pflanzen offensichtliche Defekte aufweisen (Bouché und Bouchez 2001; Briggs *et al.* 2006). So zeigen beispielsweise erst die *Quadrupel-Knockout*-Mutanten einer Familie von sechs Ammoniumtransportern (AMT) in *Arabidopsis* einen ausgeprägten, physiologischen Phänotyp (Yuan *et al.* 2007). Unter Standardbedingungen, oder bei geringer Magnesiumverfügbarkeit, konnte für keine der *mrs2-1*, *mrs2-5* oder *mrs2-10 Knockout*-Linien eine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Gebert 2006), ebenso verhielt es sich mit *mrs2-1 mrs2-5* und *mrs2-5 mrs2-10* Doppelmutanten (Kap. 2.1.4).

In einer anderen Untersuchung mit Pflanzen, die auf MgSO₄-behandelter Erde (0 - 100 mM) kultiviert wurden, zeigt die *mrs2-10* Mutante keine erhöhte Magnesium-Toleranz und ist in der Biomasse des Sprosses und im Chlorophyllgehalt der Blätter nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Visscher *et al.* 2010). Hingegen haben *mrs2-1* und *mrs2-5 Knockout*-Linien in Hydrokulturen mit niedrigem Ca:Mg-Verhältnis im Vergleich zu Wildtyp oder *mrs2-10* verringerte Sproßwachstumsraten und Chlorophyllkonzentrationen und bei hohen Mg-Konzentrationen

im Medium eine verringerte $[Mg]_{vac}$ in Mesophyllzellen (Conn *et al.* 2011b). Die Überexpression von *MRS2-10* in Tabak vermindert die Mg-Mangelsymptome auf Medium ohne Magnesium und erhöht die Ionenkonzentration von Mg, Mn und Fe in der gesamten Pflanze bei Anzucht auf normaler Erde, auch wenn die transgenen Pflanzen auffällige Verringerungen in Blattgröße und Länge der Internodien aufweisen (Deng *et al.* 2006).

Arabidopsis-Pflanzen, denen sowohl *MRS2-1* als auch *MRS2-10* fehlen, können offenbar nur bei zusätzlicher Versorgung mit Magnesium durch das Außenmedium überleben (Kap. 2.1.4). Um diese Annahme zu bestätigen, sind Genotyp-Analysen von Nachkommen einer homozygot/heterozygoten *mrs2-1* $-/-$ *mrs2-10* $+/-$ F_2 -Pflanze in hydroponischen Kulturen mit Magnesiumsupplementation denkbar. Dabei identifizierte, vollständig homozygote Pflanzen könnten darin ihren Lebenszyklus vollenden, um ausreichend Samen für weiterführende Studien zu produzieren. Unterstützt würde dies durch Nachkommen einer ebenso zu kultivierenden *mrs2-1 mrs2-5 mrs2-10* Tripelmutante, welche möglicherweise einen noch deutlicheren Phänotyp zeigen. Der *mrs2-1 mrs2-5* Doppel-Knockout offenbart vielleicht ein verändertes Wachstum auf Medien mit hohen Mg-Konzentrationen oder geringem Ca:Mg-Verhältniss, weil keines der beiden, wechselseitig regulierten *MRS2*-Gene mehr intakt vorhanden ist und welches eventuell bei den Einzel-Knockouts Teile der Funktion übernimmt.

Bei Komplementationsanalysen durch 35S-Überexpression dieser drei Gene in *mrs2-1* bzw. *mrs2-5* Mutanten ist es nur mit dem jeweils ausgeschalteten Gen möglich, dass wildtypische [Mg]-Niveau in den Mesophyllzellen von Blättern, die mit künstlichem, Mg-supplementiertem Pflanzensaft gefüttert wurden, zu erreichen. Dies deutet auf gewebespezifische Funktionalität und keine vollständige Redundanz der drei Gene hin, denn die Überexpression von *MRS2-5* bzw. *MRS2-10* in *mrs2-1* oder *MRS2-1* bzw. *MRS2-10* in *mrs2-5* Knockout-Linien zeigt in den Mesophyllzellen keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle mit einem leeren Expressionsvektor. Die ektopische Expression von *MRS2-1*, *MRS2-5* und *MRS2-10* sorgt aber für erhöhte Magnesiumkonzentrationen in den Epidermiszellen, jedoch fällt bei *MRS2-10* die Steigerung geringer aus (Conn *et al.* 2011b).

Möglicherweise ergänzen *MRS2-1* oder *MRS2-5* die Funktion des vakuolären Mg-Transportproteins *MHX1* (Mg^{2+}/H^+ exchanger) (Shaul *et al.* 1999; David-Assael *et al.* 2005; Elbaz *et al.* 2006; Berezin *et al.* 2008) oder des *SV/TPC1* (slow vacuolar/two pore Ca^{2+}) Kanals (Pottosin und Schönknecht 2007), welche im Tonoplasten für die generelle Magnesiumaufnahme bzw. -abgabe verantwortlich sind (Yeo und Flowers 2007). Zwischen Epidermis- und Mesophyllzellen besteht kein Unterschied in der Transkriptionsstärke von *MHX1* und eine leichte Induktion erfolgt nur auf Medium mit geringer Ca-Verfügbarkeit (Conn *et al.* 2011b). Nach 90 bzw. 180 Minuten Mg-Überschuss ist *MHX1* in Blättern um das 1,3-fache hochreguliert, wahrscheinlich um überschüssiges Mg^{2+} in der Vakuole zu sequestrieren (Visscher *et al.* 2010). Hierzu könnten *MRS2-1* und *MRS2-5* im Blattmesophyll von *Arabidopsis* unterstützend beitragen, da nur hohe Magnesiumkonzentrationen im Cytosol einen passiven Transport über *MRS2*-Proteine in die Vakuole erlauben würden. Ob eines oder beide Proteine unter Normalbedingungen den Austritt von Mg^{2+} aus der Vakuole in das Cytosol bewirken können ist bislang ungeklärt.

3.1.4. Die Herunterregulation von *MRS2* Genen in RNAi-Linien bewirkt keine offensichtlichen Defekte

Bisher gelang es, für vier der neun funktionellen *MRS2*-Gene (*MRS2-1*, *MRS2-5*, *MRS2-7*, *MRS2-10*) homozygote *Knockout*-Linien zu erhalten, während für die anderen nur heterozygote T-DNA-Insertionsmutanten erzeugt werden konnten (*MRS2-2*, *MRS2-3*, *MRS2-6*, *MRS2-11*) oder keine entsprechenden Linien in den verfügbaren Kollektionen vorhanden waren (*MRS2-4*). Dieses Ergebnis bestätigt sich durch den Gametenphänotyp von *MRS2-6* +/- und *MRS2-2* +/- Pflanzen, bei denen die Entwicklung der haploiden Pollen mit einer defekten Genkopie kurz vor der Reife abgebrochen wird (Li *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b). Der aberrante Pollenphänotyp tritt nur in T₁-Pflanzen von *MRS2-2* RNAi-Linien auf, die stark verminderte Transkriptmengen aufweisen, während Pflanzen mit normaler Expressionsstärke keine defekten Pollen produzieren (Chen *et al.* 2009b). Hierdurch lässt sich erklären, warum in den T₃-Pflanzen der RNAi-Linie *MRS2-2:GRI3* weder *Knockdown* noch Phänotyp nachweisbar waren (Abb. 2.8 c). Untersuchungen von Promotor-GUS-Aktivitäten und Transkriptomdaten belegen eine Expression von *MRS2-2* im Leitgewebe von Wurzeln und jungen Blättern sowie besonders ausgeprägt in den Antheren geöffneter Blüten (Meschenmoser 2008; Chen *et al.* 2009b; Winter *et al.* 2007). Ein *InDel*-Polymorphismus in der 3'-UTR von *MRS2-2* ist wahrscheinlich an der Adaption von bestimmten *Arabidopsis lyrata* Populationen an Böden mit hoher Schwermetallbelastung und niedrigem Ca:Mg-Verhältnis beteiligt (Turner *et al.* 2010). Bei Untersuchungen von *Quantitative trait loci* (QTL) verschiedener Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* ist *MRS2-2* als ein Kandidatengen für die Regulation des Mg-Gehalts im Samen entdeckt worden (Waters und Grusak 2008). Dies könnte bedeuten, dass die (post-)transkriptionelle Regulation von *MRS2-2* eine Rolle bei der Anpassung von *Arabidopsis* Arten oder Populationen an unterschiedliche Habitate spielt.

Trotz der auf 20% verringerten Menge an *MRS2-3* Transkripten wurde für die RNAi-Linie *MRS2-3:GRI5* kein Phänotyp bei Anzucht auf Erde oder in Flüssigmedium mit wenig Mg²⁺ gefunden (Abb. 2.8 c und d). Ebenso wie *MRS2-2* ist auch *MRS2-3* ein möglicher QTL für die Konzentration von Magnesium in Samen und Schote bei Kreuzungen zwischen den *Arabidopsis* Ökotypen Col und Ler (Waters und Grusak 2008). Es ist denkbar, dass sich trotz der phänotypischen Unauffälligkeit die Menge an Magnesium oder anderer Ionen in Samen oder Schoten der RNAi-Linie vom Wildtyp unterscheidet. Die Expression von *ProMRS2-3:GUS* bewirkt deutliche Färbungen im Bereich des Zentralzylinders der Wurzel und im Leitgewebe von Hypokotyl und Kotyledonen (Meschenmoser 2008) und hochauflösende *Microarray*-Analysen bestätigen eine überdurchschnittliche Transkriptmenge in Wurzelhaaren und Leitbündel der älteren Wurzel (Brady *et al.* 2007). Die Expression des zu *MRS2-3* orthologen Gens Os1g64890 aus Reis wird durch den Transkriptionsfaktor ART1 (*Al resistance transcription factor*) bei vier-tägiger Kultivierung auf 10 µM Aluminium induziert (Yamaji *et al.* 2009). Analog hierzu könnte *MRS2-3* in *Arabidopsis* an der Ionenaufnahme oder -homöostase unter Aluminiumstress beteiligt sein, was sich durch die Kultivierung in sauren Medien mit und ohne Zusatz von Aluminium in den bereits erwähnten Flüssigkulturen überprüfen ließe (Kap. 2.2.5).

Die Proteinsequenz von MRS2-4 besitzt ein Transitpeptid, dass laut der ARAMEMNON Datenbank von den meisten Algorithmen als mitochondrial vorhergesagt wird (Schwacke *et al.* 2003). Promotor-GUS-Experimente bewirken eine Expression des Reporters in allen photosynthetisch aktiven Geweben von *Arabidopsis* und in Querschnitten von adulten Blättern ist die $Pro_{MRS2-4}:GUS$ -Färbung, analog zu $Pro_{MRS2-11}:GUS$, exklusiv in den Chloroplasten des Mesophyll lokalisiert (Meschenmoser 2008). Es bleibt also nach wie vor offen, ob MRS2-4 ein Magnesiumtransporter in der inneren Membran von Chloroplasten oder von Mitochondrien ist. Transkriptomdaten und qRT-PCRs zeigen, dass *MRS2-4* - im Gegensatz zu *MRS2-11* - nicht in Abhängigkeit zur Photoperiode reguliert ist (Michael *et al.* 2008; Drummond *et al.* 2006). Außerdem wird die Expression von *MRS2-4* nicht wie bei vier anderen *MRS2*-Genen (Kap. 3.1.1) durch niedrige Ca:Mg-Verhältnisse induziert (Conn *et al.* 2011b). Die Abwesenheit von T-DNA-Insertionslinien für *MRS2-4* in den verfügbaren Samenkollektionen könnte bedeuten, dass dieses Gen essentiell ist und deshalb auch in den beiden RNAi-Linien die *MRS2-4* Expressionsstärke von 30 bzw. 50 % des Wildtypniveaus nicht unterschritten werden kann (Abb. 2.8 c). Eventuell sind trotz phänotypischer Unauffälligkeit bei Anzucht auf Erde Defekte beim Spleißen von Gruppe-I bzw. Gruppe-II-Introns aus mitochondrialen oder chloroplastidären Transkripten von *Arabidopsis* in den Linien *MRS2-4:GRI19* und *MRS2-4:GRI27* sichtbar.

3.1.5. MRS2 Proteine sind in den Kompartimenten des Endomembransystems oder in endosymbiontischen Organellen lokalisiert

Damit Proteine an ihren korrekten Einsatzort gelangen, sind sie nach der Synthese durch die Ribosomen im Cytosol einem intrinsischen Sortierungsmechanismus unterworfen. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind der co-translationelle Transport von Proteinen mit einem Signalpeptid über den Translokationsapparat in das ER-Lumen und der Proteinimport in Mitochondrien oder Chloroplasten über die TOM/TIM bzw. TOC/TIC Komplexe unter Verwendung von Transitpeptiden. Für diese Entdeckung wurde dem Biochemiker Günter Blobel 1999 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Einige Proteine haben streng definierte Zielorte, während andere weniger spezifisch vorherbestimmte Lokalisationen aber komplexe Akkumulationsmuster zeigen (Millar *et al.* 2009). Inzwischen existieren zahlreiche Möglichkeiten, mit jeweils unterschiedlichen Stärken und Schwächen, um die subzelluläre Lokalisation eines (Membran-)Proteins zu ermitteln. Gesammelte Lokalisationsdaten aus verschiedenen Studien, wie z.B. die *Arabidopsis Subcellular Database* (SUBA), zeigen Übereinstimmungen und Konflikte zwischen den einzelnen Methoden (Heazlewood *et al.* 2007).

Vorhersage von MRS2 Lokalisationen über Computeralgorithmen

Wertvolle Erkenntnisse zur Lokalisation eines Proteins lassen sich schon durch computergestützte Vorhersagemodelle auf Grundlage neuronaler Netze oder stochastischer Algorithmen gewinnen, welche z.B. in den Programmen MITOPROT, ChloroP, SignalP und TargetP zum Einsatz kommen (Claros und Vincens 1996; Emanuelsson *et al.* 1999; Emanuelsson *et al.* 2007). Sie geben erste Anhaltspunkte, in welchem zellulären Kompartiment bzw. Organell ein Protein

zu finden sein könnte und erlauben die schnelle Verarbeitung großer Datensätze. Allerdings sind die Resultate nicht immer in Übereinstimmung zueinander, so dass je nach Programm die Länge der Signal- oder Transitpeptide und deren Lokalisationen unterschiedlich vorhergesagt werden.

Die Zusammenfassung der Vorhersagen von bis zu 17 verschiedenen Programmen bezüglich der Lokalisation von *Arabidopsis* MRS2 Proteinen über einen Bayes-Klassifikator (Schwacke *et al.* 2007) ergibt bei MRS2-4 und MRS2-6 eine hohe Wahrscheinlichkeit für mitochondrialen Import und als Zielort für MRS2-11 den Chloroplasten. MRS2-4 wird von einzelnen Programmen wie z.B. PredSL und TargetP mit einer geringen Wahrscheinlichkeit als chloroplastidär vorhergesagt. Diese Vorhersagen zeigen, dass drei der neun funktionalen MRS2 Proteine in den endosymbiontischen Organellen lokalisiert sein können, benötigen jedoch die Verifizierung durch experimentelle Daten.

Identifizierung von MRS2 Proteinen in Proteomanalysen

Die Untersuchung des Proteinprofils (Proteom) verschiedener Membrankompartimente durch Fraktionierung und Massenspektrometrie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Methode ist im Nachweis sehr sensitiv, aber durch die notwendigen Schritte der Aufreinigung bzw. Anreicherung von Organellen oder Membrantypen anfällig für Kontaminationen. Endomembranorganellen lassen sich beispielsweise aufgrund ähnlicher Dichte nicht gut voneinander trennen, was eine mögliche Ursache für falsch positive Ergebnisse darstellt. Andererseits können schwach exprimierte, kleine oder hydrophobe Proteine in den erzeugten Fraktionen unterrepräsentiert oder sogar nicht nachweisbar sein, was wiederum zu falsch negativen Ergebnissen führt (Lilley und Dupree 2007; Millar *et al.* 2009). So wurde beispielsweise der MHX1 Transporter von *Arabidopsis* in bisher keinem veröffentlichten Proteom identifiziert, allerdings durch Antikörper eindeutig in der Fraktion des Tonoplasten detektiert (Shaul *et al.* 1999). In manchen Studien erlaubt die Methode darüber hinaus die Bestimmung von post-translationalen Modifikationen (PTM) an den identifizierten Proteinen, wie z.B. Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen und Acetylierungen (Nühse *et al.* 2004; Kwon *et al.* 2006).

Einige der aktuellen Proteomanalysen verschiedener subzellulärer Kompartimente von Pflanzen zeigen, dass MRS2-1 im Tonoplasten von *Arabidopsis* lokalisiert (Carter *et al.* 2004) und an zwei Serinresten (SAPVS*PVS*) phosphoryliert ist (Chen *et al.* 2010). Ebenso kann ein zu MRS2-1/MRS2-10 homologes Protein der Gerste in der Fraktion des Tonoplasten detektiert werden (Endler *et al.* 2006). Das nahverwandte MRS2-5 ist hingegen im Proteom der Plasmamembran (PM) von *Arabidopsis* nachweisbar (Alexandersson *et al.* 2004) aber an zwei vergleichbaren Positionen (S*APVS*PVG) phosphoryliert (Whiteman *et al.* 2008).

Eine Vielzahl von Proteomanalysen finden MRS2-11 in der inneren Membran des *Arabidopsis* Chloroplasten (Froehlich *et al.* 2003; Zybailov *et al.* 2008; Ferro *et al.* 2010) sowie in Proplastiden- oder Chloroplastenhüllen von Erbse bzw. Blumenkohl (Bräutigam *et al.* 2008; Bräutigam und Weber 2009). In einer weiteren Studie ist MRS2-11 aber auch in PM-Fractionen detektiert worden (Mitra *et al.* 2009), allerdings sind 24 % der hier identifizierten Proteine mit dem WoLF PSORT Programm (Horton *et al.* 2007) als plastidär vorhergesagt.

Die Proteine MRS2-3 und MRS2-4 wurden ebenfalls in der Plasmamembran von *Arabidopsis* nachgewiesen (Benschop *et al.* 2007), diese Studie umfasste aber keine Untersuchung der Membranfraktion auf Markerproteine des Chloroplasten und das endoplasmatische Protein ACA-2p (*Arabidopsis Ca²⁺-ATPase, isoform 2 protein*) war als Kontamination in der PM-Fraktion vorhanden. Dies verdeutlicht, warum die Lokalisationen eines Proteins mit Hilfe von Proteomdaten problematisch sein kann und wie wichtig die Kontrolle der Aufreinigung bzw. Abreicherung zellulärer Membrankompartimente über *Western Blot*-Analysen mit Antikörpern gegen organellspezifische Markerproteinen ist.

In vivo Lokalisierung von MRS2 Proteinen durch fluoreszierende Reporter

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Fusion eines gewünschten Proteins mit einem der zahlreichen fluoreszierenden Proteine, welche in den letzten Jahren entdeckt und weiterentwickelt wurden (z.B. GFP und DsRED), in einen bestimmten Organismus zu transformieren und dort zu exprimieren. Neben der biolistischen oder PEG-vermittelten Transformation von Protoplasten oder Zellkulturen ist vor allem in dikotylen Pflanzen die Einbringung fremder DNA über das *Agrobacterium tumefaciens* üblich. Ein Vorteil der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von intakten Zellgeweben ist gegenüber der Verwendung von Protoplasten oder Zellkulturen, dass sowohl die zelluläre Identität und Integrität als auch die Gewebeorganisation erhalten bleiben (Marion *et al.* 2008).

Tabak eignet sich aufgrund seiner großen Blattfläche und der einfachen Kultivierung hervorragend für die stressreduzierte Infiltration von *Agrobacterium*, jedoch stellt er gleichzeitig ein heterologes System für die Expression von *Arabidopsis*-Proteinen dar. Die gleichzeitige Transformation des p19 Proteins, einem viralen Unterdrücker von PTGS, kann zusätzlich die transiente Expression des verwendeten Transgens verbessern (Voinnet *et al.* 2003). In den transformierten Zellen der Blattepidermis lässt sich anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie sehr gut die Dynamik des Endomembransystems, vor allem von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum beobachten.

Bei allen in dieser Studie durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen von Tabakepidermiszellen wurden die Fluoreszenzsignale von GFP-Fusionsproteinen mit MRS2-1, MRS2-2, MRS2-3, MRS2-4 und MRS2-5 abhängig vom Auflösungsvermögen des verwendeten Mikroskops im Bereich des Cytosols oder in Teilen des Endomembransystems detektiert (Abb. 2.16 a - e, Abb. 2.18 a - e). Die möglichen Funktionen von MRS2 Proteinen in diesen Kompartimenten und eventuelle Artefakte werden zusammen mit der Lokalisation von MRS2-7 durch GFP-Fusionen in einem späteren Abschnitt getrennt behandelt (Kap. 3.2.2).

Eine kürzlich publizierte Lokalisierung von MRS2-1 und MRS2-5 bei c-terminaler Fusion an das gelb fluoreszierende Protein (YFP) zeigt im Widerspruch zu den obigen Beobachtungen deren Anwesenheit im *Arabidopsis* Tonoplasten (Conn *et al.* 2011b). Jedoch wurde in beiden Fällen die Plasmamembran der transformierten Protoplasten osmolytisch entfernt, so dass nicht erkennbar ist ob sie zusätzlich auch in Kompartimenten des Cytosols oder in der Plasmamembran lokalisiert sind. Aus dieser und einer zweiten unabhängigen Untersuchung geht hervor, dass MRS2-10 nur in der Plasmamembran von *Arabidopsis* lokalisiert ist (Li *et al.* 2001; Conn

et al. 2011b). Bei n-terminaler Fusion sind alle drei Proteine im Cytoplasma lokalisiert, da möglicherweise durch die Abspaltung eines vorhergesagten Signalpeptides ein lösliches YFP entsteht (Conn et al. 2011b).

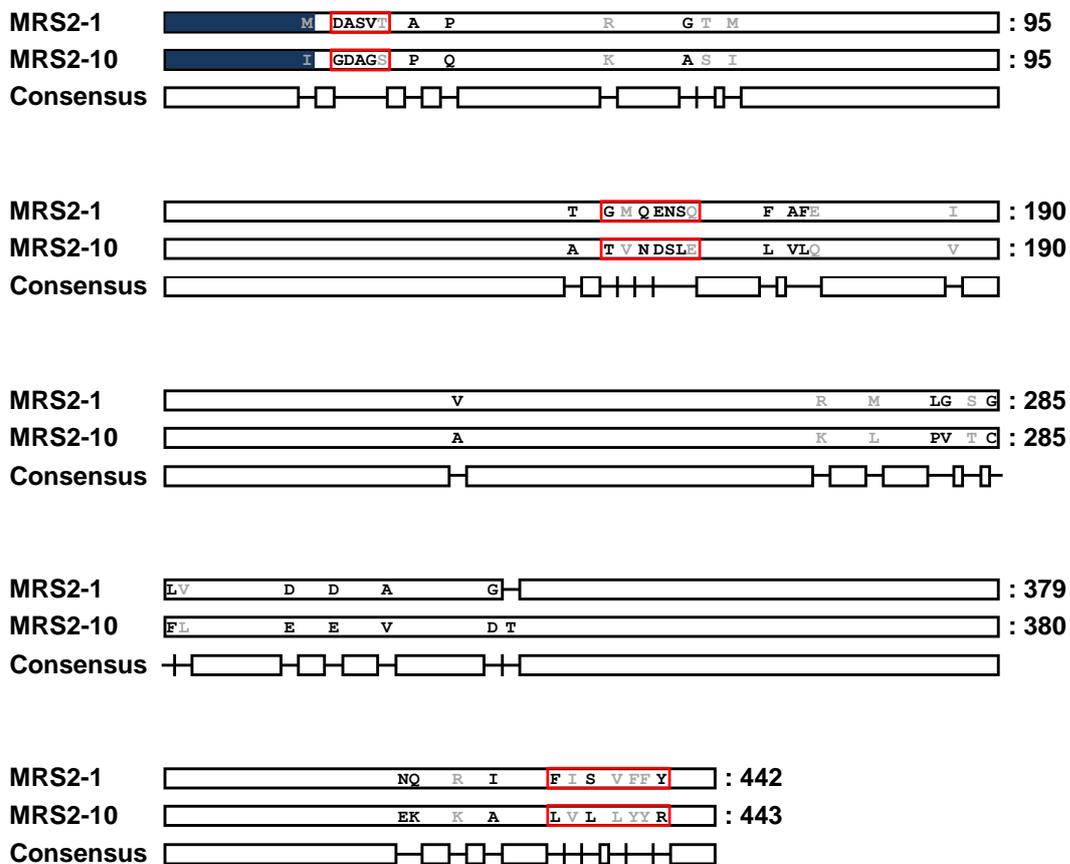


Abbildung 3.3. Vergleichende Gegenüberstellung der Proteinsequenzen von *MRS2-1* und *MRS2-10* aus *Arabidopsis thaliana*.

Dargestellt sind konservierte und variable Proteinabschnitte von *MRS2-1* und *MRS2-10* mit konservativen (grau) und nichtkonservativen (schwarz) Aminosäureaustauschen und deren Consensussequenz (weiße Boxen) sowie das durch SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004) vorhergesagte Signalpeptid (blaue Boxen). Besonders diverse Bereiche zwischen beiden *MRS2* Proteinen sind rot hervorgehoben. Die Berechnung des Alignments erfolgte durch MUSCLE unter Verwendung der Standardeinstellungen (Edgar 2004).

Offen bleibt, warum trotz der sehr hohen Ähnlichkeit zwischen *MRS2-1* und *MRS2-10* ersteres in den Tonoplasten und das zweite in die Plasmamembran transportiert wird, denn beide haben laut Vorhersage durch SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004) ein 17 AS langes nahezu identisches Signalpeptid (Abb. 3.3). Möglicherweise sind *MRS2-1* und *MRS2-10* auch in beiden Membranen vorhanden, aber in unterschiedlicher Stöchiometrie oder abhängig von physiologischen Bedingungen. Eine andere Erklärung wäre, dass sie beim Transport über den Golgi-Apparat durch sequenzspezifische Erkennung mit Hilfe von SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) oder anderen Cofaktoren voneinander unterschieden werden können (Bassham und Blatt 2008). Die Blockierung einzelner SNAREs kann die Anwesenheit des KAT1 K⁺-Kanals, jedoch nicht die der PMA2 H⁺-ATPase

in der Plasmamembran spezifisch beeinflussen (Sutter *et al.* 2006; Tyrrell *et al.* 2007). In Interaktionsstudien (<http://www.associomics.org/>) mit Hilfe des *mating based split ubiquitin system* (mbSUS) bildet MRS2-1 Proteinkomplexe mit putativen Vesikeltransport-SNAREs (Lalonde *et al.* 2010). Die hierfür benötigten Bindungstellen könnten in den diversen Regionen nahe des N- bzw. C-Terminus oder innerhalb des Proteins zwischen den Aminosäurepositionen 146 bis 155 liegen (Abb. 3.3). Ein Austausch dieser Regionen zwischen MRS2-1 und MRS2-10 könnte zeigen, welche Domäne für die unterschiedliche Membranzuordnung verantwortlich ist.

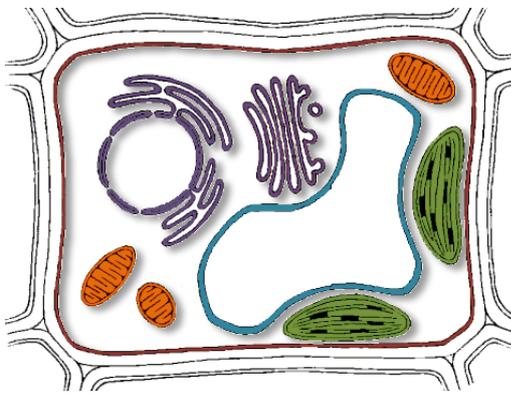
Wie bereits erwähnt sind für einige der MRS2 Proteine die semiautonen Organellen als Zielort innerhalb der Pflanzenzelle vorhergesagt. In Übereinstimmung hierzu zeigt die Untersuchung von Drummond *et al.* (2006), dass MRS2-11 bei c-terminaler GFP-Fusion in der Hüllmembran des *Arabidopsis*-Chloroplasten lokalisiert ist und sich spezifisch über Antikörper in der Chloroplastenfraktion detektieren lässt. Die Arbeit von Li *et al.* (2008) bestätigt über Co-Lokalisation mit dem Farbstoff MitoTracker[®], dass MRS2-6 in das Membransystem des Mitochondriums importiert wird. Im Gegensatz hierzu ließ sich MRS2-4 trotz positiver Hinweise durch GUS-Färbung von Chloroplasten aus Mesophyllzellen (Meschenmoser 2008) in diesem Organell nicht über GFP-Fusion nachweisen (Abb. 2.16 d).

Generell kann die Platzierung von fluoreszierenden Reportern an den C- oder N-Terminus eines zu untersuchenden Proteins dessen intrinsische Sortierungssignale maskieren oder verändern. Außerdem spielt das für die Fusion verwendete Genmodell eine wichtige Rolle, da unter Umständen durch alternative oder falsch vorhergesagte Startcodons unterschiedliche Transitpeptide für duale oder artifizielle Lokalisierungen verantwortlich sind (Marion *et al.* 2008; Millar *et al.* 2009; Carrie *et al.* 2009). Durch die 35S-Überexpression des Fusionsproteins sind Artefakte wie z.B. Proteinaggregation, sterische Behinderung bei der Sortierung bzw. Komplexbildung des Proteins oder die Absättigung der normalen zellulären Transportwege möglich (Fricker *et al.* 2006). Möglicherweise sind auch Unterschiede in der Länge des Abstandhalters zwischen Protein und fluoreszierendem Reporter für Widersprüche bei den hier verglichenen GFP/YFP-Lokalisationen verantwortlich. In allen bisherigen Untersuchungen konnte nicht gezeigt werden, dass die Fusionen mit YFP/GFP keinen Einfluss auf die Funktionalität des verwendeten MRS2 Proteins hatte. In Hefe sind MRS2-1, MRS2-10 und MRS2-11 nach c-terminaler Fusion mit GFP nicht mehr in der Lage die *alr1Δ alr2Δ* Mutante zu komplementieren (Drummond *et al.* 2006) und auch das endogene MRS2p zeigt nach GFP-Fusion eher eine Lokalisation im Golgi-Apparat als in den Mitochondrien (Huh *et al.* 2003). Dies verdeutlicht, dass die Lokalisation eines Proteins über dessen Fusion mit einem fluoreszierenden Reporter grundsätzlich kritisch zu betrachten und die Verifizierung über mindestens einen alternativen Ansatz unerlässlich ist (Millar *et al.* 2009; Moore und Murphy 2009).

Zusammenfassung der Untersuchungen zur Lokalisation von MRS2 Proteinen

Alle bisher publizierten Studien zeigen, dass die verschiedenen MRS2 Proteine unterschiedlichen Membrankompartimenten zugeordnet werden können und die Lokalisierung bestimmter Proteine abhängig von der Nachweismethode ist (Abb. 3.4). Als gesichert können die Lokalisationen von MRS2-1, MRS2-6 und MRS2-11 angenommen werden, da sie durch mindestens

zwei unabhängige Untersuchungen mit verschiedenen Methoden übereinstimmend festgestellt worden sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind im Vergleich hierzu abweichend, da die Fluoreszenzsignale aller sechs Fusionskonstrukte im Endomembransystem beobachtet wurden, welches aufgrund seiner Funktion als Sortiermaschine und Qualitätskontrolle besonders anfällig für artifizielle Lokalisationen ist (Kap. 3.2.2).



Protein	AraM	MS/MS	GFP	v. D.
MRS2-1	-	■	■	■
MRS2-2	-	-	-	■
MRS2-3	-	■	-	■
MRS2-4	■	■	-	■
MRS2-5	-	■	■	■
MRS2-6	■	-	■	-
MRS2-7	-	-	-	■
MRS2-10	-	-	■	-
MRS2-11	■	■	■	-

Abbildung 3.4. Zusammenfassung der subzellulären Lokalisation von *Arabidopsis* MRS2 Proteinen durch unterschiedliche Methoden.

Quelle der Lokalisationsdaten sind Consensusvorhersagen der ARAMEMNON Datenbank (AraM), Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) von Membranproteomen, bereits publizierte Fusionen mit fluoreszierenden Reporterproteinen (GFP) oder die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation (v.D.). Die verschiedenen Organellen und die ihnen zugeordneten MRS2 Proteine sind farblich hervorgehoben: Plasmamembran (dunkelrot), ER und Golgi-Netzwerk (violett), Tonoplast (blau), Chloroplast (grün) und Mitochondrium (orange). Abbildung verändert nach Winter *et al.* (2007).

3.1.6. Die Evolution der MRS2-Genfamilie verrät etwas über mögliche funktionelle Redundanz und spezifische Anpassungen

Derzeit liegen für die sechs Angiospermen *Arabidopsis thaliana* (At), *Vitis vinifera* (Vv), *Populus trichocarpa* (Pt), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm) und *Brachypodium distachyon* (Bd) vollständige Genomsequenzen mit annotierten Genmodellen vor. Eine Rekonstruktion des Stammbaums der CorA-ähnlichen Proteine aus diesen Genomen, welche die Domäne Pfam_01544 (*CorA like Mg²⁺ transport protein*) enthalten, zeigt deren grundsätzliche Aufteilung in sechs Kladen mit einem GMN und eine Klade mit einem GIN Motiv (Abb. 3.5). Die MRS2-ähnlichen Proteine mit GMN, RDLR und EMLLE Motiven sind in die fünf Kladen A - E unterteilt. Zu jeder dieser Kladen ist mindestens ein homologes Protein in den basalen Landpflanzen *Physcomitrella patens* und *Selaginella moellendorfi* vorhanden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die strukturell sehr ähnlichen bakteriellen CorA Proteine die endosymbiontischen Vorläufer der mitochondrialen bzw. plastidären MRS2 Proteine, aus denen sich später die in anderen Membranen lokalisierten MRS2 Proteine - eventuell durch Verlust (von Teilen) des Transitpeptides - entwickelt haben.

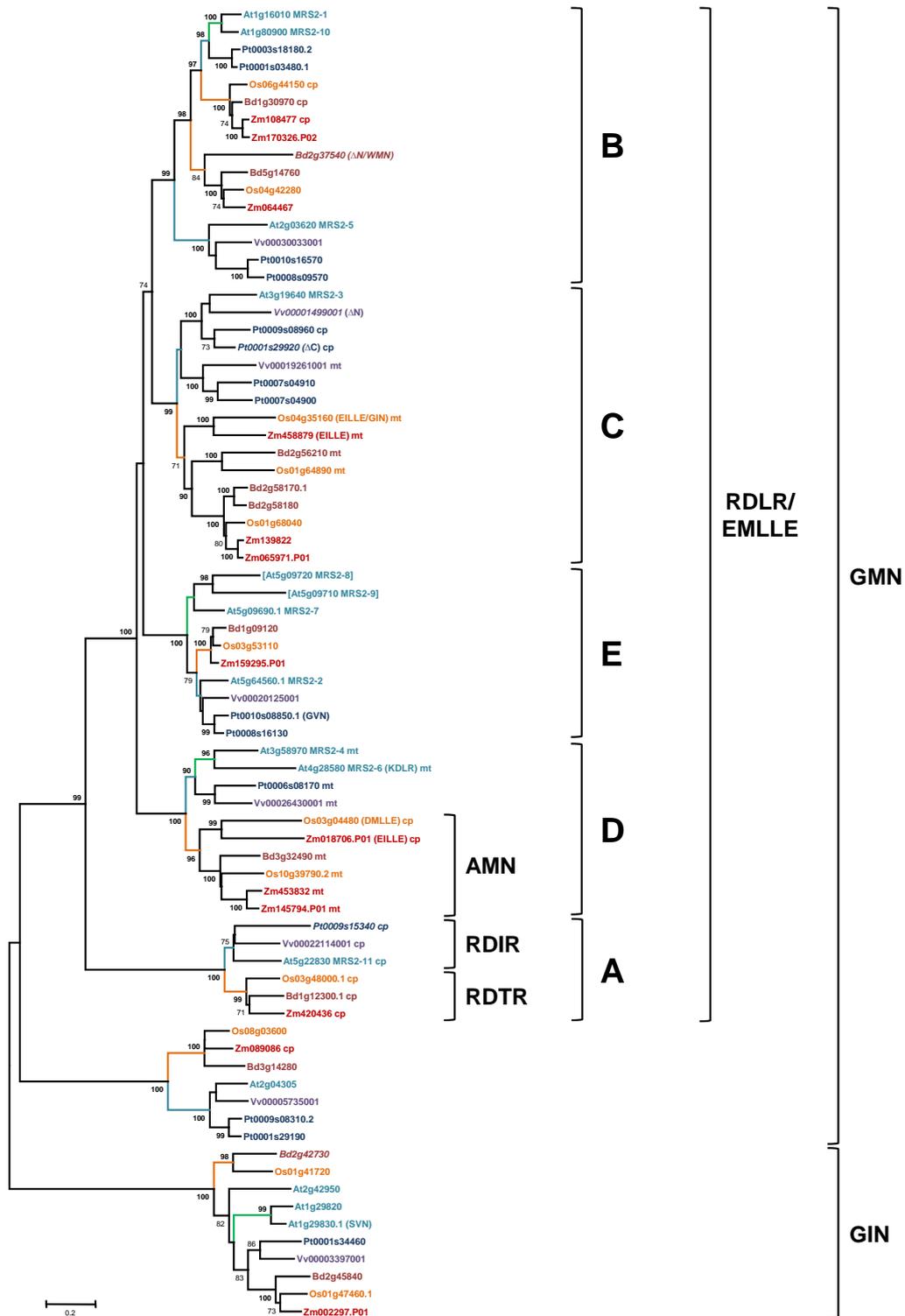


Abbildung 3.5. Rekonstruierter Stammbaum CorA-ähnlicher Proteine aus den sequenzierten Genomen von sechs Angiospermen nach dem *Neighbor-Joining*-Verfahren.

Die statistische Unterstützung von Knoten durch *Bootstrap*-Werte ist ab 70 % angegeben. Alle Namen von Dikotylen sind in blau angegeben und die der Monokotyledonen in rot bzw. orange. [] = Pseudogen in *Arabidopsis* Col-0, () = Abweichungen zu konservierten Motiven, *Datenbankeintrag* = Annotation enthält Unstimmigkeiten, ΔN/C = Protein N- oder C-terminal unvollständig.

CorA-ähnliche Proteine: GMN versus GIN Motiv

Das GMN Motiv ist das einzige universell konservierte und essentielle Aminosäuremotiv innerhalb der CorA Familie, denn alle bisher gefundenen Magnesiumtransporter dieses Typs besitzen ein solches (Knoop *et al.* 2005). Mutationen dieses Aminosäuremotivs in CorA oder Alr1p führen selbst bei konservativen Substitutionen zu einem vollständigen Verlust des Magnesiumtransportes in *Salmonella typhimurium* (Szegedy und Maguire 1999) bzw. *Saccharomyces cerevisiae* (Lee und Gardner 2006). Im Gegensatz hierzu hat der ZntB Zink-Transporter in Prokaryonten ein GVN Motiv (Caldwell und Smith 2003; Tan *et al.* 2009), so dass die CorA-ähnlichen Proteine mit einem GIN Motiv möglicherweise keine Transporter für Magnesium sondern für andere Substrate sind. In der pflanzlichen MRS2 Proteinfamilie gibt es einzelne Abweichungen vom GMN Motiv in Atg509710/MRS2-9 (STN, aber in Ökotyp Col-0 durch Leserasterverschiebung defekt), Bd2g37540 (WMN), Os04g35160 (GIN), Pt0010s08850.1 (GVN) und besonders auffällig in allen Monokotyledonen der Klade D (AMN). Den einzigen Unterschied zum GIN Motiv innerhalb der Klade mit diesem Tripeptid weist At1g29830.1 (SVN) auf. Dies könnte bedeuten, dass die hiervon betroffenen Proteine entweder nicht mehr funktionieren oder für den spezifischen Transport anderer Ionen zuständig sind. In allen Fällen außer bei den Monokotyledonen der Klade D ist immer ein paraloges Protein mit intaktem GMN bzw. GIN Motiv im Genom vorhanden. In den verfügbaren Protistengenomen von *Naegleria gruberi*, *Dictyostelium discoideum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* und *Plasmodium falciparum* konnten bisher nur Proteine mit GMN Motiv gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Die MRS2 spezifischen RDLR und EMLLE Motive

Alle MRS2-ähnlichen Proteine haben das RDLR bzw. EMLLE Motiv konserviert vorliegen und Austausch innerhalb des RDLR Motivs finden sich nur in At4g28580/MRS2-6 (KDLR) und bei allen Proteinen der Dikotylen (RDIR) bzw. Monokotyledonen (RDTR) in Klade A. Abweichungen zum EMLLE Motiv liegen in Os04g35160 (EILLE), Zm458879 (EILLE), Os03g04480 (DMLLE) und Zm018706.P01 (EILLE) vor. Hierbei fällt auf, dass alle Substitutionen Proteine betreffen, deren Lokalisation für den Chloroplasten oder das Mitochondrium vorhergesagt ist. Die Entstehung des MRS2 Typus geschah wahrscheinlich zeitnah mit dem Auftreten der ersten Eukaryonten, da in Protisten wie z.B. *Naegleria*, *Dictyostelium* und *Plasmodium* mindestens ein homologes Protein mit diesen Motiven vorliegt. Aus den Sequenzdaten aller eukaryontischen MRS2-ähnlichen Proteine lassen sich die Consensusmotive rDxR (x = I/L/M/T) und exILE (x = I/L/M) ableiten, die variable Aminosäure ist also in fast allen Fällen unpolare/hydrophob. Die zwei anderen CorA-ähnlichen Kladen besitzen diese Motive nicht, ebenso wie deren homologe Proteine in den Protisten.

Klade A: Eine Gruppe strikt chloroplastidärer MRS2 Proteine

Der Vorhersage nach sind alle Mitglieder der Klade A so wie MRS2-11 in den Chloroplasten lokalisiert (Drummond *et al.* 2006). Diese Klade bildet die Schwestergruppe zu allen anderen MRS2-ähnlichen Magnesiumtransportern. Es gibt eine klare Abgrenzung zwischen den

MRS2-11 ähnlichen Proteine der Monokotyledonen und Dikotylen und es treten keine Genduplikationen innerhalb der Klade auf. Wahrscheinlich sind alle Mitglieder dieser Klade essentiell, da in den bisherigen Bemühungen keine *Knockout*-Mutanten durch *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien erhalten werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Klade B: MRS2 Proteine mit möglicher partieller Redundanz in Angiospermen

Die bisher veröffentlichten Genomdaten von höheren Pflanzen zeigen, dass die paraloge Proteine MRS2-1 und MRS2-10 vermutlich in dem Vorläufer der Pflanzenfamilie *Brassicaceae* im Zuge einer Polyploidisierung durch die Duplikation von Bereichen auf Chromosom 1 entstanden sind (Abb. 3.1). Eine hiervon unabhängige Genduplikation gab es auch im Genom der Pappel, allerdings ist bisher kein MRS2-1/MRS2-10 Ortholog beim Wein gefunden worden. Alle MRS2-1/MRS2-10 ähnlichen Proteine in Monokotyledonen und Dikotylen haben einen gemeinsamen Vorfahren, von dem sich die MRS2-5 Schwestergruppe der dikotylen Pflanzen abgetrennt hat. Zusätzlich hat in den Monokotyledonen eine weitere Genduplikation des *MRS2-1/MRS2-10* ähnlichen Vorläufers stattgefunden. Der Stammbaum zeigt den gemeinsamen Ursprung der MRS2-1, MRS2-5 und MRS2-10 Proteine, deren Diversifizierung möglicherweise eine Anpassung an besondere physiologische Bedingungen oder unterschiedliche subzelluläre Membransysteme darstellt. In *Arabidopsis* sind diese drei Gene bei Kultivierung unter normalen Laborbedingungen nicht essentiell und einzelne *Knockout*-Mutanten von MRS2-1, MRS2-5 und MRS2-10 unterscheiden sich nicht vom Wildtyp (Gebert 2006). Physiologische Untersuchungen in Flüssigmedien mit niedriger Calciumverfügbarkeit oder hohen Magnesiumkonzentrationen zeigen jedoch, dass MRS2-1 und MRS2-5 an der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase in Mesophyllzellen durch die Vakuole beteiligt sind (Conn *et al.* 2011b).

Klade C: Diversifizierung durch zahlreiche unabhängige MRS2 Genduplikationen

In *Arabidopsis* ist nur MRS2-3 als einziger Vertreter der Klade C vorhanden, während in allen anderen Spezies mehrere Kopien - in Monokotyledonen drei, bei anderen Dikotylen bis zu vier - durch Genduplikationen entstanden sind. Es ist wiederum eine klare Aufspaltung zwischen den Proteinen der Monokotyledonen und Dikotylen erkennbar mit zum Teil zwei paraloge MRS2-3-ähnlichen Vertretern innerhalb einzelner Arten. Die Subklade der Monokotyledonen enthält einzelne mitochondrial vorhergesagte Proteine, die Schwestergruppe der Dikotylen umfasst bei der Pappel zwei MRS2-3-ähnliche Proteine mit chloroplastidärer und beim Wein ein Protein mit mitochondrialer Vorhersage. Die Annotationen der Proteine Vv00001499001 und Pt0001s29920 sind wahrscheinlich unvollständig, da z.B. wichtige strukturelle Bereiche wie die Transmembrandomänen fehlen. Möglicherweise hat besonders in dieser Klade eine adaptive Radiation zur Anpassung der einzelnen Arten auf individuelle Umweltbedingungen oder morphologische Diversifizierung stattgefunden. MRS2-3 ist aufgrund des Fehlens von paraloge Proteinen in *Arabidopsis* vermutlich essentiell wodurch erklärbar wird, warum keine homozygote *Knockout*-Linie durch T-DNA-Insertion erzeugt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Klade D: Die Vertreter der MRS2 Proteine in den semiautonomen Organellen

Die Klade der MRS2-4/MRS2-6 ähnlichen Proteine besteht ausschließlich aus Vertretern, deren Lokalisation in den endosymbiontischen Kompartimenten - und hier hauptsächlich im Mitochondrium - vorhergesagt wird. Wie schon für andere Kladen beschrieben stehen die MRS2 Proteine der Monokotyledonen und Dikotylen in einem Schwestergruppenverhältnis zueinander. In *Arabidopsis* kam es vermutlich zur Genduplikation mit einer anschließenden Spezialisierung des mitochondrialen MRS2-6 Proteins, welches exklusiv in Pollenkörnern exprimiert wird und für deren Reifung essentiell ist (Li *et al.* 2008). In den bislang verfügbaren *Arabidopsis* T-DNA Kollektionen ist keine Insertionslinie für MRS2-4 vorhanden, so dass dieses Protein einen unentbehrlichen mitochondrialen Mg-Transporter für die übrigen Pflanzengewebe darstellen könnte. Weitere Genduplikationen fanden auch in den Süßgräsern statt, möglicherweise mit einer Änderung des mitochondrialen Transitpeptides in ein chloroplastidäres bei Reis und Mais. In den Vorhersagen ist durch den verwendeten *The winner takes all*-Algorithmus die Möglichkeit einer dualen Lokalisierung nicht berücksichtigt, so dass zumindest einige Proteine dieser Klade auch in beiden Organelltypen vorhanden sein könnten.

Klade E: Rezente Evolution und Entstehung von Pseudogenen in Ökotypen

In dieser Klade sind bei den Monokotyledonen und Dikotylen nur zu MRS2-2 orthologe Proteine in vorhanden, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um den ancestralen Vertreter handelt. Im gemeinsamen Vorläufer der Gattung *Arabidopsis* kam es durch die Duplikation einer etwa 0,5 Mbp großen Region auf Chromosom 5 zur Entstehung des Gens für MRS2-7, welches sowohl in *Arabidopsis thaliana* als auch *Arabidopsis lyrata* vorliegt. In *Arabidopsis thaliana* entstanden durch sukzessive Genduplikationen *MRS2-8* und *MRS2-9*, die je nach Ökotyp zu einem Pseudogen mutiert sein können (Abb. 3.6). So sind beide Proteine in Col-0 durch verfrühten Abbruch der Translation in Folge einer Leserasterverschiebung unvollständig aber im Ökotypen Landsberg *erecta* (Ler) intakt, wobei MRS2-9 dort ein STN statt dem hochkonservierten GMN Motiv besitzt. Das MRS2-2 Protein ist in *Arabidopsis thaliana* für die Pollenreifung zwingend notwendig (Chen *et al.* 2009b), so dass eine funktionelle Redundanz zu MRS2-7 ausgeschlossen werden kann. Die bisherigen Studien mit *Knockout*-Mutanten zeigen, dass MRS2-7 nur bei limitierter Magnesiumverfügbarkeit eine wichtige Funktion besitzt (Gebert 2006) und die Analyse von Sequenzpolymorphismen legt nahe, dass MRS2-8 und MRS2-9 - zumindest für den Ökotypen Col-0 - vollständig verzichtbar sind.

3.1.7. Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zur Funktion der Proteine MRS2-1, MRS2-5 und MRS2-10

Die einzelnen Daten zur Expression, Lokalisation und Entstehung der MRS2 Proteine zeichnen inzwischen ein komplexes, aber immer noch unvollständiges Bild ihrer physiologischen Bedeutung in Pflanzen. Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse über einzelne Mitglieder der MRS2 Proteinfamilie publiziert wurden fehlt für andere jede Art von Hinweis auf ihre Funktion. In vorangegangenen Untersuchungen von MRS2 Proteinen wurde festgestellt,

dass unter den dort getesteten Bedingungen der Verlust von MRS2-1, MRS2-5 oder MRS2-10 keinen offensichtlichen Phänotyp hervorruft (Gebert 2006). Dieses Ergebnis wurde durch eine aktuelle Veröffentlichung erweitert und die Beteiligung von MRS2-1 und MRS2-5 an der Ionenhomöostase bei außergewöhnlichen Umweltbedingungen festgestellt (Conn *et al.* 2011b).

Veränderungen im Ionenprofil von *Arabidopsis* und *Lotus japonicus* nach zufälliger Mutagenisierung zeigen, dass die Konzentrationen von bestimmten Elementen in genetischer Wechselwirkung stehen, d.h. die Veränderung eines Gens für ein spezifisches Ionentransportsystem also auch Auswirkungen auf das Vorhandensein anderer Elemente haben kann (Lahner *et al.* 2003; Chen *et al.* 2008). So wurden in Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit gemessenen elementaren Profilen von *mrs2-1*, *mrs2-5* und *mrs2-10* Einzel- bzw. Doppelmutanten Wechselwirkungen in der Konzentration zwischen Magnesium, Calcium und Kalium aber auch Bor, Cobalt, Nickel, Zink, Selen und Molybdän festgestellt. Außerdem zeigt neben den bereits erwähnten die Publikationen eine Untersuchung mit Subtaxa von *Brassica oleracea* die Abhängigkeit der Konzentrationen von Ca und Mg im Spross zur genetischen Variabilität innerhalb bestimmter Populationen (Broadley *et al.* 2008). Dies unterstützt die Vermutung, dass die Ionenhomöostase in Pflanzenzellen einer komplexen Kontrolle mit zahlreichen umweltbedingten genetischen Adaptionen unterliegt (Baxter 2009).

Bei Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion unter Verwendung des mbSUS (Obrdlik *et al.* 2004) interagieren MRS2-1 und MRS2-5 miteinander stärker als MRS2-1 mit sich allein, jedoch ist die Wechselwirkung von MRS2-5 mit sich selbst am stärksten. Die Interaktion von MRS2-10 mit sich selbst ist in etwa gleich stark ausgeprägt wie die mit MRS2-1 oder MRS2-5 (Schmitz 2011). Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit werden durch erste Resultate einer umfassenden Interaktionsstudie für *Arabidopsis* Membranproteine (<http://www.associomics.org/>) bestätigt. Diesen Daten zufolge sind MRS2-1, MRS2-5 und MRS2-10 in der Lage neben Homooligomeren auch Heterooligomere mit anderen MRS2 Proteinen zu bilden (Lalonde *et al.* 2010). Derartige Heterooligomere kennt man bereits von K⁺-Kanälen bei denen der Ionen-transport über die unterschiedliche Zusammensetzung des Proteinkomplexes aus verschiedenen Untereinheiten reguliert wird (Geiger *et al.* 2009).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darüber hinaus an, dass MRS2-1 und MRS2-10 in ihrer Funktion zumindest teilweise redundant sind und das Pflanzen für ein Wachstum unter Normalbedingungen eines der beiden Proteine benötigen. Dies ist auf der einen Seite aufgrund der hohen Ähnlichkeit von beiden Proteine nicht überraschend, aber umso erstaunlicher da sie zwar in den selben Geweben jedoch nicht in der selben Membran lokalisiert zu sein scheinen (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Möglicherweise haben sie einen komplementären Einfluss auf den pflanzlichen Ionenhaushalt, in welchem MRS2-10 die Mg-Aufnahme über die Plasmamembran und MRS2-1 dessen anschließende Speicherung in der Vakuole vermittelt. Im Gegensatz hierzu scheint MRS2-5, trotz seiner erkennbaren Sequenzähnlichkeit und der Co-Lokalisation mit MRS2-1, keine zu den beiden Proteinen redundante Funktion zu besitzen (Conn *et al.* 2011b). Möglicherweise wurden aber bei der Suche nach *mrs2-5 mrs2-10* bzw. *mrs2-1 mrs2-5 mrs2-10* Mutanten nicht genug Nachkommen analysiert, so dass Pflanzen auch nach Verlust aller drei Proteine unter Standardbedingungen vital sein könnten.

3.2. Erzeugung von Pflanzen mit verbesserter Anpassung auf umweltbedingten Stress durch Überexpression von *MRS2-7*

Bisher wurde unter den *Arabidopsis* *MRS2* Proteinen nur für den Verlust von *MRS2-7* ein Mg^{2+} -abhängiger Phänotyp beobachtet (Gebert 2006), allerdings ist die physiologische Bedeutung dieses Proteins nach wie vor unbekannt. Möglicherweise ist seine Hauptfunktion die initiale Aufnahme von Magnesium in den Symplasten der Wurzel oder es ist an dessen Transport in das Leitgewebe beteiligt. Darüber hinaus könnte es aber auch eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung zur physiologischen Anpassung an Mg^{2+} -Mangel besitzen.

3.2.1. *MRS2-7* Expressionsdaten und Komplementation des *mrs2-7* Phänotyp

Expressionsdaten aus *Microarrays* zeigen, dass *MRS2-7* hauptsächlich in der *Arabidopsis* Wurzel und dort speziell im ruhenden Zentrum transkribiert wird (Nawy *et al.* 2005), was durch die Expressionsprofile von Promotor:GUS-Fusionen bestätigt wird (Meschenmoser 2008). Bei Wachstum in einer hydroponischen Nährlösung mit geringem Ca:Mg-Verhältnis ([Ca]:[Mg] 1:15) wird neben anderen Transportergenen auch die Transkription von *MRS2-7* nach 90 Minuten hochreguliert (*MRS2-7*↑, *CAX1*, *CAX2* und *CAX3*↓, *SULTR3;1*, *SULTR3;4* und *SULTR4;1*↓, *MHX1*↑, *CHX20*↑), so dass dieses Protein offenbar ebenso wie *MRS2-1* und *MRS2-5* an der Ionenhomöostase beteiligt ist (Visscher *et al.* 2010). Untersuchungen zum reifen *MRS2-7* Transkript zeigen, dass offenbar zwei verschieden große Isoformen des Proteins (*MRS2-7a* und *MRS2-7b*) in unterschiedlichen Organen vorhanden sind. Von diesen zwei Isoformen ist aber nur *MRS2-7a* in der Lage, dass Wachstum der *Salmonella* MM281 Mutante auf normalem Medium wiederherzustellen (Mao *et al.* 2008). Dies erklärt einleuchtend, warum nur die korrekt gespleißten cDNAs der *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* Linie die *mrs2-7 Knockout*-Mutante bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen komplementieren konnten (Abb. 2.10 a), während die zahlreichen falsch bzw. unvollständig gespleißten Transkripte in der *mrs2-7(2) Pro_{MRS2-7}:MRS2-7g* Linie so wie die Isoform *MRS2-7b* hierzu nicht fähig waren.

3.2.2. Subzelluläre Lokalisation von *MRS2-7* im Endomembransystem

Die Fluoreszenzmikroskopie von *MRS2-7*:GFP Fusionsproteinen ergab eine Lokalisation im Endomembransystem von Tabakepidermiszellen (Abb. 2.16 f, Abb. 2.18 f) und wurde durch die Co-Lokalisation mit einem DsRED-ER-Marker verifiziert (Abb. 2.19 d - f). Sowohl das GFP als auch das DsRED Protein alleine sind in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert (Haseloff *et al.* 1997; Jach *et al.* 2001). Außerdem ließ sich die Mobilität und der Transport des Fusionsproteins in Golgi-Vesikeln über Actinkabel entlang der ER-Stränge im Cytoplasma beobachten (Abb. 2.20) (Boevink *et al.* 1998; Nebenführ und Staehelin 2001). Daher ist das Fusionsprotein höchstwahrscheinlich auch im Tonoplasten und in der Plasmamembran vorhanden.

Nach stabiler Transformation der *MRS2-7*:GFP Konstrukte in den *Arabidopsis* Wildtyp Col-0 und die *mrs2-7 Knockout*-Mutante konnte trotz der erfolgreichen Selektion von transgenen

Pflanzen durch Hygromycinresistenz keine Fluoreszenz in den untersuchten Geweben beobachtet werden (Abb. 2.21 c). Weitere Analysen via RT-PCR und Western Blot (Abb. 2.21 a und b) bestätigten das Vorhandensein eines 2 kb großen Transkripts und die Expression des MRS2-7:GFP Fusionsproteins in Rosettenblättern. Die detektierten Banden entsprachen etwa einem Molekulargewicht von 55 kDa und lagen damit deutlich unter den erwarteten 74 kDa. Selbst die Annahme, dass integrale Membranproteine in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel durch die verhältnismäßig stärkere Bindung von SDS ein scheinbar geringeres Molekulargewicht besitzen (Sauer und Stadler 1993; Yuan *et al.* 2009) kann diese große Abweichung nicht befriedigend erklären. Möglicherweise kommt es zu einer kryptischen Spaltung der Polypeptidkette, so dass zwar die Bindungsstelle des α -GFP-Antikörper erhalten bleibt aber kein vollständiges Fusionsprotein vorhanden ist. Die Fusion von MRS2-7 mit GFP war nicht in der Lage, den Phänotyp der *mrs2-7 Knockout*-Mutante zu komplementieren (Abb. 2.21 d).

Diese Beobachtung sprechen dafür, dass kein vollständiges und funktionales Fusionsprotein gebildet wurde. Die Komplementation einer entsprechenden *Knockout*-Mutante durch ein funktionales und korrekt sortiertes bzw. assembliertes Fusionsprotein ist eine essentielle Voraussetzung um die subzelluläre Lokalisation bei GFP-Reporterstudien zu verifizieren (Moore und Murphy 2009). Weitere Fusionen von MRS2 Proteinen mit GFP in Hefe waren ebenfalls nicht in der Lage die *alr1 Δ alr2 Δ* Mutante zu komplementieren (Drummond *et al.* 2006). Eine durch die GFP-Fusion bedingte Fehlfaltung könnte zu einer Erkennung des Proteins durch Kontrollmechanismen zum Abbau über das Ubiquitin/Proteasom System führen.

Insgesamt ist die Lokalisation von MRS2-7:GFP und den anderen MRS2:GFP Fusionen im ER bzw. Endomembransystem kritisch zu hinterfragen, da offenbar alle untersuchten Fusionen dort zu landen scheinen (Abb. 2.16 a - f, Abb. 2.18 a - f). Proteinfusionen mit fluoreszierenden Reportern sind durch den Verbleib von falsch gefalteten bzw. assemblierten Proteinen im ER oder die Sortierung in die Vakuole anfällig für markierungsbedingte Artefakte. Darüber hinaus ist der Transport vieler Proteine an ihren Zielort mit einer Passage durch einzelne oder mehrere Kompartimente des Endomembransystems verbunden (Moore und Murphy 2009). Daher benötigt eine Lokalisation im Endomembransystem immer eine Verifizierung über alternative Methoden wie beispielsweise der Immuno-Gold-Färbung oder mikrosomaler Fraktionierung mit anschließendem Western Blot (Millar *et al.* 2009; Moore und Murphy 2009). Im Laufe der vorliegenden Arbeiten konnten für derartige Analysen bisher keine ausreichend spezifischen Antikörper gegen MRS2-7 oder andere MRS2 Proteine hergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen einzelnen MRS2 Proteinen (z.B. MRS2-1 und MRS2-10 oder MRS2-2 und MRS2-7) ist es womöglich sinnvoller, die Antikörper durch kurze synthetische Peptide anstelle der hier verwendeten 120 AS große Proteinfragmente herzustellen.

3.2.3. Physiologische Bedeutung von MRS2-7 und Evolution in *Arabidopsis*

Arabidopsis thaliana Pflanzen mit einem defekten *MRS2-7* reagieren auf Magnesiummangel mit einem stark verringertem Wachstum (Gebert 2006). Außerdem wurde ein Polymorphismus im *MRS2-7* Promotor bei zwei unterschiedlichen Populationen des nahen Verwandten

Arabidopsis lyrata gefunden, der mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen im Substrat korreliert (Turner *et al.* 2010). Die Ionenprofile der drei *mrs2-7 Knockout*-Linien zeigten im Gegensatz zum *mrs2-1 mrs2-5 Doppel-Knockout* keine Abweichung bei der Calciumkonzentration sondern einen signifikant verringerten Kaliumgehalt (Abb. 2.13, Tab. 2.4). Offenbar wurde durch den *mrs2-7 Knockout* nicht unmittelbar die Magnesiumkonzentration sondern die Ionenhomöostase insgesamt beeinflusst.

Im *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 sind *MRS2-8* und *MRS2-9* durch Verschiebungen des Leserasters zu Pseudeogenen mutiert, während beide Gene im Ökotyp *Ler* vollkommen intakt vorliegen. Interessanterweise besitzt der nächste Verwandte *Arabidopsis lyrata* von diesen drei sehr nah verwandten Genen nur das *MRS2-7*, so dass nach der Abgrenzung beider Arten sowohl mehrere Genduplikationen als auch Pseudogenesierungen in einigen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen stattgefunden haben müssen (Abb. 3.6).

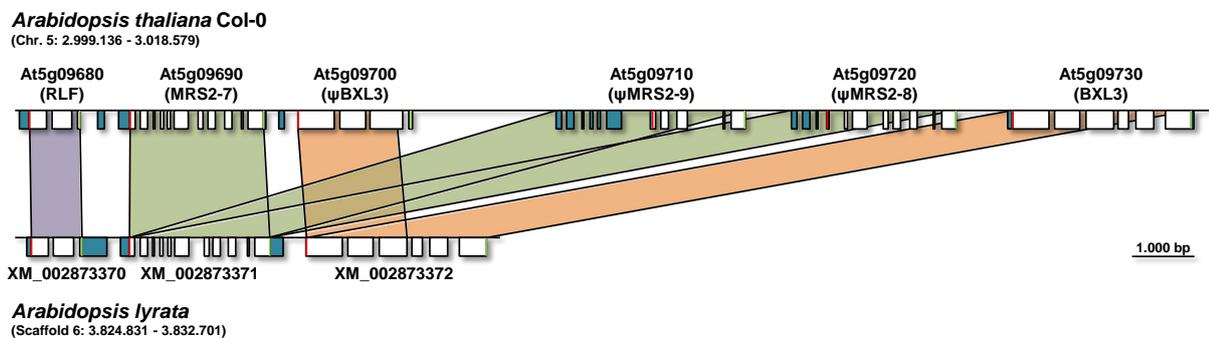


Abbildung 3.6. Gen-Arrangement von *MRS2-7*, *MRS2-8* und *MRS2-9* auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* und homologe Bereiche in *Arabidopsis lyrata*.

Dargestellt sind codierende (weiße Boxen) und nichtcodierende Bereiche (blaue Boxen) mit untranslatierten 3'- und 5'-Regionen sowie Start- und Stopcodons (grüner bzw. roter Balken) von *MRS2-7*, *MRS2-8*, *MRS2-9* und benachbarten Genen. Homologe Abschnitte in den Genomen der beiden *Arabidopsis*-Arten sind gleichfarbig hervorgehoben. RLF = *Reduced Lateral root Formation*, enthält eine Cytochrom b5-ähnliche Häm/Steroid-Bindedomäne. BXL3 = *beta-xylosidase like protein, glycosyl hydrolase family 3*.

Der *MRS2-7* Transporter könnte eine wichtige physiologische Funktion bei der Signaltransduktion spielen, um beispielsweise die Ladungsverschiebung bei der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER auszugleichen. Aktuelle Studien zeigen bereits, dass Magnesium die Aktivität von Calcium- bzw. Kalium-Kanälen in Säugetieren blockieren kann (Romani 2007). Außerdem wurde der direkte Austausch von Ca^{2+} gegen Mg^{2+} über die Membran des endoplasmatischen Retikulums der Photorezeptoren von Bienen (Baumann *et al.* 1991) und der des sarkoplasmatischen Retikulums von Muskelzellen (Romani und Scarpa 1992) gemessen. In Hefe konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Mg^{2+} und Ca^{2+} bei Magnesiummangel antagonistisch reguliert sind (Wiesenberger *et al.* 2007). Letztendlich zeigen auch die Elementarprofile von Spross und Blättern verschiedener Pflanzen, dass der Gehalt von Calcium mit dem von Magnesium stark korreliert ist (Broadley *et al.* 2008; Baxter 2009).

3.2.4. Aluminium Resistenz durch ektopische Überexpression von *MRS2-7*

Das Erreichen einer toxischen Al^{3+} Konzentrationen in Bodenlösungen hängt vor allem von einem niedrigen pH-Wert, d.h. von hohen Konzentrationen an H^+ Ionen ab. Im globalen Vergleich sind die Böden im Norden von Europa und Russland, im Osten und Westen der USA, in Kanada und Ostasien bzw. Indonesien sowie den Bereichen der Regenwälder in Südamerika bzw. West- und Zentralafrika besonders stark sauer (Abb. 3.7).

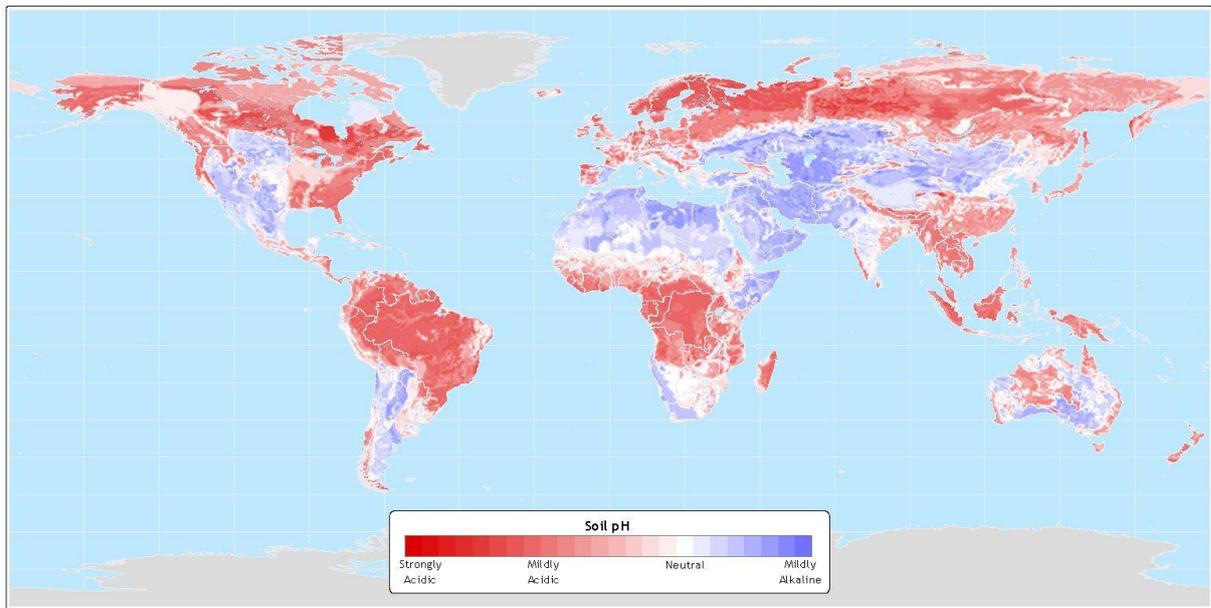


Abbildung 3.7. Die globale Verteilung der pH-Werte im Boden von stark sauer (rot) bis leicht alkalisch (blau).

Quelle: IGBP-DIS (1998) SoilData(V.0) A program for creating global soil-property databases, IGBP Global Soils Data Task, France.

Neben vielen anderen toxischen Effekten inhibiert Aluminium vor allem die Magnesiumaufnahme und führt zu schwerwiegenden Mangelsymptomen und einem stark reduzierten Wurzelwachstum (Rengel und Robinson 1989; Rengel 1990). Durch zahlreiche Untersuchungen konnte in den letzten Jahrzehnten gezeigt werden, dass die gesteigerte Zufuhr von Magnesium eine bedeutende Rolle bei der Toleranz von Pflanzen gegenüber einem Überschuss an Aluminium spielt (Tan *et al.* 1991; Silva *et al.* 2001a; Silva *et al.* 2001b; Silva *et al.* 2001c; Watanabe und Okada 2005; Mariano und Keltjens 2005; Bose *et al.* 2011). Eine ähnliche Beteiligung von Magnesium an der für Al^{3+} -Toleranz ist auch für *Saccharomyces cerevisiae* bekannt (MacDiarmid und Gardner 1996). Durch die Überexpression von *MRS2-10* in *Salmonella* und *MRS2-11* in Hefe konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Menge von Transporterproteinen den Al^{3+} -induzierten Magnesiummangel aufheben kann (Li *et al.* 2001). Im Einklang hierzu vermindert die Überexpression von *MRS2-10* in Tabak die Aluminiumtoxizität und bewirkt sowohl ein besseres Wurzelwachstum als auch eine geringere Callose-Akkumulation in der Wurzel (Deng *et al.* 2006). Auch die Überexpression entfernt verwandter Proteine wie Alr1 und Alr2 vermittelt in Hefe eine erhöhte Aluminiumresistenz (MacDiarmid und Gardner 1998).

Die hier durchgeführten vorläufigen Untersuchungen mit der *mrs2-7(2) Pro_{35S}:MRS2-7c* Linie zeigten, dass ähnlich wie bei anderen MRS2 Proteinen durch eine Überexpression die Sensitivität gegenüber Al^{3+} verringert wurde, während die *mrs2-7(2)* Mutante noch anfälliger gegenüber der Al^{3+} -Toxizität war (Abb. 2.14 a und b). Neben der Sensitivität gegenüber freiem Al^{3+} ist *Arabidopsis* jedoch auch anfällig für niedrige pH-Werte (Iuchi *et al.* 2007), die aber für die Bioverfügbarkeit des Aluminiums zwingend notwendig sind. Daher muss bei der Beurteilung des Pflanzenwachstums zwischen den toxischen Effekten des Aluminiums und des pH-Wertes unterschieden werden. Außerdem ist die Wahl des Puffersystems entscheidend, da Pflanzen in der Lage sind den pH-Wert des Mediums z.B. durch die Exkretion von Chelatoren auf ein tolerierbares Niveau zu verändern. Im direkten Vergleich der *mrs2-7(2)* Mutante mit dem Wildtyp ist diese deutlich empfindlicher gegenüber einem niedrigen pH-Wert und zusätzlichem Al^{3+} , der Zusatz von $AlCl_3$ kann jedoch in beiden Genotypen das Wurzelwachstum weiter reduzieren (Abb. 2.14 c).

3.3. Heterologe Systeme erlauben die funktionelle Untersuchung von pflanzlichen MRS2 Proteinen

Für funktionelle Studien mit heterologen Systemen sind vor allem einzellige Organismen wie die Prokaryonten gut geeignet, da sie in der Regel schnell wachsen und über kurze Generationszeiten verfügen. Sie erlauben die einfache Untersuchung von Substratspezifität und Reaktionskinetik unbekannter Proteine an einzelnen Zellen, die oftmals im Gegensatz zu denen des vielzelligen Ursprungsorganismus leicht zu gewinnen und modifizieren sind. Die Modellsysteme für diese Art von Experiment sind meistens physiologisch und genetisch gut charakterisiert und es existieren zahlreiche Techniken um die Funktion eines gewünschten Gens oder Proteins zu identifizieren. Die Bäckerhefe ist ein eukaryontischer Einzeller und kann damit wichtige posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder andere Veränderungen an den Proteinen vornehmen, welche unter anderem die richtige Faltung, den Schutz vor Abbau und die Proteinsortierung beeinflussen. Im Laufe der letzten Jahre wurden große Kollektionen von Bakterien- und Hefemutanten mit einem klar definierten Phänotyp etabliert, die sich ganz besonders für Komplementationsversuche mit den schwer zugänglichen Proteinen aus Pflanzen eignen.

3.3.1. Komplementation und mag-fura 2 Messungen der Aufnahmekinetik mit *mrs2Δ* Hefemutanten

MRS2-1 war das erste identifizierte Mitglied der *Arabidopsis* Familie von Magnesiumtransportern und ist in der Lage eine *mrs2Δ* Mutante zu komplementieren, wenn es durch ein endogenes Transitpeptid in das Mitochondrium gelenkt wird (Schock *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurden auch alle weiteren acht funktionellen Mitglieder der Genfamilie an das Transitpeptid von Mrs2p fusioniert und unter Kontrolle des nativen MRS2 Promotors in der Mutanten exprimiert. Die Wiederherstellung einer intakten Atmungskette in *mrs2Δ* Mutanten lässt sich sehr einfach durch ein Wachstum auf Medien mit einer nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle beobachten. Alle Konstrukte erlaubten den Mutanten auf nichtselektivem YPD Medium gleichmäßig zu wachsen, so dass eine störende Beeinflussung des Hefemetabolismus durch die fremden Proteine ausgeschlossen werden kann (Abb. 2.24 a, links). Beim Vergleich der *Arabidopsis* MRS2 Konstrukte untereinander erlaubten alle in selbem Maße das Wachstum der Mutante auf selektivem Medium (Abb. 2.24 a, rechts). Bei den Mutanten mit dem MRS2-6 Konstrukt könnte die ursprüngliche OD₆₀₀ vor dem Tröpfeln etwas höher als 1 gewesen sein und würde daher das etwas stärkere Wachstum auf beiden Medien erklären. Die Hefen mit dem endogenen Mrs2p Konstrukt wuchsen mit Abstand am besten, während der leere Vektor die *mrs2Δ* Mutante erwartungsgemäß nicht komplementieren konnte.

Vergleichbare Versuche zur Komplementation von *alr1Δ alr2Δ* Hefemutanten mit nativen MRS2 Konstrukten waren nur teilweise erfolgreich. So konnten nur CorA, MRS2-1, MRS2-10 und MRS2-11 die Abhängigkeit der Mutante von zusätzlichem Mg²⁺ im Medium aufheben (Li *et al.* 2001; Drummond *et al.* 2006; Costa *et al.* 2007). Eventuell sind die bei MRS2-1 und MRS2-10 vorhergesagten Signalpeptide (Abb. 3.3) für die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran

und damit für die Komplementation der Hefemutante nötig. In Pflanzen besitzt MRS2-11 ein chloroplastidäres Transitpeptid (Abb. 2.22), was in Hefe aufgrund der fehlenden Chloroplasten offenbar zu einem Transport des Proteins in die Plasmamembran führt (Drummond *et al.* 2006). Für die Komplementation der *mrs2* Δ Mutante ist in den meisten Fällen das endogene Mrs2p Transitpeptid, außer beim ebenfalls mitochondrialen Mrs2 Protein des Menschen, zwingend nötig um das zu untersuchende Protein in die innere Membran der Mitochondrien zu dirigieren (Bui *et al.* 1999; Zsurka *et al.* 2001). Ob dies auch für die mitochondrial vorhergesagten *Arabidopsis* Proteine MRS2-4 und MRS2-6 zutrifft lässt sich nach den bisherigen experimentellen Daten nicht zweifelsfrei beurteilen und bedarf weiterer Untersuchungen (Weyand 2006).

Zu Beginn der Untersuchung des Transports von Mg^{2+} durch MRS2 Proteine in komplementierten Hefemutanten konnte dieser nur indirekt über die Wiederherstellung der ursprünglichen Magnesiumkonzentration des Wildtyps nachgewiesen werden (Schock *et al.* 2000; Li *et al.* 2001). Seit ein paar Jahren ist es möglich mit Hilfe des mag-fura 2 Systems den Membrantransport von Mg^{2+} über ein fluoreszierendes Reportermolekül direkt und in Echtzeit zu messen (Kolisek *et al.* 2003). Die Aufnahme von Magnesium in die isolierten Hefemitochondrien der komplementierten *mrs2* Δ Mutanten konnte für alle elf Konstrukte gemessen werden (Abb. 2.24 b). Eine hohe Effizienz des Mg^{2+} -Imports wurde bei MRS2-1, MRS2-10 und MRS2-7 beobachtet, während für die anderen Proteine etwas schlechtere Aufnahmeleistungen gemessen wurden. Das endogene Mrs2p der Hefe konnte, wie bereits zuvor beim Test auf selektivem Medium gesehen, das Magnesium mit Abstand am schnellsten in die Mitochondrien transportieren. Die Kapazität von MRS2-3 lag im Widerspruch zum Wachstumstest nur geringfügig über der des leeren Vektors. Möglicherweise ist MRS2-3 zumindest in der fremden Membranumgebung des Mitochondriums ein langsamer Transporter, der die Magnesiumhomöostase eher über ein Intervall von mehreren Stunden als in wenigen Minuten vermittelt. Von allen *Arabidopsis* Proteinen sind sich MRS2-1 und MRS2-10 in ihrer Aminosäuresequenz am ähnlichsten, was möglicherweise zu dem übereinstimmenden Transportverhalten führte. Letztendlich lässt sich jedoch aus diesen Daten keine Aussage über die Affinität bzw. Transportkinetik der pflanzlichen MRS2 Proteine treffen, da die hierfür erforderliche Quantifizierung der Proteinmengen nicht erfolgreich war. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Verwendung eines einfachen anstelle eines verdreifachten Hämagglutinin Epitops sein, so dass im Western Blot die Antikörper nicht ausreichend stark binden konnten (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich zwischen den bisherigen Komplementationsversuchen in *Salmonella* und *Saccharomyces* mit den in dieser Arbeit ermittelten Aufnahmekapazitäten zeigt, dass diese zumindest teilweise in Widerspruch zueinander stehen. So wurde MRS2-7 nach Expression in der MM281 Mutante aufgrund des schlechteren Wachstums bei niedrigen $MgSO_4$ Konzentrationen im Vergleich zu MRS2-10 als Magnesiumtransporter mit niedriger Affinität eingestuft (Mao *et al.* 2008). Sowohl die hier vorliegenden Wachstumstests als auch die mag-fura 2 Kurven deuten aber an, dass beide *Arabidopsis* Proteine gleich gut komplementieren konnten und die Aufnahmekapazitäten nicht voneinander abwichen (Abb. 2.24 a und b). Das Transportverhalten eines bestimmten MRS2 Proteins hängt also offenbar sehr stark von den physiologischen Eigenheiten des heterologen Systems ab, in dem es exprimiert wird. Die Aufnahmekinetik und

Substratspezifität verschiedener MRS2 Proteine sollte also nur zwischen gleichartigen Experimenten in einem einzigen Modellsystem und nicht zwischen mehreren unabhängigen Versuchsaufbauten verglichen werden. Alternative Experimente zur Messung der Transportkinetik wurden bereits für einzelne CorA-ähnliche Proteine durchgeführt. Zu diesen zählen unter anderem elektrophysiologische *Patch-Clamp*-Messungen in großen Lipidvesikeln (Schindl *et al.* 2007; Sponder *et al.* 2010) oder Konkurrenzexperimente mit radioaktiven Ni^{2+} -Isotopen (Li *et al.* 2001; Mao *et al.* 2008; Li *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b). Keiner dieser Ansätze kann für sich in Anspruch nehmen, die ursprünglichen physiologischen Umweltbedingungen der untersuchten Pflanzenproteine originalgetreu nachzubilden, so dass Ergebnisse aus Studien mit heterologen Systemen lediglich als Indiz für eine bestimmte Funktion zu interpretieren sind.

3.3.2. Komplementation von *Escherichia coli* ΔcorA ΔmgtA Mutanten

Die Komplementation von prokaryontischen *Knockout*-Mutanten ermöglicht physiologische Untersuchungen von Transportproteinen in einem sehr schnell wachsenden einzelligen Organismus mit maximal zwei Biomembranen. Neben Fragestellungen ob das zu untersuchende Protein die Funktion des mutierten endogenen Proteins übernehmen kann sind weitere Aussagen über die Funktionsweise z.B. durch die Messung der Transportkinetik und interner bzw. externer Substratkonzentration möglich. So könnten Homologe zu den MRS2 Magnesiumtransportern innerhalb der verfügbaren Genome von Angiospermen (Abb. 3.5) oder basalen Landpflanzen wie *Physcomitrella patens* und *Selaginella moellendorffii* in der Lage sein entsprechende *E. coli*-Mutanten zu komplementieren. Die funktionelle Komplementation und die sich daraus ergebende Wachstumsrate der Bakterien in verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Mg-Konzentrationen ist durch Messung der OD_{600} im Verlauf weniger Stunden leicht zu dokumentieren. Die Identifizierung wichtiger Aminosäuren ist durch Mutationen in den Proteinen sowie deren Auswirkungen auf den Transport bei Wachstumstests auf selektiven Medien mit wenig Aufwand realisierbar (Smith *et al.* 1998b; Szegedy und Maguire 1999; Svidová *et al.* 2010). Ähnlich wie bei den Hefemitochondrien kann die Aufnahmegeschwindigkeit von Mg^{2+} in Abhängigkeit zur Substratkonzentration bei Prokaryonten durch den sensitiven mag-fura 2 Farbstoff bestimmt werden (Froschauer *et al.* 2004), allerdings ohne die komplizierten Schritte der Isolation und Aufreinigung der Mitochondrien. Alternativ hierzu kann auch die intrazelluläre Konzentration eines aufgenommenen Isotops direkt bestimmt und der Transport eines anderen Substrates durch kompetitive Hemmung indirekt gemessen werden. Bei CorA-ähnlichen Transportern wurde bereits die Inhibierung der Aufnahme von $^{63}\text{Ni}^{2+}$ in *Salmonella typhimurium corA mgtA mgtB* MM281 Mutanten zur Bestimmung der Affinität von vier *Arabidopsis* MRS2 Proteinen gegenüber Mg^{2+} verwendet (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Mao *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b).

Die ursprüngliche ΔcorA ΔmgtA *E. coli* Doppelmutante (Park *et al.* 1976) ist in der *The Coli Genetic Stock Center* (CGSC) Kollektion nicht verfügbar. Sie wurde durch zufällige Mutagenisierung mit Methylmethansulfonat gewonnen, so dass nicht bekannt ist welche weiteren genetischen Defekte noch vorhanden waren. Ein alternatives System welches zielgerichtet das gewünschte Gen ausschaltet bedient sich der homologen Rekombination des Bakteriophagen

λ (Datsenko und Wanner 2000). Für die Herstellung der *Knockouts* wurden die Primer mit den homologen Sequenzen für *CorA* und *MgtA* aus der Keio-Kollektion übernommen, da diese nach Möglichkeit einen intakten Leserahmen erhalten um polare Effekte auf stromabwärts liegende Gene zu vermeiden (Baba *et al.* 2006). Dadurch gelang es ohne Schwierigkeiten sowohl $\Delta corA$ als auch $\Delta mgtA$ Mutanten zu erzeugen (Abb. 2.26 a und b). Das auffälligste Problem bei der Herstellung einer $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante war die doppelte Insertion durch die nicht beabsichtigte homologe Rekombination der *FLP-recombinase target*-Sequenzen (Abb. 2.27 a und b). Dies machte die nachträgliche Entfernung dieses Bereichs nötig, so dass man abschließend die Antibiotikumresistenz nicht mehr über eine Flippase heraus rekombinieren dafür aber korrekte Doppelmutanten erzeugen konnte (Abb. 2.28 a und b).

Während die $\Delta corA$ und $\Delta mgtA$ Mutanten ebenso wie der Wildtyp ohne zusätzliches Magnesium im Medium auskommen ist die Doppelmutante ohne den Zusatz von 10 mM $MgSO_4$ nicht lebensfähig (Abb. 2.28 c und d). Dies deutet darauf hin, dass alle Transportsysteme zur Magnesiumaufnahme defekt sind und die Bakterien nur durch Diffusion über die Membran oder unspezifischen Transport in die Zelle mit Mg^{2+} versorgt werden können. Den Ergebnissen von Hattori *et al.* (2009) zufolge soll in *E. coli* ein drittes Transportsystem für Magnesium existieren und nur die Abwesenheit aller drei Systeme zu einer auxotrophen Mutante führen. Der hierfür verantwortliche Locus *yhiD* codiert für ein Protein welches zu etwa 54% Ähnlichkeit zum *MgtC* aus *Salmonella* besitzt. Komplementationversuche in der MM281 Tripelmutante zeigen, dass *MgtC* kein Mg^{2+} -Transporter aber essentiell für volle Virulenz von *Salmonella typhimurium* in Mäusen und zum langfristigen Überleben in Makrophagen ist (Moncrief und Maguire 1998; Blanc-Potard und Groisman 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bereits die Deletion von *CorA* und *MgtA* ausreicht um eine auxotrophe Mutante herzustellen, und die Mutation von *YhiD* möglicherweise nur die Abhängigkeit von 10 mM auf 100 mM Magnesium im Medium erhöht. Kontrollsequenzierungen des *yhiD* Locus in der $\Delta corA \Delta mgtA$ Mutante bestätigen das dieser vollkommen intakt vorliegt (Daten nicht gezeigt). Die 1976 beschriebenen $\Delta corA \Delta mgtA$ *E. coli* Mutante benötigt ebenfalls 10 mM Magnesium im Medium (Park *et al.* 1976).

Die $\Delta corA$ Mutanten zeigten wie erwartet eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Cobaltkonzentrationen im Medium während die $\Delta mgtA$ Mutanten und der Wildtyp BW25113 unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage waren zu wachsen (Abb. 2.26 d und e). Die Zugabe von 10 mM $MgSO_4$ konnte das Wachstum des Wildtyps auf Medium mit 3 mM $CoCl_2$ leicht verbessern, die $\Delta corA \Delta mgtA$ Doppelmutante hingegen konnte unter diesen Bedingungen nicht wachsen (Abb. 2.28 e). Dies lässt sich im Fall des Wildtyps durch den Zusatz von Magnesium erklären, welches durch kompetitive Hemmung die Toxizität des Cobalts im Medium vermindert (Nelson und Kennedy 1971). Bei der Doppelmutante hingegen, welche kein intaktes Transportsystem für Magnesium besitzt, könnte die erhöhte Cobaltkonzentration im Medium mit der passiven Aufnahme von Magnesium konkurrieren und dadurch das Wachstum verhindern.

Die ersten Versuche sowohl $\Delta corA$ als auch $\Delta corA \Delta mgtA$ *E. coli* Mutanten mit *Arabidopsis* MRS2 Expressionskonstrukten zu komplementieren führten zu keinem Ergebnis, da die

Cobaltresistenz bzw. Magnesiumabhängigkeit nicht aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Obwohl der bakterielle Vektor pBluescript II SK bereits erfolgreich zur Expression von CorA und ähnlichen Proteinen in *E. coli* Mutanten eingesetzt wurde (Zhu *et al.* 2009) sind doch möglicherweise pBR328 (Hmiel *et al.* 1989; Snavely *et al.* 1989a) oder pQE80L (Svidovà *et al.* 2010) für Komplementationsversuche besser geeignet. Bei den bisher einzigen mit *Arabidopsis* MRS2 Proteinen durchgeführten Experimenten in der *Salmonella* MM281 Mutante wurden die Vektoren λ YES und pTrc99A mit den codierenden Sequenzen für MRS2-10, MRS2-6, MRS2-7 und MRS2-2 verwendet (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Mao *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009b). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte eine Komplementation der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *E. coli* $\Delta corA \Delta mgtA$ Mutante mit weiteren pflanzlichen MRS2 Proteinen prinzipiell möglich sein, möglicherweise durch Verwendung eines anderen Expressionssystems mit anderen Promotoren.

4. Material und Methoden

4.1. Transgene Pflanzenlinien, Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 4.1. Tabellarische Übersicht der verwendeten und im Vorfeld bezogenen Pflanzenlinien

Bezeichnung	Genlocus	Katalog-Nr./ T-DNA-Vektor	Beschreibung
Col-0		N70000 ^a –	<i>Arabidopsis</i> Ökotyp Columbia 0
Col-6 (<i>gl1</i>)	At3g27920	N28176 ^a –	<i>Arabidopsis</i> Ökotyp Columbia 6 (<i>glabra 1</i>)
<i>mrs2-1</i>	At1g16010	SALK_006797 ^{a,b,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-1</i>
<i>mrs2-5</i>	At2g03620	SALK_105475 ^{a,b,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-5</i>
<i>mrs2-7(1)</i>	At5g09690	SALK_064741 ^{a,b,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-7</i>
<i>mrs2-7(2)</i>	At5g09690	SALK_090559 ^{a,b,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-7</i>
<i>mrs2-7(3)</i>	At5g09690	SALK_063452 ^{a,b,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-7</i>
<i>mrs2-10</i>	At1g80900	SALK_100361 ^{a,d} pROK2 ¹	Homozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-10</i>
GK-011A07	At5g22830	N400967 ^{a,e} pAC106 ²	Heterozygote T-DNA-Insertionslinie für <i>MRS2-11</i>
<i>MRS2-2:GRI3</i>	At5g64560	n.v. ^c pK7GWIWG(II) ³	Heterozygote RNAi-Linie für <i>MRS2-2</i> in Col-0
<i>MRS2-3:GRI5</i>	At3g19640	n.v. ^{b,c} pK7GWIWG(II) ³	Homozygote RNAi-Linie für <i>MRS2-3</i> in Col-6
<i>MRS2-4:GRI19</i>	At3g58970	n.v. ^c pK7GWIWG(II) ³	Heterozygote RNAi-Linie für <i>MRS2-4</i> in Col-0
<i>MRS2-4:GRI27</i>	At3g58970	n.v. ^c pK7GWIWG(II) ³	Heterozygote RNAi-Linie für <i>MRS2-4</i> in Col-0

Die aufgeführten Pflanzenlinien stammen von: Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (a), Gebert 2006 (b), Lee 2005 (c), Alonso *et al.* 2003 (d) und Rosso *et al.* 2003 (e). Die assoziierten T-DNA-Vektoren sind in Baulcombe *et al.* 1986 (1), Kirik *et al.* 2006 (2) und Karimi *et al.* 2002 (3) beschrieben. n.v. = Katalognummer nicht verfügbar.

Tabelle 4.2. Tabellarische Übersicht der verwendeten und im Vorfeld bezogenen Hefe- und Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Katalog-Nr.
<i>Escherichia coli</i>		
BW25113	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	7636 ^{a,1}
BW25113/pKD46	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> , pKD46 [Amp ^R]	7739 ^{a,1}
BW25141/pKD3	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), Δ(<i>phoB-phoR</i>)580, λ ⁻ , <i>galU95</i> , Δ <i>uidA3::pir</i> ⁺ , <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (del-ins)::FRT, <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> , pKD3 [Amp ^R]	7631 ^{a,1}
BW25141/pKD4	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), Δ(<i>phoB-phoR</i>)580, λ ⁻ , <i>galU95</i> , Δ <i>uidA3::pir</i> ⁺ , <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (del-ins)::FRT, <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> , pKD4 [Amp ^R]	7632 ^{a,1}
XL1-Blue	F ['] [<i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^R Δ <i>M15</i> , Tn10 (Tet ^R)], <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	200249 ²
DB3.1 TM	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , Δ(<i>sr1-recA</i>), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^R), <i>xyl-5</i> , λ ⁻ , <i>leu</i> , <i>mtl1</i>	11782-018 ³
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Rif ^R , pMP90 [Gm ^R]	n.v. ^{e,4}
C58C1-35S:p19	Rif ^R , pBIN61 ^f [Kan ^R], pCH32 ^g [Tet ^R]	n.v. ^{h,5}
GV3101-DsRedER	Rif ^R , pCB302 ⁱ [Kan ^R], pMP90 [Gm ^R]	n.v. ^{j,6}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>mrs2</i> Δ	<i>MAT</i> _α , <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>his3-1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>mrs2::HIS3</i> ,	n.v. ^{b,c,d,7}
DBY <i>mrs2-1</i>	[<i>rho</i> ⁺ <i>mit</i> ⁺]	
GW7/gd2-21.2		

Die aufgeführten Stämme bzw. Plasmide sind in Datsenko und Wanner 2000 (a), Wiesenberger *et al.* 1992 (b), Bui *et al.* 1999 (c), Kolisek *et al.* 2003 (d), Koncz und Schell 1986 (e), Bendahmane *et al.* 2002 (f), Hamilton 1997 (g), Voinnet *et al.* 2003 (h), Xiang *et al.* 1999 (i) oder Höfer *et al.* 2008 (j) beschrieben und wurden von *The Coli Genetic Stock Center* (CGSC) (1), Stratagene (2), Invitrogen (3), MPIPZ Köln: Dr. C. Koncz, AMPK Signalling (4) bzw. Dr. E. Schmelzer, Zellbiologie (5), IZMB Bonn: Prof. D. Menzel, Zellbiologie der Pflanzen (6) oder MFPL Wien: Prof. R. Schweyen, Mikrobiologie und Genetik (7) bezogen. n.v. = Katalognummer nicht verfügbar.

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle nachfolgenden Methoden gemäß den Herstellerangaben oder den publizierten Protokollen durchgeführt. Alle standardmäßigen Laborchemikalien sowie die Nährmedien für Mikroorganismen und Pflanzen wurden von den Firmen Roth, Appli-Chem oder Duchefa bezogen.

4.1.1. Kultivierung und Handhabung des verwendeten Pflanzenmaterials

Alle Pflanzen wurden, soweit nicht anderes angegeben, auf normaler Gartenerde bei 24 °C Raumtemperatur unter Langtagbedingungen mit einer Lichtintensität von etwa 100 μmol Photonen × m⁻² s⁻¹ über 16 h kultiviert. Nach der Aussaat wurden alle Samen zur Stratifikation zwei Tage lang bei 4 °C inkubiert und anschließend bis etwa eine Woche nach Keimung zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit unter einer transparenten Plastikhaube gehalten. Die sterile Anzucht von *Arabidopsis* erfolgte nach Oberflächenbehandlung der Samen (Swinburne *et al.*

1992) auf modifiziertem MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) mit Zusatz von 1 % Saccharose, 0,05 % MES, pH 5,7 (KOH) und 0,8 % Agar. Transgene Pflanzen wurden in Anwesenheit von 30 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin selektiert. Die hydroponische Kultivierung von *Arabidopsis* erfolgte im Araponics System (Araponics SA, Liège, Belgien) unter Verwendung von Nährlösungen mit unterschiedlichen MgSO_4 -Konzentrationen (Norén *et al.* 2004). Untersuchungen zur Aluminiumtoleranz von *Arabidopsis* in Flüssigkulturen basierten auf dem bereits beschriebenen MS-Medium mit Zusatz von verschiedenen AlCl_3 -Konzentrationen und Verringerung des pH-Wertes auf 4,3. Alle Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben zwei Wochen lang auf einem Schüttler bei einer Drehzahl von 100 U/min inkubiert. Die Herstellung von multiplen T-DNA-Insertionslinien durch Kreuzung wurden wie in Weigel und Glazebrook (2002) beschrieben durchgeführt.

4.2. Molekularbiologische Arbeiten

4.2.1. Herstellung der Vektoren und Transformation von Pflanzen, Pilzen und Bakterien

Alle pflanzlichen Expressionskonstrukte wurden entweder durch klassische Klonierung mit Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) oder durch Rekombination mit der GATEWAYTM Technologie (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) über den *entry vector* pDONR221 in die binären T-DNA-Vektoren pK7WG2D.1 und pK7GWIWG(II) (Karimi *et al.* 2002) bzw. pMDC43, pMDC83 und pMDC99 (Curtis und Grossniklaus 2003) erzeugt (Kap. 2.2 und 2.3) und anschließend in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (Höfgen und Willmitzer 1988). Die stabile Transformation von *Arabidopsis* erfolgte durch die *floral dip* Methode (Clough und Bent 1998) und die transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* durch Infiltration von jungen Tabakblättern (Voinnet *et al.* 2003) mit *Agrobacterium*-Kulturen.

Die Plasmide zur Hefekomplementation wurden durch klassische Klonierung nach Fusion des mitochondrialen Mrs2p Transitpeptids mit den codierenden Sequenzen für MRS2 im Vektor YEp351 (Hill *et al.* 1986) hergestellt (Kap. 2.4) und mit Hilfe der LiOAc/SS Carrier DNA/PEG Methode (Gietz und Woods 2002) in kompetente Zellen der *Saccharomyces cerevisiae mrs2Δ* Mutante transformiert. Zur Untersuchung der funktionellen Komplementation wurden die transformierten Hefen in 10fach Verdünnungen auf selektive bzw. nicht selektive Medien getropft (Bui *et al.* 1999) und die Aufnahme von Magnesium in isolierten Hefemitochondrien durch den Mg^{2+} -sensitiven Farbstoff mag-fura 2 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) bestimmt (Kolisek *et al.* 2003).

Die *Escherichia coli ΔcorA ΔmgtA* Mutanten wurden durch homologe Rekombination (Datzenko und Wanner 2000) mit Primern aus der Keio-Kollektion (Baba *et al.* 2006) und zwei unterschiedlichen Antibiotikaresistenzgenen hergestellt (Kap. 2.5). Für die Konstrukte zur Komplementation der Mutanten wurden die codierenden Sequenzen aller neun funktionellen MRS2 Gene mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NotI* und *SaII* hinter den Lac-Promotor in pBlue-script II SK (Agilent Technologies) kloniert und durch Hitzeschock in chemisch-kompetente

Zellen transformiert (Inoue *et al.* 1990). Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf LB Medium mit Ampicillin selektiert und per Kolonie-PCR verifiziert.

4.2.2. Präparation von Nukleinsäuren, cDNA Synthese und PCR

Die Isolation von DNA aus tiefgefrorenem Blattmaterial erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Plant II Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland) oder aus frischen Blattstücken nach dem Protokoll von Edwards *et al.* (1991). Zur RNA Präparation wurde das NucleoSpin[®] RNA Plant Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland) mit zusätzlichem *DNase* I Verdau (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die anschließende cDNA Synthese erfolgte mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) oder der MuLV RevertAid Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) unter Verwendung von *anchored-oligo(dT)*₁₈ Primern.

Für die Polymerasekettenreaktionen wurde im Zuge der Klonierungen die KOD DNA-Polymerase (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, USA) mit *proof reading* Funktion und für Genotypisierungen (Kap. 2.1 und 2.5) die GoTaq[®] DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) ohne *proof reading* Funktion verwendet. Für die PCRs wurden die im Anhang B aufgeführten Primer verwendet.

Alle PCR Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Färbung mit EtBr digital dokumentiert. Die Elution von aus dem Gel ausgeschnittenen PCR Produkten erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin[®] Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland).

4.2.3. Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die FST-Fragmente für die Bestimmung von T-DNA-Insertionsorten wurden nach dem durch Martine Bès *et al.* modifizierten Protokoll von Balzergue *et al.* (2001) gewonnen. Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Aufreinigung eine Ligation mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) über den A-Überhang der PCR-Produkte in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Mannheim, Deutschland). Die Ligationsansätze wurden in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen transformiert (Inoue *et al.* 1990) und positive Klone über die Ampicillin-Resistenz und blau-weiß Selektion ausgewählt. Aus den Flüssigkulturen von transformierten Bakterien wurde mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland) das rekombinante Plasmid isoliert und durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen verifiziert. Die anschließende Sequenzierung erfolgte auf einem 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) durch die Firma Macrogen Inc. in Südkorea.

4.2.4. Transkriptionsanalyse durch quantitative *real-time* RT-PCR

Für die Quantifizierung von Transkriptmengen in *Arabidopsis* RNAi-Linien wurden qRT-PCRs entweder mit dem Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) oder dem iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) mit entsprechendem Zubehör auf dem StepOneTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

4.3. Proteinextrakte aus Pflanzen, SDS-PAGE und Western Blot

Alle nachfolgenden Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Pflanzliche Proteinextrakte wurden aus in flüssigem Stickstoff gemörserten *Arabidopsis*-Blättern nach Protokoll B von Ferguson *et al.* (1990) gewonnen. Die Proteinlösungen wurden mit 2x Ladepuffer (Laemmli 1970) versetzt und auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel (Schägger und Jagow 1987) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Größentrennung der Proteine in miniVE Elektrophorese-Einheiten (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) für 2,5 h bei 140 V. Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde in einer Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) für 1,2 h bei 100 V durchgeführt (Towbin *et al.* 1979). Darauf folgte eine Färbung mit 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) für 5 min gefolgt von einer Entfärbung mit TBS. Die Membran wurde mit 4 % Milchpulver und 4 % BSA in TBS über Nacht bei 4 °C abgeblockt und mit dem monoklonalen α -GFP-Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland) in einer 1:1000 Verdünnung mit TBS für 2 - 3 h inkubiert. Es folgten 3x 10 min Waschen mit 1,5 % Milchpulver, 0,1 % Tween®20 in TBS und Inkubation des sekundären Antikörpers (Promega, Mannheim, Deutschland) in einer 1:8000 Verdünnung mit TBS für 1 - 2 h. Nach wiederholtem 3x 10 min Waschen mit 1,5 % Milchpulver, 0,1 % Tween®20 in TBS erfolgte eine Equilibrierung in Substratpuffer für 10 min und der colorimetrische Aktivitätsnachweis der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland).

4.4. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde entweder das Nikon ECLIPSE TE2000-U mit der EZ-C1 Software (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) oder Olympus FV1000 mit der FLUOVIEW Ver. 1.7 Software (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Bilddarstellung verwendet. Für die Untersuchung von GFP erfolgte die Anregung mit einem Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und die Detektion im Bereich von 500 - 530 nm, bei DsRED wurde bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und im Bereich von 560 - 620 nm detektiert.

4.5. Phylogenetische Rekonstruktion des Stammbaums der MRS2 Proteinfamilie

Die phylogenetische Untersuchung der MRS2 Proteine erfolgte mit MEGA5.01 (Tamura *et al.* 2007) unter Verwendung des MUSCLE-Algorithmus (Edgar 2004) für das Protein-Alignment. Die Berechnung Stammbaum wurde nach dem *Neighbor-Joining*-Verfahren (Saitou und Nei 1987) mit *Poisson*-korrigierten Aminosäuredistanzen und *Bootstrap*-Werten aus 10.000 Replikaten durchgeführt. Die verwendeten Proteinsequenzen der Angiospermen stammen aus der ARAMEMNON Datenbank (Schwacke *et al.* 2003) nach Suche aller unter der Domäne PF01544 vorhandenen Einträge.

A. Abkürzungen

A.1. Präfixe

Präfix	Bedeutung
α	Anti-
c	Zenti
k	Kilo
M	Mega
μ	Mikro
m	Milli
n	Nano
p	Piko

A.2. Einheiten

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
Å	Ångström
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
M	mol/L
ppm	<i>Parts per million</i> ($\cong 0,0001\%$)
r	Radius
s	Sekunde
t	Zeit
U	unit
V	Volt

A.3. Chemikalien

Abkürzung	Substanz
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Cm	Chloramphenicol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Hyg	Hygromycin
Kan	Kanamycin
Leu	Leucin
MES	2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

A.4. Sonstige Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ALR	<i>Aluminum resistance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CDS	Codierende Sequenz
DIK	Differentialinterferenzkontrast
DsRED	Discosoma sp. rot fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FST	<i>Flanking sequence tag</i>
GapC	Cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GUS	β -Glucuronidase
HA	Hämagglutinin

Abkürzung	Bedeutung
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IEF	Isoelektrische Fokussierung
InDel	Insertion und Deletion
LSM	<i>Laser scanning</i> -Mikroskop
mbSUS	<i>Mating based split ubiquitin system</i>
MGT	<i>Magnesium transporter</i>
mRNA	Boten-RNA
MRS	<i>Mitochondrial RNA splicing</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PM	Plasmamembran
PTGS	Post-Transkriptionelles Gen- <i>Silencing</i>
PTM	Post-Translationale Modifikation
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
R	Resistenz
RT	Reverse Transkriptase
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TM	Trockenmasse
TMD	Transmembrandomäne
UTR	Untranslatierter Bereich
YFP	Gelb (<i>yellow</i>) fluoreszierendes Protein

B. Oligonukleotide

B.1. Genotypisierung und FST-Sequenzierung

Name	Sequenz (5' → 3')	Linie
Genotyp-Primer für SALK T-DNA-Linien		
LBa1	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	LB von pROK2
LBb1 mod	CAA ACC AGC GTG GAC CGC TTG CTG CAA CTC	LB von pROK2
N506797up	TTC TTG CAA AAT GAG AAA CAT GAC A	SALK_006797 (<i>mrs2-1</i>)
N506797down	GAG TCG GCA TGA CAG TGC AAG	SALK_006797 (<i>mrs2-1</i>)
N605475up	GAC CCA AAG AGA AAC AAG AAC ATG A	SALK_105475 (<i>mrs2-5</i>)
N605475down	GGG GCG TGA GAG AGC GAT AGT	SALK_105475 (<i>mrs2-5</i>)
N590559up	GCT TCC AAG GCC ACC TCT AGC	SALK_090559 (<i>mrs2-7(2)</i>)
N590559down	TCT CTT TGT CGC CGT CGT CTC	SALK_090559 (<i>mrs2-7(2)</i>)
N563452up	CCT CAA GCA ACA TTT CAA GCT CTT C	SALK_063452 (<i>mrs2-7(3)</i>)
N563452down	CAA GGC GAT TAT CAC TGC CGA	SALK_063452 (<i>mrs2-7(3)</i>)
LP N600361	CAG GAT CAA AGC ATC GTT CTC	SALK_100361 (<i>mrs2-10</i>)
RP N600361	TAG GAG CTC AGA AGA CGC AAC	SALK_100361 (<i>mrs2-10</i>)
FST- und Genotyp-Primer für RNAi-Linien		
LongAd	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GC	Adapteroligonukleotid für FST-Sequenzierungen
ShortHind	P-AGC TGC AGC CCG-NH ₂	Adapteranhang für HindIII
AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC	Adapterprimer 1
AP2-C	TGG TCG ACG GCC CGG GCT GC	Adapterprimer 2
Kan1	GAA TAT CAT GGT GGA AAA TGG	LB von pK7GWIWG(II)
Kan2	AGC GGG ACT CTG GGG TTC GGA CTC TAG C	LB von pK7GWIWG(II)
AtMRS2-3:GRi5 up	CAT ACC TAT ATG CTT CGC TGA CGC CG	<i>AtMRS2-3:GRi5</i>
AtMRS2-3:GRi5 down	CTT GGA ATG TAA TGA GAC ACA GAA AAG AAT CG	<i>AtMRS2-3:GRi5</i>
AtMRS2-2:GRi3 up	AAT TAC CGG AGA GGC TCT G	<i>AtMRS2-2:GRi3</i>
AtMRS2-2:GRi3 down	CTC ATC CTT CCA ATA AAC TCA AG	<i>AtMRS2-2:GRi3</i>
AtMRS2-4:GRi19 up	AAC AGA GAT AAG GAA CAT TAA CAT C	<i>AtMRS2-4:GRi19</i>
AtMRS2-4:GRi19 down	GGG TTG TGT GCC ATG TGT G	<i>AtMRS2-4:GRi19</i>
AtMRS2-4:GRi27 up	AGC GTT CGA TGT GAT TGG AC	<i>AtMRS2-4:GRi27</i>
AtMRS2-4:GRi27 down	AAT CTT ATT GTT AAT CTC TCA TCA AC	<i>AtMRS2-4:GRi27</i>

B.2. Transkriptionskontrolle von *Knockout*- und RNAi-Linien

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen
Transkriptionskontrolle		
GAPC up	ATG GCT GAC AAG AAG ATT AGG ATC GG	<i>GAPC-1</i>
GAPC down	TTA GGC CTT TGA CAT GTG GAC GAT C	<i>GAPC-1</i>
gate2-1up	attB1 -GA ATT TTT GCA ACA ATG TCT GAG	<i>MRS2-1</i>
gate2-1down	attB2 -ATA GAG GCA TGA GTC TTC TGT A	<i>MRS2-1</i>
gate2-5up	attB1 -AT TGT GCA AAC ATG GGA GAA CAA	<i>MRS2-5</i>
gate2-5down	attB2 -AGA GAG GGA ATA CTT TCT TGT G	<i>MRS2-5</i>
gate2-7up	attB1 -GT GAA GAA TCG GAG ATG TCA CCT	<i>MRS2-7</i>
2-7 RT-PCR fw	GAA GAG CTT GAA ATG TTG CTT	<i>MRS2-7</i>
2-7 Stop	attB2 - TTA AGA TCC GAT GAG TCC TCT AA	<i>MRS2-7</i>
pMDC202 GFP	TTC CCT TAA GCT CGA TCC TGT T	<i>MRS2-7:GFP</i>
gate2-10up	attB1 -GG AGA TTG GCA ACA ATG TCT GAA	<i>MRS2-10</i>
gate2-10down	attB2 -ACA GAG GCA TGA GTC TTC TAC G	<i>MRS2-10</i>
quantitative RT-PCR		
GAPDH qPCR fw	TTG GTG ACA ACA GGT CAA GCA	<i>GAPC-2</i>
GAPDH qPCR rv	AAA CTT GTC GCT CAA TGC AAT C	<i>GAPC-2</i>
MRS2-2 qPCR fw	CTT CCC CAA CAA TAG GCT CTA AG	<i>MRS2-2</i>
MRS2-2 qPCR rv	TCA TTC TCA TCC CCA TGA ACT GT	<i>MRS2-2</i>
MRS2-3 qPCR fw	TGA CAC GGA GGA CTA CAT CAA CA	<i>MRS2-3</i>
MRS2-3 qPCR rv	TGT TAG CAT CAC ACC CAT CTG C	<i>MRS2-3</i>
MRS2-4 qPCR fw	AAG TAA TCT CAC CCG CTT GCT AG	<i>MRS2-4</i>
MRS2-4 qPCR rv	TCA GCC ATG TCT TCG TTG TCA T	<i>MRS2-4</i>

B.3. Klonierungen für *Arabidopsis*, Hefe und *E. coli*

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielvektor
Komplementation von <i>Arabidopsis mrs2-7</i>-Mutanten		
2-7gfp-gus up	attB1 -TAG GGA CTT ATT CGG TGA ATT TA	pMDC99
2-7 SplitU up	attB1 - ATG TCA CCT GAC GGA GAA CTT	pK7WG2D.1
2-7 Stop	attB2 - TTA AGA TCC GAT GAG TCC TCT AA	pMDC99, pK7WG2D.1
Apal/MRS2-7 5' U up	C <u>GGG CCC</u> TAG GGA CTT ATT CGG TGA ATT TA	pMDC99
Sacl/MRS2-7 3' U do	C <u>GAG CTC</u> GGT ATC AAG AAG TTA CAA TTT ACT G	pMDC99
C-terminale Fusion von <i>MRS2</i>-Proteinen mit GFP		
BamHI/MRS2-1up	A <u>GGA TCC</u> ATG TCT GAG CTA AAA GAG CG	pMDC83
KpnI/MRS2-1do	C <u>GGT ACC</u> GAT AGA GGC ATG AGT CTT CTG	pMDC83
Sall/MRS2-2up	G <u>GTC GAC</u> ATG GCG CAA AAC GGG TAC TTG	pMDC83
KpnI/MRS2-2do neu	C <u>GGT ACC</u> CAA GAT CCC ACA AGT CCT TTG TAC C	pMDC83
KpnI/MRS2-3up	T <u>GGT ACC</u> ATG AGA GGA GCT AGA CCC GAT GAA TTC	pMDC83
KpnI/MRS2-3do	A <u>GGT ACC</u> TCA AGA AGG CGC TTG TAC TTG CAC	pMDC83

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielvektor
KpnI/MRS2-4up	T <u>GGT ACC</u> ATG GGG AAG GGC CCC TTA TC	pMDC83
KpnI/MRS2-4do	A <u>GGT ACC</u> GAG CCT AGC AGC TTC TTC CAC CTG	pMDC83
BamHI/MRS2-5up	A <u>GGA TCC</u> ATG GGA GAA CAA CTA GAT CC	pMDC83
KpnI/MRS2-5do	C <u>GGT ACC</u> CAG AGA GGG AAT ACT TTC TTG	pMDC83
gate2-7up	attB1 -GT GAA GAA TCG GAG ATG TCA CCT	pMDC83
2-7:GFP down	attB2 -AAG ATC CGA TGA GTC CTC TAA ACC G	pMDC83
N-terminale Fusion von MRS2-Proteinen mit GFP		
SgsI/MRS2-1up	<u>GGC GCG CCA</u> ATG TCT GAG CTA AAA GAG CGC CTG	pMDC43
Sall/MRS2-1do	<u>GTC GAC TTA</u> TAG AGG CAT GAG TCT TCT GTA CTT GAA G	pMDC43
SgsI/MRS2-2up	<u>GGC GCG CCA</u> ATG GCG CAA AAC GGG TAC TTG	pMDC43
Sall/MRS2-2do	<u>GTC GAC TCA</u> AGA TCC CAC AAG TCC TTT GTA CC	pMDC43
SgsI/MRS2-3up	<u>GGC GCG CCA</u> ATG AGA GGA GCT AGA CCC GAT GAA TTC	pMDC43
Sall/MRS2-3do	<u>GTC GAC TCA</u> TTC AAG AAG GCG CTT GTA CTT G	pMDC43
SgsI/MRS2-4up	<u>GGC GCG CCA</u> ATG GGG AAG GGC CCC TTA TC	pMDC43
Sall/MRS2-4do	<u>GTC GAC TTA</u> TGA GCC TAG CAG CTT CTT CCA C	pMDC43
SgsI/MRS2-5up	<u>GGC GCG CCA</u> ATG GGA GAA CAA CTA GAT CCA TTT TCC	pMDC43
Sall/MRS2-5do	<u>GTC GAC TCA</u> GAG AGG GAA TAC TTT CTT GTG CTT G	pMDC43
gate2-7up	attB1 -GT GAA GAA TCG GAG ATG TCA CCT	pMDC43
2-7 Stop	attB2 -TTA AGA TCC GAT GAG TCC TCT AA	pMDC43
Komplementation von mrs2Δ-Hefemutanten		
heproup	G ATC GAC CAG GAG CTC GTA TAC CTA C	YEp351
heproup Smal	GAT CGA <u>CCC GGG</u> GCT TGT ATA CCT AC	YEp351
heprodo	GGG AAA AGG GAA TGT TCA	YEp351
YEp hepro/2-1 up	heprodo -CGC CCG TGA TTT AAG GCT GCT TGA	YEp351
YEp 2-1 + HA do	<u>TCT AGA TTA-AYDPVDYPY</u> -TAG AGG CAT GAG TCT TCT GTA CTT G	YEp351
YEp hepro/2-2 up	heprodo CGC TCG CGA TCT CCG GAT TCT AGA	YEp351
YEp 2-2 + HA do	<u>CTG CAG TCA-AYDPVDYPY</u> -AGA TCC CAC AAG TCC TTT GTA CCT A	YEp351
YEp hepro/2-3 up	heprodo -GGC GCG TGA TCT TAG GAT TCT CGA	YEp351
YEp 2-3 + HA do	<u>TCT AGA TCA-AYDPVDYPY</u> -TTC AAG AAG GCG CTT GTA CTT GCAC	YEp351
YEp hepro/2-4 up	heprodo -CGC TAG GGA TTT GAG GAT ACT TGG CCC TG	YEp351
YEp 2-4 + HA do	<u>TCT AGA TTA-AYDPVDYPY</u> -TGA GCC TAG CAG CTT CTT CCA CCT G	YEp351
YEp 2-5 + HA do	<u>CTG CAG TCA-AYDPVDYPY</u> -GAG AGG GAA TAC TTT CTT GTG CTT G	YEp351
YEp hepro/2-6 up	heprodo -TAA GGA TTT AAG AAC TGC CTT CTC GCAC	YEp351
YEp 2-6 + HA do	<u>TCT AGA TCA-AYDPVDYPY</u> -GTC AAG TAG CTT CTT CCA CTT GGC G	YEp351
YEp hepro/2-7 up	heprodo -CGC TCG TGA TCT CCG GAT CCT TG	YEp351
YEp 2-7 + HA do	<u>CTG CAG TTA-AYDPVDYPY</u> -AGA TCC GAT GAG TCC TCT AAA CCG A	YEp351
YEp hepro/2-10 up	heprodo -AGC ACG GGA TTT AAG GCT GCT CGA	YEp351
YEp 2-10 + HA do	<u>TCT AGA TCA-AYDPVDYPY</u> -CAG AGG CAT GAG TCT TCT ACG TTT G	YEp351
YEp hepro/2-11 up	heprodo -TCC AAG AGA TAT ACG AAG CGT TGA TCC T	YEp351

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielvektor
YEp 2-11 + HA do	GTC GAC TCA-AYDPVDYPY -AAA GAT TTT GCG TCT ACT GAG ATA G	YEp351
Herstellung und Genotypisierung von <i>Escherichia coli</i>-Mutanten		
Keio left corA	TG TGC CCA CCG AAC TGT CCG ATA TTT TAA GCA TTG GGA GTC CCG GTC ATG GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC	pKD3, pKD4
Keio right corA	TA GCC AGA CTA AGC CAC CGC TCT CGT TTT TTA CAA CCA GTT CTT CCG CTT CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG	pKD3, pKD4
Keio left mgtA	CC TGA AGA CAT TTC TGT ACT GTT TCA GAC AGT GCG GAG GGA CTC CTT ATG GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC	pKD3, pKD4
Keio right mgtA	AA TCG GGG CTA TCG TGC CCA GTT TAT TCT TTA TTG CCA GCC GTA ACG ACG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG	pKD3, pKD4
pKD4 corA up	TG TGC CCA CCG AAC TGT CCG ATA TTT TAA GCA TTG GGA GTC CCG GTC ATG AGA TCC CCT CAC GCT GCC GC	pKD4
pKD4 corA do	TA GCC AGA CTA AGC CAC CGC TCT CGT TTT TTA CAA CCA GTT CTT CCG CTT TGG GCG AAG AAC TCC AGC ATG	pKD4
test primer c1	TTA TAC GCA AGG CGA CAA GG	pKD3
test primer c2	GAT CTT CCG TCA CAG GTA GG	pKD3
test primer k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	pKD4
test primer k2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	pKD4
5'UTR CorA	CTG GCT CAC TAT CCT GTC ATC	
3'UTR CorA	GGT ATT CTA TCT CTA TTT GTT GGT G	
5'UTR MgtA	CCG GAG GTT ATA TGG AAC CTG	
3'UTR MgtA	ATC TTG ATG GAA ATC CGG GCT AT	
yhiD up	TCA AGC ATC TAA TGA CTT GCC G	pGEM-T Easy
yhiD do	CGG ATC AAT GAG CTG GTA CGC	pGEM-T Easy

B.4. Sequenzierungs-Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT	pDONR221, pGEM-T Easy, YEp351
M13F-pUC	GTT TTC CCA GTC ACG AC	pGEM-T Easy, pMDC83
M13R	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	pGEM-T Easy
M13R-pUC	CAG GAA ACA GCT ATG AC	pDONR221, pGEM-T Easy, YEp351
pMDC100 up	GAG TTA GCT CAC TCA TTA GGC	pMDC99, YEp351
pMDC100 down	TCT TCG CTA TTA CGC CAG	pMDC99, pMDC83, YEp351
At5g09690 miup	TCT CTA GTT CTG TTG TCC TTG	pMDC99 Pro _{MRS2-7} :MRS2-7g
At5g09690 mido	TAT ATA GAA TCC CCG TTT GA	pMDC99 Pro _{MRS2-7} :MRS2-7g
pMDC202 3' GFP	CGG CAA CAG GAT TCA ATC TTA A	pMDC43, pMDC83
pMDC43 5' GFP	CAC ACA ATC TGC CCT TTC G	pMDC43
hepro mido	CGT GTA CGG TAT TCA ATT CTA AG	YEp351

Literaturverzeichnis

- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C. und Kjellbom, P.** (2004). "Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking". *Plant & Cell Physiology* **45**: 1543–1556.
- Alonso, J. M. et al.** (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*". *Science* **301**: 653–657.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. und Mori, H.** (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection". *Molecular Systems Biology* **2**: 2006.0008.
- Balzergue, S. et al.** (2001). "Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders". *BioTechniques* **30**: 496–498, 502, 504.
- Bara, M., Guiet-Bara, A. und Durlach, J.** (1988). "Modification of human amniotic membrane stability after addition of magnesium salts". *Magnesium Research* **1**: 23–27.
- Bassham, D. C. und Blatt, M. R.** (2008). "SNAREs: Cogs and coordinators in signaling and development". *Plant Physiology* **147**: 1504–1515.
- Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. und Harrison, B. D.** (1986). "Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants". *Nature* **321**: 446–449.
- Baumann, O., Walz, B., Somlyó, A. V. und Somlyó, A. P.** (1991). "Electron probe microanalysis of calcium release and magnesium uptake by endoplasmic reticulum in bee photoreceptors". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 741–744.
- Baxter, I.** (2009). "Ionomics: Studying the social network of mineral nutrients". *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 381–386.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P. und Baulcombe, D. C.** (2002). "Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato". *The Plant Journal* **32**: 195–204.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Heijne, G. von und Brunak, S.** (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0". *Journal of Molecular Biology* **340**: 783–795.
- Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J. R., Slijper, M. und Menke, F. L. H.** (2007). "Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*". *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1198–1214.

- Berezin, I., Mizrachy-Dagry, T., Brook, E., Mizrahi, K., Elazar, M., Zhuo, S., Saul-Tcherkas, V. und Shaul, O.** (2008). "Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size". *Plant Cell Reports* **27**: 939–949.
- Berkowitz, G. A. und Wu, W.** (1993). "Magnesium, potassium flux and photosynthesis". *Magnesium Research* **6**: 257–265.
- Blanc-Potard, A. B. und Groisman, E. A.** (1997). "The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival". *The EMBO Journal* **16**: 5376–5385.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A. und Hawes, C.** (1998). "Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network". *The Plant Journal* **15**: 441–447.
- Bose, J., Babourina, O. und Rengel, Z.** (2011). "Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants". *Journal of Experimental Botany: im Druck*.
- Bouché, N. und Bouchez, D.** (2001). "Arabidopsis gene knockout: Phenotypes wanted". *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 111–117.
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., Mace, D., Ohler, U. und Benfey, P. N.** (2007). "A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns". *Science* **318**: 801–806.
- Briggs, G. C., Osmont, K. S., Shindo, C., Sibout, R. und Hardtke, C. S.** (2006). "Unequal genetic redundancies in *Arabidopsis* – a neglected phenomenon?" *Trends in Plant Science* **11**: 492–498.
- Broadley, M. R. et al.** (2008). "Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in *Brassica oleracea*". *Plant Physiology* **146**: 1707–1720.
- Bräutigam, A. und Weber, A. P. M.** (2009). "Proteomic analysis of the proplastid envelope membrane provides novel insights into small molecule and protein transport across proplastid membranes". *Molecular Plant* **2**: 1247–1261.
- Bräutigam, A., Shrestha, R. P., Whitten, D., Wilkerson, C. G., Carr, K. M., Fröhlich, J. E. und Weber, A. P. M.** (2008). "Low-coverage massively parallel pyrosequencing of cDNAs enables proteomics in non-model species: Comparison of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes". *Journal of Biotechnology* **136**: 44–53.
- Bui, D. M., Grogan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. und Schweyen, R. J.** (1999). "The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane". *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 20438–20443.
- Cakmak, I.** (1994). "Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves". *Journal of Experimental Botany* **45**: 1259–1266.

- Cakmak, I., Hengeler, C. und Marschner, H.** (1994). "Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants". *Journal of Experimental Botany* **45**: 1251–1257.
- Caldwell, A. M. und Smith, R. L.** (2003). "Membrane topology of the ZntB efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Journal of Bacteriology* **185**: 374–376.
- Carrie, C., Kühn, K., Murcha, M. W., Duncan, O., Small, I. D., O'Toole, N. und Whelan, J.** (2009). "Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*". *The Plant Journal* **57**: 1128–1139.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T. und Raikhel, N. V.** (2004). "The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins". *The Plant Cell* **16**: 3285–3303.
- Chakrabarti, N., Neale, C., Payandeh, J., Pai, E. F. und Pomès, R.** (2010). "An iris-like mechanism of pore dilation in the CorA magnesium transport system". *Biophysical Journal* **98**: 784–792.
- Chen, J., Li, L.-G., Liu, Z.-H., Yuan, Y.-J., Guo, L.-L., Mao, D.-D., Tian, L.-F., Chen, L.-B., Luan, S. und Li, D.-P.** (2009b). "Magnesium transporter AtMGT9 is essential for pollen development in *Arabidopsis*". *Cell Research* **19**: 887–898.
- Chen, Y., Hoehenwarter, W. und Weckwerth, W.** (2010). "Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment". *The Plant Journal* **63**: 1–17.
- Chen, Y., Wei, X., Yan, P., Han, Y., Sun, S., Wu, K. und Fan, D.** (2009a). "Human mitochondrial Mrs2 protein promotes multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating p27, cyclin D1 expression and cytochrome C release". *Cancer Biology & Therapy* **8**: 607–614.
- Chen, Z., Watanabe, T., Shinano, T., Okazaki, K. und Osaki, M.** (2008). "Rapid characterization of plant mutants with an altered ion-profile: A case study using *Lotus japonicus*". *The New Phytologist* **181**: 795–801.
- Claros, M. G. und Vincens, P.** (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences". *European Journal of Biochemistry* **241**: 779–786.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). "Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*". *The Plant Journal* **16**: 735–743.
- Cole, C., Barber, J. D. und Barton, G. J.** (2008). "The Jpred 3 secondary structure prediction server". *Nucleic Acids Research* **36**: W197–W201.
- Conn, S. und Gilliham, M.** (2010). "Comparative physiology of elemental distributions in plants". *Annals of Botany* **105**: 1081–1102.
- Conn, S. J. et al.** (2011a). "Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by *CAX1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*". *The Plant Cell*:
- Conn, S. J., Conn, V., Tyerman, S. D., Kaiser, B. N., Leigh, R. A. und Gilliham, M.** (2011b). "Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesi-

- um partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles". *The New Phytologist: im Druck*.
- Costa, B. M. T. da, Cornish, K. und Keasling, J. D.** (2007). "Manipulation of intracellular magnesium levels in *Saccharomyces cerevisiae* with deletion of magnesium transporters". *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 411–425.
- Cowan, J. A.** (2002). "Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes". *BioMetals* **15**: 225–235.
- Cromie, M. J. und Groisman, E. A.** (2010). "Promoter and riboswitch control of the Mg²⁺ transporter MgtA from *Salmonella enterica*". *Journal of Bacteriology* **192**: 604–607.
- Cromie, M. J., Shi, Y., Latifi, T. und Groisman, E. A.** (2006). "An RNA sensor for intracellular Mg²⁺". *Cell* **125**: 71–84.
- Curtis, M. D. und Grossniklaus, U.** (2003). "A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*". *Plant Physiology* **133**: 462–469.
- Dalmas, O., Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B. und Perozo, E.** (2010). "Structural dynamics of the magnesium-bound conformation of CorA in a lipid bilayer". *Structure* **18**: 868–878.
- Dann, C. E., Wakeman, C. A., Sieling, C. L., Baker, S. C., Irnov, I. und Winkler, W. C.** (2007). "Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA". *Cell* **130**: 878–892.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L.** (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640–6645.
- David-Assael, O., Saul, H., Saul, V., Mizrachy-Dagri, T., Berezin, I., Brook, E. und Shaul, O.** (2005). "Expression of AtMHX, an *Arabidopsis* vacuolar metal transporter, is repressed by the 5' untranslated region of its gene". *Journal of Experimental Botany* **56**: 1039–1047.
- Deng, W., Luo, K., Li, D., Zheng, X., Wei, X., Smith, W., Thammina, C., Lu, L., Li, Y. und Pei, Y.** (2006). "Overexpression of an *Arabidopsis* magnesium transport gene, *AtMGT1*, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance". *Journal of Experimental Botany* **57**: 4235–4243.
- Drummond, R., Tutone, A., Li, Y.-C. und Gardner, R.** (2006). "A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system". *Plant Science* **170**: 78–89.
- Edgar, R. C.** (2004). "MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis". *Nucleic Acids Research* **19**: 1349.
- Elbaz, B., Shoshani-Knaani, N., David-Assael, O., Mizrachy-Dagri, T., Mizrahi, K., Saul, H., Brook, E., Berezin, I. und Shaul, O.** (2006). "High expression in leaves of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* of AhMHX, a homolog of an *Arabidopsis thaliana* vacuolar metal/proton exchanger". *Plant, Cell & Environment* **29**: 1179–1190.

- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und Heijne, G. von** (1999). "ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites". *Protein Science* **8**: 978–984.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G. von und Nielsen, H.** (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools". *Nature Protocols* **2**: 953–971.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S. W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E. und Schmidt, U. G.** (2006). "Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach". *Plant Physiology* **141**: 196–207.
- Epstein, E. und Bloom, A. J.** (2005). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, Second Edition*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Eshaghi, S., Niegowski, D., Kohl, A., Molina, D. M., Lesley, S. A. und Nordlund, P.** (2006). "Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution". *Science* **313**: 354–357.
- Ferguson, D. L., Guikema, J. A. und Paulsen, G. M.** (1990). "Ubiquitin pool modulation and protein degradation in wheat roots during high temperature stress". *Plant Physiology* **92**: 740–746.
- Ferro, M. et al.** (2010). "AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins". *Molecular & Cellular Proteomics* **9**: 1063–1084.
- Fricker, M., Runions, J. und Moore, I.** (2006). "Quantitative fluorescence microscopy: From art to science". *Annual Review of Plant Biology* **57**: 79–107.
- Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S., Osteryoung, K. W., Gage, D. A. und Phinney, B. S.** (2003). "Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis". *Journal of Proteome Research* **2**: 413–425.
- Froschauer, E. M., Kolisek, M., Dieterich, F., Schweigel, M. und Schweyen, R. J.** (2004). "Fluorescence measurements of free $[Mg^{2+}]$ by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*". *FEMS Microbiology Letters* **237**: 49–55.
- Fuhrmann, G. F. und Rothstein, A.** (1968). "The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells". *Biochimica Et Biophysica Acta* **163**: 325–330.
- Gabriel, T. E. und Günzel, D.** (2007). "Quantification of Mg^{2+} extrusion and cytosolic Mg^{2+} -buffering in *Xenopus* oocytes". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **458**: 3–15.
- García-Véscovi, E., Soncini, F. C. und Groisman, E. A.** (1996). " Mg^{2+} as an extracellular signal: Environmental regulation of *Salmonella* virulence". *Cell* **84**: 165–174.
- Gardner, R. C.** (2003). "Genes for magnesium transport". *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 263–267.
- Gebert, M.** (2006). "A gene family of Mg^{2+} transporters in *Arabidopsis thaliana*: Molecular and physiological characterisation of knockout mutants". Diplomarbeit. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Gebert, M., Meschenmoser, K., Svidová, S., Weghuber, J., Schweyen, R., Eifler, K., Lenz, H., Weyand, K. und Knoop, V.** (2009). "A root-expressed magnesium transporter of the *MRS2/MGT* gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in low-Mg²⁺ environments". *The Plant Cell* **21**: 4018–4030.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J. und Hedrich, R.** (2009). "Heteromeric AtKC1-AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K⁺-limiting conditions". *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 21288–21295.
- Gibson, M. M., Bagga, D. A., Miller, C. G. und Maguire, M. E.** (1991). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: The influence of new mutations conferring Co²⁺ resistance on the CorA Mg²⁺ transport system". *Molecular Microbiology* **5**: 2753–2762.
- Gierth, M. und Mäser, P.** (2007). "Potassium transporters in plants - Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis". *FEBS Letters* **581**: 2348–2356.
- Gietz, R. D. und Woods, R. A.** (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method". *Methods in Enzymology* **350**: 87–96.
- Graschopf, A., Stadler, J. A., Hoellerer, M. K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S. D. und 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". *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 16216–16222.
- Gregan, J., Kolisek, M. und Schweyen, R. J.** (2001). "Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo". *Genes & Development* **15**: 2229–2237.
- Gregan, J., Bui, D. M., Pillich, R., Fink, M., Zsurka, G. und Schweyen, R. J.** (2001). "The mitochondrial inner membrane protein Lpe10p, a homologue of Mrs2p, is essential for magnesium homeostasis and group II intron splicing in yeast". *Molecular & General Genetics* **264**: 773–781.
- Groisman, E. A.** (2001). "The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ". *Journal of Bacteriology* **183**: 1835–1842.
- Grubbs, R. D. und Maguire, M. E.** (1987). "Magnesium as a regulatory cation: Criteria and evaluation". *Magnesium* **6**: 113–127.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y.** (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *Journal of Biological Chemistry* **260**: 3440–3450.
- Hamilton, C. M.** (1997). "A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA". *Gene* **200**: 107–116.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. und Hodge, S.** (1997). "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2122–2127.
- Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R. und Nureki, O.** (2007). "Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter". *Nature* **448**: 1072–1075.

- Hattori, M., Iwase, N., Furuya, N., Tanaka, Y., Tsukazaki, T., Ishitani, R., Maguire, M. E., Ito, K., Maturana, A. und Nureki, O. (2009). "Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis". *The EMBO Journal* **28**: 3602–3612.
- Heazlewood, J. L., Verboom, R. E., Tonti-Filippini, J., Small, I. und Millar, A. H. (2007). "SUBA: The *Arabidopsis* Subcellular Database". *Nucleic Acids Research* **35**: D213–D218.
- Hermans, C. und Verbruggen, N. (2005). "Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*". *Journal of Experimental Botany* **56**: 2153–2161.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J. und Verbruggen, N. (2006). "How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation?" *Trends in Plant Science* **11**: 610–617.
- Hermans, C., Vuylsteke, M., Coppens, F., Craciun, A., Inzé, D. und Verbruggen, N. (2010a). "Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes". *The New Phytologist* **187**: 119–131.
- Hermans, C., Vuylsteke, M., Coppens, F., Cristescu, S. M., Harren, F. J. M., Inzé, D. und Verbruggen, N. (2010b). "Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*". *The New Phytologist* **187**: 132–144.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L. und Franke, R. (2008). "The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis". *Journal of Experimental Botany* **59**: 2347–2360.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L. (1988). "Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation". *Nucleic Acids Research* **16**: 9877.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. und Tzagoloff, A. (1986). "Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites". *Yeast* **2**: 163–167.
- Hmiel, S. P., Snavelly, M. D., Miller, C. G. und Maguire, M. E. (1986). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene". *Journal of Bacteriology* **168**: 1444–1450.
- Hmiel, S. P., Snavelly, M. D., Florer, J. B., Maguire, M. E. und Miller, C. G. (1989). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci." *Journal of Bacteriology* **171**: 4742–4751.
- Horton, P., Park, K., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. und Nakai, K. (2007). "WoLF PSORT: Protein localization predictor". *Nucleic Acids Research* **35**: W585–W587.
- Hu, J., Sharma, M., Qin, H., Gao, F. P. und Cross, T. A. (2009). "Ligand binding in the conserved interhelical loop of CorA, a magnesium transporter from *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Biological Chemistry* **284**: 15619–15628.
- Huh, W., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. und O'Shea, E. K. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast". *Nature* **425**: 686–691.

- Igamberdiev, A. U. und Kleczkowski, L. A.** (2001). "Implications of adenylate kinase-governed equilibrium of adenylates on contents of free magnesium in plant cells and compartments". *The Biochemical Journal* **360**: 225–231.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Gene* **96**: 23–28.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. und Kobayashi, M.** (2007). "Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 9900–9905.
- Jach, G., Binot, E., Frings, S., Luxa, K. und Schell, J.** (2001). "Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression". *The Plant Journal* **28**: 483–491.
- Karimi, M., Inzé, D. und Depicker, A.** (2002). "GATEWAYTM vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation". *Trends in Plant Science* **7**: 193–195.
- Karley, A. J. und White, P. J.** (2009). "Moving cationic minerals to edible tissues: Potassium, magnesium, calcium". *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 291–298.
- Kassis, E. E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N. und Davidian, J.-C.** (2007). "Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity". *Plant Physiology* **143**: 1231–1241.
- Kehres, D. G., Lawyer, C. H. und Maguire, M. E.** (1998). "The CorA magnesium transporter gene family". *Microbial & Comparative Genomics* **3**: 151–169.
- Kehres, D. G. und Maguire, M. E.** (2002). "Structure, properties and regulation of magnesium transport proteins". *BioMetals* **15**: 261–270.
- Kern, A. L., Bonatto, D., Dias, J. F., Yoneama, M., Brendel, M. und Henriques, J. A. P.** (2005). "The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: Insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission". *BioMetals* **18**: 31–41.
- Khan, M. B., Sjöblom, B., Schweyen, R. J. und Djinović-Carugo, K.** (2010). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the N-terminal domain of Mrs2, a magnesium ion transporter from yeast inner mitochondrial membrane". *Acta Crystallographica* **66**: 658–661.
- Kirik, A., Pecinka, A., Wendeler, E. und Reiss, B.** (2006). "The chromatin assembly factor subunit FASCIATA1 is involved in homologous recombination in plants". *The Plant Cell* **18**: 2431–2442.
- Knoop, V., Groth-Malonek, M., Gebert, M., Eifler, K. und Weyand, K.** (2005). "Transport of magnesium and other divalent cations: Evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily". *Molecular Genetics and Genomics* **274**: 205–216.
- Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R. J. und Schweigel, M.** (2003). "Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria". *The EMBO Journal* **22**: 1235–1244.

- Koll, H., Schmidt, C., Wiesenberger, G. und Schmelzer, C.** (1987). "Three nuclear genes suppress a yeast mitochondrial splice defect when present in high copy number". *Current Genetics* **12**: 503–509.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). "The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector". *Molecular & General Genetics* **204**: 383–396.
- Kucharski, L. M., Lubbe, W. J. und Maguire, M. E.** (2000). "Cation hexaamines are selective and potent inhibitors of the CorA magnesium transport system". *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 16767–16773.
- Kuhn, A. J., Schröder, W. H. und Bauch, J.** (2000). "The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots". *Planta* **210**: 488–496.
- Kuramoto, T., Kuwamura, M., Tokuda, S., Izawa, T., Nakane, Y., Kitada, K., Akao, M., Guénet, J. und Serikawa, T.** (2011). "A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat". *PLoS Genetics* **7**: e1001262.
- Kwon, S. J., Choi, E. Y., Choi, Y. J., Ahn, J. H. und Park, O. K.** (2006). "Proteomics studies of post-translational modifications in plants". *Journal of Experimental Botany* **57**: 1547–1551.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**: 680–685.
- Lahner, B. et al.** (2003). "Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*". *Nature Biotechnology* **21**: 1215–1221.
- Lalonde, S. et al.** (2010). "A membrane protein/signaling protein interaction network for *Arabidopsis* version AMPv2". *Frontiers in Plant Physiology* **1**: 1–12.
- Lebaudy, A., Véry, A.-A. und Sentenac, H.** (2007). "K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions". *FEBS Letters* **581**: 2357–2366.
- Lee, J. und Gardner, R. C.** (2006). "Residues of the yeast ALR1 protein that are critical for magnesium uptake". *Current Genetics* **49**: 7–20.
- Lee, J.** (2005). "RNAi-Geninaktivierungen in einer Genfamilie von Magnesiumtransportern in *Arabidopsis thaliana*". Diplomarbeit. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Lenz, H.** (2007). "Überexpression der Mitglieder einer Genfamilie von Magnesiumtransportern in *Arabidopsis thaliana*". Diplomarbeit. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Li, L.-G., Tutone, A. F., Drummond, R. S. M., Gardner, R. C. und Luan, S.** (2001). "A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*". *The Plant Cell* **13**: 2761–2775.
- Li, L.-G., Kim, B.-G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K. und Luan, S.** (2006). "A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12625–12630.
- Li, L., Sokolov, L. N., Yang, Y., Li, D., Ting, J., Pandey, G. K. und Luan, S.** (2008). "A mitochondrial magnesium transporter functions in *Arabidopsis* pollen development". *Molecular Plant* **1**: 675–685.

- Lilley, K. S. und Dupree, P. (2007). "Plant organelle proteomics". *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 594–599.
- Liu, G. J., Martin, D. K., Gardner, R. C. und Ryan, P. R. (2002). "Large Mg^{2+} -dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiology Letters* **213**: 231–237.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method". *Methods* **25**: 402–408.
- Lunin, V. V., Dobrovetsky, E., Khutoreskaya, G., Zhang, R., Joachimiak, A., Doyle, D. A., Bochkarev, A., Maguire, M. E., Edwards, A. M. und Koth, C. M. (2006). "Crystal structure of the CorA Mg^{2+} transporter". *Nature* **440**: 833–837.
- Lusk, J. E., Williams, R. J. und Kennedy, E. P. (1968). "Magnesium and the growth of *Escherichia coli*". *The Journal of Biological Chemistry* **243**: 2618–2624.
- Maathuis, F. J. M. (2009). "Physiological functions of mineral macronutrients". *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 250–258.
- MacDiarmid, C. W. und Gardner, R. C. (1996). "Al toxicity in yeast. A role for Mg?" *Plant Physiology* **112**: 1101–1109.
- MacDiarmid, C. W. und Gardner, R. C. (1998). "Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion". *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 1727–1732.
- Maguire, M. E. (2006a). "The structure of CorA: A Mg^{2+} -selective channel". *Current Opinion in Structural Biology* **16**: 432–438.
- Maguire, M. E. (2006b). "Magnesium transporters: Properties, regulation and structure". *Frontiers in Bioscience* **11**: 3149–3163.
- Maguire, M. E. und Cowan, J. A. (2002). "Magnesium chemistry and biochemistry". *BioMetals* **15**: 203–210.
- Mao, D.-D., Tian, L.-F., Li, L.-G., Chen, J., Deng, P.-Y., Li, D.-P. und Luan, S. (2008). "*AtMGT7*: An *Arabidopsis* gene encoding a low-affinity magnesium transporter". *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1530–1538.
- Mariano, E. D. und Keltjens, W. G. (2005). "Long-term effects of aluminum exposure on nutrient uptake by maize genotypes differing in aluminum resistance". *Journal of Plant Nutrition* **28**: 323–333.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L. und Faure, J. (2008). "Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings". *The Plant Journal* **56**: 169–179.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants, Second Edition*. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.
- Merino, S., Gavín, R., Altarriba, M., Izquierdo, L., Maguire, M. E. und Tomás, J. M. (2001). "The MgtE Mg^{2+} transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence". *FEMS Microbiology Letters* **198**: 189–195.
- Meschenmoser, K. (2008). "Die AtMRS2-Genfamilie: Untersuchungen zur entwicklungs-/ gewebespezifischen Expression in *Arabidopsis thaliana* und Protein-Proteininteraktionsana-

lysen mit dem *mating based* Split-Ubiquitin-System in Hefe". Dissertation. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Michael, T. P. et al.** (2008). "Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules". *PLoS Genetics* **4**: e14.
- Millar, A. H., Carrie, C., Pogson, B. und Whelan, J.** (2009). "Exploring the function-location nexus: Using multiple lines of evidence in defining the subcellular location of plant proteins". *The Plant Cell* **21**: 1625–1631.
- Mitra, S. K., Walters, B. T., Clouse, S. D. und Goshe, M. B.** (2009). "An efficient organic solvent based extraction method for the proteomic analysis of *Arabidopsis* plasma membranes". *Journal of Proteome Research* **8**: 2752–2767.
- Miwa, K. und Fujiwara, T.** (2010). "Boron transport in plants: Co-ordinated regulation of transporters". *Annals of Botany* **105**: 1103–1108.
- Moncrief, M. B. und Maguire, M. E.** (1998). "Magnesium and the role of *MgtC* in growth of *Salmonella typhimurium*". *Infection and Immunity* **66**: 3802–3809.
- Moomaw, A. S. und Maguire, M. E.** (2008). "The unique nature of Mg^{2+} channels". *Physiology* **23**: 275–285.
- Moomaw, A. S. und Maguire, M. E.** (2010). "Cation selectivity by the CorA Mg^{2+} channel requires a fully hydrated cation". *Biochemistry* **49**: 5998–6008.
- Moore, I. und Murphy, A.** (2009). "Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system". *The Plant Cell* **21**: 1632–1636.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nawy, T., Lee, J.-Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., Birnbaum, K. und Benfey, P. N.** (2005). "Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center". *The Plant Cell* **17**: 1908–1925.
- Nebenführ, A. und Staehelin, L. A.** (2001). "Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells". *Trends in Plant Science* **6**: 160–167.
- Nelson, D. L. und Kennedy, E. P.** (1971). "Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion". *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 3042–3049.
- Nelson, D. L. und Kennedy, E. P.** (1972). "Transport of magnesium by a repressible and a non-repressible system in *Escherichia coli*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 1091–1093.
- Nühse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N. und Peck, S. C.** (2004). "Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database". *The Plant Cell* **16**: 2394–2405.
- Niegowski, D. und Eshaghi, S.** (2007). "The CorA family: Structure and function revisited". *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 2564–2574.
- Norén, H., Svensson, P. und Andersson, B.** (2004). "A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana*". *Physiologia Plantarum* **121**: 343–348.

- Obrdlik, P. et al.** (2004). "K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12242–12247.
- O'Connor, K., Fletcher, S. A. und Csonka, L. N.** (2009). "Increased expression of Mg²⁺ transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17522–17527.
- Papp, K. M. und Maguire, M. E.** (2004). "The CorA Mg²⁺ transporter does not transport Fe²⁺". *Journal of Bacteriology* **186**: 7653–7658.
- Park, M. H., Wong, B. B. und Lusk, J. E.** (1976). "Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: Genetics and physiology". *Journal of Bacteriology* **126**: 1096–1103.
- Payandeh, J. und Pai, E. F.** (2006). "A structural basis for Mg²⁺ homeostasis and the CorA translocation cycle". *The EMBO Journal* **25**: 3762–3773.
- Payandeh, J., Li, C., Ramjeesingh, M., Poduch, E., Bear, C. E. und Pai, E. F.** (2008). "Probing structure-function relationships and gating mechanisms in the CorA Mg²⁺ transport system". *Journal of Biological Chemistry* **283**: 11721–11733.
- Pei, Z. M., Ward, J. M. und Schroeder, J. I.** (1999). "Magnesium sensitizes slow vacuolar channels to physiological cytosolic calcium and inhibits fast vacuolar channels in fava bean guard cell vacuoles". *Plant Physiology* **121**: 977–986.
- Pisat, N. P., Pandey, A. und Macdiarmid, C. W.** (2009). "MNR2 regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* **183**: 873–884.
- Piskacek, M., Zotova, L., Zsurka, G. und Schweyen, R. J.** (2009). "Conditional knockdown of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg²⁺ uptake and cell death". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**: 693–700.
- Pottosin, I. I. und Schönknecht, G.** (2007). "Vacuolar calcium channels". *Journal of Experimental Botany* **58**: 1559–1569.
- Rengel, Z.** (1990). "Competitive Al³⁺ inhibition of net Mg²⁺ uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: II. Plant age effects". *Plant Physiology* **93**: 1261–1267.
- Rengel, Z. und Robinson, D. L.** (1989). "Competitive Al³⁺ inhibition of net Mg²⁺ uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: I. Kinetics". *Plant Physiology* **91**: 1407–1413.
- Romani, A. M. P. und Scarpa, A.** (1992). "Regulation of cell magnesium". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**: 1–12.
- Romani, A. M. P.** (2007). "Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **458**: 90–102.
- Romani, A. M. P. und Maguire, M. E.** (2002). "Hormonal regulation of Mg²⁺ transport and homeostasis in eukaryotic cells". *BioMetals* **15**: 271–283.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003). "An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics". *Plant Molecular Biology* **53**: 247–259.

- Rothstein, A., Hayes, A., Jennings, D. und Hooper, D.** (1958). "The active transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} into the yeast cell". *The Journal of General Physiology* **41**: 585–594.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987). "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees". *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Sauer, N. und Stadler, R.** (1993). "A sink-specific H^+ /monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: Cloning and heterologous expression in baker's yeast". *The Plant Journal* **4**: 601–610.
- Schägger, H. und Jagow, G. von** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Analytical Biochemistry* **166**: 368–379.
- Schindl, R., Weghuber, J., Romanin, C. und Schweyen, R. J.** (2007). "Mrs2p forms a high conductance Mg^{2+} selective channel in mitochondria". *Biophysical Journal* **93**: 3872–3883.
- Schmidt, U., Maue, I., Lehmann, K., Belcher, S. M., Stahl, U. und Perlman, P. S.** (1998). "Mutant alleles of the *MRS2* gene of yeast nuclear DNA suppress mutations in the catalytic core of a mitochondrial group II intron". *Journal of Molecular Biology* **282**: 525–541.
- Schmitz, J.** (2011). "Protein-Protein-Interaktionsstudien der MRS2 Magnesiumtransporter-Familie aus *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe des mbSUS in *Saccharomyces cerevisiae*". Diplomarbeit. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Schock, I., Gregan, J., Steinhauser, S., Schweyen, R. J., Brennicke, A. und 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.
- Schwacke, R., Schneider, A., Graaff, E. van der, Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I. und Kunze, R.** (2003). "ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins". *Plant Physiology* **131**: 16–26.
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K. und Krause, K.** (2007). "Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice". *Molecular Genetics and Genomics* **277**: 631–646.
- Shabala, S. und Hariadi, Y.** (2005). "Effects of magnesium availability on the activity of plasma membrane ion transporters and light-induced responses from broad bean leaf mesophyll". *Planta* **221**: 56–65.
- Shaul, O., Hilgemann, D. W., Almeida-Engler, J. de, Montagu, M. V., Inz, D. und Galili, G.** (1999). "Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^+ exchanger". *The EMBO Journal* **18**: 3973–3980.
- Shaul, O.** (2002). "Magnesium transport and function in plants: The tip of the iceberg". *BioMetals* **15**: 309–323.
- Shibagaki, N. und Grossman, A. R.** (2004). "Probing the function of STAS domains of the *Arabidopsis* sulfate transporters". *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 30791–30799.
- Silva, I. R., Smyth, T. J., Israel, D. W. und Ruffy, T. W.** (2001a). "Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium". *Plant and Soil* **230**: 223–230.

- Silva, I. R., Smyth, T. J., Israel, D. W., Raper, C. D. und Ruffy, T. W.** (2001b). "Magnesium is more efficient than calcium in alleviating aluminum rhizotoxicity in soybean and its ameliorative effect is not explained by the Gouy-Chapman-Stern model". *Plant and Cell Physiology* **42**: 538–545.
- Silva, I. R., Smyth, T. J., Israel, D. W., Raper, C. D. und Ruffy, T. W.** (2001c). "Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation by roots". *Plant and Cell Physiology* **42**: 546–554.
- Silver, S** (1969). "Active transport of magnesium in *Escherichia coli*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **62**: 764–771.
- Silver, S. und Clark, D.** (1971). "Magnesium Transport in *Escherichia coli*". *Journal of Biological Chemistry* **246**: 569–576.
- Smith, D. L., Tao, T. und Maguire, M. E.** (1993b). "Membrane topology of a p-type ATPase. The MgtB magnesium transport protein of *Salmonella typhimurium*." *Journal of Biological Chemistry* **268**: 22469–22479.
- Smith, R. L. und Maguire, M. E.** (1995). "Distribution of the CorA Mg²⁺ transport system in gram-negative bacteria". *Journal of Bacteriology* **177**: 1638–1640.
- Smith, R. L. und Maguire, M. E.** (1998). "Microbial magnesium transport: Unusual transporters searching for identity". *Molecular Microbiology* **28**: 217–226.
- Smith, R. L., Banks, J. L., Snively, M. D. und Maguire, M. E.** (1993a). "Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein". *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 14071–14080.
- Smith, R. L., Thompson, L. J. und Maguire, M. E.** (1995). "Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg²⁺ transporter from *Bacillus firmus* OF4". *Journal of Bacteriology* **177**: 1233–1238.
- Smith, R. L., Gottlieb, E., Kucharski, L. M. und Maguire, M. E.** (1998a). "Functional similarity between archaeal and bacterial CorA magnesium transporters". *Journal of Bacteriology* **180**: 2788–2791.
- Smith, R. L., Szegedy, M. A., Kucharski, L. M., Walker, C., Wiet, R. M., Redpath, A., Kaczmarek, M. T. und Maguire, M. E.** (1998b). "The CorA Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis of conserved residues in the third membrane domain identifies a Mg²⁺ pore". *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 28663–28669.
- Smith, R. L., Kaczmarek, M. T., Kucharski, L. M. und Maguire, M. E.** (1998c). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Regulation of MgtA and MgtCB during invasion of epithelial and macrophage cells". *Microbiology* **144**: 1835–1843.
- Snively, M. D., Florer, J. B., Miller, C. G. und Maguire, M. E.** (1989a). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Expression of cloned genes for three distinct Mg²⁺ transport systems". *Journal of Bacteriology* **171**: 4752–4760.
- Snively, M. D., Florer, J. B., Miller, C. G. und Maguire, M. E.** (1989b). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: ²⁸Mg²⁺ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems". *Journal of Bacteriology* **171**: 4761–4766.

- Snavey, M. D., Miller, C. G. und Maguire, M. E.** (1991a). "The *mgtB* Mg²⁺ transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase". *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 815–823.
- Snavey, M. D., Gravina, S. A., Cheung, T. T., Miller, C. G. und Maguire, M. E.** (1991b). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression". *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 824–829.
- Sperrazza, J. M. und Spremulli, L. L.** (1983). "Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: Influences on subunit association equilibria and ribosome activity". *Nucleic Acids Research* **11**: 2665–2679.
- Sponder, G., Svidová, S., Schindl, R., Wieser, S., Schweyen, R. J., Romanin, C., Froschauer, E. M. und Weghuber, J.** (2010). "Lpe10p modulates the activity of the Mrs2p-based yeast mitochondrial Mg²⁺ channel". *The FEBS Journal* **277**: 3514–3525.
- Sreedhara, A. und Cowan, J. A.** (2002). "Structural and catalytic roles for divalent magnesium in nucleic acid biochemistry". *BioMetals* **15**: 211–223.
- Sutter, J., Campanoni, P., Tyrrell, M. und Blatt, M. R.** (2006). "Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane". *The Plant Cell* **18**: 935–954.
- Svidová, S., Sponder, G., Schweyen, R. J. und Djinović-Carugo, K.** (2010). "Functional analysis of the conserved hydrophobic gate region of the magnesium transporter CorA". *Biochimica Et Biophysica Acta: im Druck*.
- Swinburne, J., Balcells, L., Scofield, S. R., Jones, J. D. und Coupland, G.** (1992). "Elevated levels of *Activator* transposase mRNA are associated with high frequencies of *Dissociation* excision in *Arabidopsis*". *The Plant Cell* **4**: 583–595.
- Szegedy, M. A. und Maguire, M. E.** (1999). "The CorA Mg²⁺ transport protein of *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis of conserved residues in the second membrane domain". *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36973–36979.
- Taiz, L. und Zeiger, E.** (2002). *Plant Physiology, Third Edition*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. und Kumar, S.** (2007). "MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0". *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596–1599.
- Tan, K., Sather, A., Robertson, J. L., Moy, S., Roux, B. und Joachimiak, A.** (2009). "Structure and electrostatic property of cytoplasmic domain of ZntB transporter". *Protein Science* **18**: 2043–2052.
- Tan, K., Keltjens, W. G. und Findenegg, G. R.** (1991). "Role of magnesium in combination with liming in alleviating acid-soil stress with the aluminium-sensitive sorghum genotype CV323". *Plant and Soil* **136**: 65–71.
- Tao, T., Snavey, M. D., Farr, S. G. und Maguire, M. E.** (1995). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg²⁺ in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase". *Journal of Bacteriology* **177**: 2654–2662.

- Tao, T., Grulich, P. F., Kucharski, L. M., Smith, R. L. und Maguire, M. E.** (1998). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Biphasic magnesium and time dependence of the transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci". *Microbiology* **144**: 655–664.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* **408**: 796–815.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N. und Fujiwara, T.** (2007). "An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18807–18812.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350–4354.
- Townsend, D. E., Esenwine, A. J., George, J., Bross, D., Maguire, M. E. und Smith, R. L.** (1995). "Cloning of the *mgtE* Mg²⁺ transporter from *Providencia stuartii* and the distribution of *mgtE* in gram-negative and gram-positive bacteria". *Journal of Bacteriology* **177**: 5350–5354.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. und Ogawa, H.** (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution". *Nature* **405**: 647–655.
- Turner, T. L., Bourne, E. C., Wettberg, E. J. V., Hu, T. T. und Nuzhdin, S. V.** (2010). "Population resequencing reveals local adaptation of *Arabidopsis lyrata* to serpentine soils". *Nature Genetics* **42**: 260–263.
- Tyrrell, M., Campanoni, P., Sutter, J., Pratelli, R., Paneque, M., Sokolovski, S. und Blatt, M. R.** (2007). "Selective targeting of plasma membrane and tonoplast traffic by inhibitory (dominant-negative) SNARE fragments". *The Plant Journal* **51**: 1099–1115.
- Véscovi, E. G., Ayala, Y. M., Di Cera, E. und Groisman, E. A.** (1997). "Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺". *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 1440–1443.
- Visscher, A. M., Paul, A.-L., Kirst, M., Guy, C. L., Schuerger, A. C. und Ferl, R. J.** (2010). "Growth performance and root transcriptome remodeling of *Arabidopsis* in response to Mars-like levels of magnesium sulfate". *PLoS One* **5**: e12348.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. und Baulcombe, D.** (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus". *The Plant Journal* **33**: 949–956.
- Wachek, M., Aichinger, M. C., Stadler, J. A., Schweyen, R. J. und Graschopf, A.** (2006). "Oligomerization of the Mg²⁺-transport proteins Alr1p and Alr2p in yeast plasma membrane". *The FEBS Journal* **273**: 4236–4249.
- Waldherr, M., Ragnini, A., Jank, B., Teply, R., Wiesenberger, G. und Schweyen, R. J.** (1993). "A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast". *Current Genetics* **24**: 301–306.

- Wang, S., Chen, Y., Sun, Z., Zhou, Q. und Sui, S.** (2006). "Escherichia coli CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate". *Journal of Biological Chemistry* **281**: 26813–26820.
- Warren, M. A., Kucharski, L. M., Veenstra, A., Shi, L., Grulich, P. F. und Maguire, M. E.** (2004). "The CorA Mg²⁺ transporter is a homotetramer". *Journal of Bacteriology* **186**: 4605–4612.
- Watanabe, T. und Okada, K.** (2005). "Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of rice cultivars under low pH". *Annals of Botany* **95**: 379–385.
- Waters, B. M. und Grusak, M. A.** (2008). "Quantitative trait locus mapping for seed mineral concentrations in two *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred populations". *The New Phytologist* **179**: 1033–1047.
- Weghuber, J., Dieterich, F., Froschauer, E. M., Svidová, S. und Schweyen, R. J.** (2006). "Mutational analysis of functional domains in Mrs2p, the mitochondrial Mg²⁺ channel protein of *Saccharomyces cerevisiae*". *The FEBS Journal* **273**: 1198–1209.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Weyand, K.** (2006). "Analysis of the AtMRS2 magnesium transporter family in *Arabidopsis thaliana* via gene-GFP fusions, heterologous complementations, and protein interaction studies". Dissertation. IZMB, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Whiteman, S.-A., Serazetdinova, L., Jones, A. M. E., Sanders, D., Rathjen, J., Peck, S. C. und Maathuis, F. J. M.** (2008). "Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*". *Proteomics* **8**: 3536–3547.
- Wiesenberger, G., Waldherr, M. und Schweyen, R. J.** (1992). "The nuclear gene MRS2 is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts *in vivo*". *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 6963–6969.
- Wiesenberger, G., Steinleitner, K., Malli, R., Graier, W. F., Vormann, J., Schweyen, R. J. und Stadler, J. A.** (2007). "Mg²⁺ deprivation elicits rapid Ca²⁺ uptake and activates Ca²⁺/calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell* **6**: 592–599.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. und Provart, N. J.** (2007). "An Electronic Fluorescent Pictograph browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets". *PLoS One* **2**: e718.
- Wolf, F. I. und Trapani, V.** (2009). "Multidrug resistance phenotypes and MRS2 mitochondrial magnesium channel: Two players from one stemness?" *Cancer Biology & Therapy* **8**: 615–617.
- Worlock, A. J. und Smith, R. L.** (2002). "ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Journal of Bacteriology* **184**: 4369–4373.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. und Oliver, D.** (1999). "A mini binary vector series for plant transformation". *Plant Molecular Biology* **40**: 711–717.

- Yamaji, N., Huang, C. F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y. und Ma, J. F.** (2009). "A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice". *The Plant Cell*: tpc.109.070771.
- Yeo, A. R. und Flowers, T. J.** (2007). *Plant Solute Transport*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Yuan, L., Loque, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H. und Wiren, N. von** (2007). "The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters". *The Plant Cell* **19**: 2636–2652.
- Yuan, L., Graff, L., Loqué, D., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., Takahashi, H. und Wirén, N. von** (2009). "AtAMT1;4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*". *Plant & Cell Physiology* **50**: 13–25.
- Zhu, Y., Davis, A., Smith, B. J., Curtis, J. und Handman, E.** (2009). "*Leishmania major* CorA-like magnesium transporters play a critical role in parasite development and virulence". *International Journal for Parasitology* **39**: 713–723.
- Zsurka, G., Gregáň, J. und Schweyen, R. J.** (2001). "The human mitochondrial Mrs2 Protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter". *Genomics* **72**: 158–168.
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. und Wijk, K. J. van** (2008). "Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome". *PloS One* **3**: e1994.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank **Prof. Dr. Volker Knoop** für die ausdauernde und umfassende Betreuung dieser hier vorliegenden Doktorarbeit sowie **Prof. Dr. Lukas Schreiber**, **Prof. Dr. Heiner Goldbach** und **Prof. Dr. Dieter Fürst** für die Begutachtung selbiger. Darüber hinaus meinen langjährigen Kollegen **Felix Grewe** und der unermüdlich engagierten **Monika Polska-kiewicz** für moralische und praktische Unterstützung. Ohne Euch wäre mir die Zeit in unserer Abteilung sicher nicht so kurzweilig vorgekommen. Ich danke **Johanna Schmitz**, **Daniel Serwas** und **Julia Dreistein** für ihre kompetente Hilfe bei der Durchführung wichtiger Experimente und die zuverlässige Erledigung allgemeiner Laborarbeiten. Allen bisher genannten und auch den anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Evolution, insbesondere **Henning Lenz**, **Mareike Rüdinger** und **Ute Volkmar**, danke ich für das freundliche und produktive Arbeitsklima, das ich sicher sehr vermissen werde.

Als junger Wissenschaftler ist man zum Glück nicht nur auf sich selbst gestellt sondern profitiert von den Arbeiten, Erfahrungen und Ideen anderer Forscher. Im Rahmen unserer Kooperation war **Soňa Svidová** (MFPL Wien, AG Schweyen) für die Durchführung der Hefekomplementationen und mag-fura 2 Messungen verantwortlich, hierfür ein herzliches Dankeschön. Außerdem möchte ich mich besonders bei **Dr. Karolin Eifler** (MPIPZ Köln/MFPL Wien, AG Bachmair) für das p19 Konstrukt und die Anregung zur Flüssigkultivierung von *Arabidopsis* sowie bei **Dr. Martina Beck**, **Dr. Boris Voigt** und **Claudia Heym** (IZMB Bonn, AG Menzel) für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie und das DsRED-ER Konstrukt bedanken. **Katrin Hesse** (IMBIO Bonn, AG Bartels) danke ich für die fachkundige Unterstützung von Julia Dreistein bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Wissenschaft und Forschung sind nur das halbe Leben, deshalb danke ich **Katrin Weyand**, **Karolin Eifler** und **Kai Schröder** sowie den zahlreichen anderen Freunden und Bekannten aus Bonn für ihren nicht zu unterschätzenden Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit. Insbesondere Katrin und Karo haben durch ihre ausführlichen Korrekturen, endlose Geduld und gutes Zureden vieles von dem hier überhaupt erst möglich gemacht. Nicht zuletzt gebührt das vielleicht größte Dankeschön meiner Familie, insbesondere meinen **Eltern** und **Großeltern**, durch deren Förderung und Unterstützung ich letztendlich einen Kindheitstraum verwirklichen konnte.