

Funktionelle Charakterisierung von Peptid- und Aminosäuretransportern in Leguminosen und Gerste in Relation zur Proteinakkumulation im Samen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christiane Seiler

geb. am 09.02.1980 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Wobus
2. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
3. Prof. Dr. Thomas Roitsch

Halle (Saale), den 25.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014152

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014152>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Die Bedeutung von Stickstoff für die Pflanzenentwicklung.....	- 1 -
1.2 Samenentwicklung in Leguminosen und Gerste	- 1 -
1.3 Stickstoffremobilisierung und Samenspeicherproteinakkumulation in Leguminosen	- 4 -
1.4 Aminosäure- und Peptidtransport in Pflanzen	- 6 -
1.5 Pflanzliche Aminosäuretransporter.....	- 7 -
1.6 Pflanzliche Peptidtransporter	- 8 -
1.7 N-Transporter aus Leguminosen (<i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i>) und Gerste	- 9 -
1.7.1 Aminosäuretransporter	- 9 -
1.7.2 Peptidtransporter	- 11 -
1.8 Funktionen von GABA in Pflanzen	- 12 -
1.9 Stickstoffmetabolismus und Seneszenz	- 13 -
1.10 Zielstellung der Arbeit.....	- 14 -
2 Material und Methoden	- 16 -
2.1 Material.....	- 16 -
2.1.1 Bakterienstämme.....	- 16 -
2.1.2 Hefestämme	- 16 -
2.1.3 Pflanzenmaterial.....	- 17 -
2.1.4 Plasmide und Vektoren	- 17 -
2.1.5 Oligonukleotide.....	- 17 -
2.1.6 Medien.....	- 20 -
2.1.7 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	- 21 -
2.1.8 Speziallabormaterial	- 22 -
2.1.9 Enzyme und Antikörper	- 22 -
2.1.10 Geräte und Apparaturen.....	- 23 -
2.1.11 Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme.....	- 24 -
2.2 Methoden	- 25 -
2.2.1 Klonierung und Sequenzierung	- 25 -

2.2.2 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 26 -
2.2.3 Pflanzentransformation und Selektion.....	- 26 -
2.2.4 Pflanzenanzucht und Materialentnahme	- 28 -
2.2.5 Kreuzung von Erbsenpflanzen	- 29 -
2.2.6 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot.....	- 29 -
2.2.7 RNA-Isolierung und Northern Blot.....	- 30 -
2.2.8 Transiente Expression von Reporterfusionen in Protoplasten	- 30 -
2.2.9 Genome Walking.....	- 31 -
2.2.10 Quantitative real-time (qRT) PCR.....	- 32 -
2.2.11 Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen	- 33 -
2.2.12 Inhaltsstoffanalyse von sich entwickelnden und reifen Samen	- 33 -
2.2.13 Arbeiten mit Hefe.....	- 35 -
2.2.14 Herstellung und Reinigung polyklonaler Peptidantikörper.....	- 37 -
2.2.15 Proteinbiochemische Methoden	- 38 -
2.2.16 Mikroskopische Techniken	- 39 -
2.2.17 Statistische Auswertungen	- 42 -
3 Ergebnisse.....	- 43 -
3.1 N-Transporter aus Leguminosen.....	- 43 -
3.1.1 Regulatorische Regionen und Expression des Peptidtransporters <i>VfPTR1</i>	- 43 -
3.1.2 Analyse der <i>VfPTR1</i> -Promotoraktivität mittels Promotor/GUS- und Promotor/GFP-Fusionen in <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Pisum sativum</i>	- 49 -
3.1.3 Intrazelluläre Lokalisierung von <i>VfPTR1</i>	- 53 -
3.1.4 Phloemspezifische Expression der Aminosäurepermease <i>VfAAP1</i> und des Peptidtransporters <i>VfPTR1</i> in <i>P. sativum</i>	- 62 -
3.1.5 Kreuzung zweier <i>VfAAP1</i> Erbsenlinien	- 73 -
3.2 Aminosäuretransporter aus Gerste	- 81 -
3.2.1 Identifizierung putativer Aminosäuretransporter aus einer Gersten-EST-Kollektion -	81 -
3.2.2 <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i> sind funktionelle Mitglieder der AAP-Familie.....	- 85 -
3.2.3 Expression der Gersten-AAPs in vegetativen Geweben und während der Kornentwicklung	- 88 -
3.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung von <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i>	- 90 -
3.2.5 <i>HvGAP1</i> – eine putative GABA-Permease aus Gerste	- 94 -

4 Diskussion	- 102 -
4.1 N-Transporter aus Leguminosen.....	- 102 -
4.1.1 Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1	- 102 -
4.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1	- 105 -
4.1.3 Phloemspezifische Expression von <i>VfAAP1</i> und <i>VfPTR1</i> in <i>P. sativum</i>	- 108 -
4.1.4 Kreuzung einer sucAAP- mit einer LeB4AAP-Erbselinie	- 111 -
4.2 Aminosäuretransporter aus Gerste	- 113 -
4.2.1 HvAAP1 und HvAAP2 sind funktionelle Aminosäuretransporter	- 113 -
4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung und Expression von HvAAP1 und HvAAP2 – eine mögliche Rolle bei der Seneszenz	- 115 -
4.2.3 Identifizierung einer putativen GABA-Permease	- 119 -
4.3 Weiterführende Arbeiten	- 121 -
4.3.1 Leguminosen-Transporter	- 121 -
4.3.2 Gerste-Transporter	- 122 -
5 Zusammenfassung.....	- 124 -
5.1 Leguminosen-Transporter	- 124 -
5.2 Gerste-Transporter	- 125 -
6 Literaturverzeichnis	- 127 -
A Anhang	- 139 -

Abkürzungsverzeichnis

AAP	Aminosäurepermease
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AP	alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cv	Kultivar
2,4D	2,4-dichlorophenoxyessigsäure
Da	Dalton
DAF	„days after flowering“, Tage nach der Blüte
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, Enzymimmuntest
ER	endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HRP	horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalacto-pyranosid
k	kilo
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanine“, aus der marinen Schnecke <i>Megathura crenulata</i> gewonnenes Mollusken-Hämocyanin
L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
μ	mikro
m	Meter, milli
M	Molarität (Mol/Liter)
min	Minute

MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Scoog Basalmedium
MW	relatives Molekulargewicht
n	nano
N	Stickstoff
NHS	N-hydroxysuccinimid
ocs	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered saline“
PBST	PBS mit 0,05% Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
PPT	Phosphinotricin
<i>Ps</i>	<i>Pisum sativum</i>
PTR	Peptidtransporter
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription PCR
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Spec ^r	Spectinomycinresistenz
T ₀	Transgen-Generation 0 (Primärtransformanden)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	„unit“, Einheit der Enzymaktivität
ü/N	über Nacht
V	Volt
<i>Vf</i>	<i>Vicia faba</i>
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
YNB	„Yeast Nitrogen Base“
z.B.	zum Beispiel