

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Stickstoff für die Pflanzenentwicklung

Stickstoff (N) ist ein essentieller Bestandteil der meisten pflanzlichen Moleküle (z. B. Proteine, Nukleinsäuren, Chlorophyll, Hormone), die Aufnahme und der Transport von N sind wichtig für Pflanzenentwicklung und -wachstum. Stickstoff stellt daher für die Pflanze einen limitierenden Nährstoff aus dem Boden dar, der das Pflanzenwachstum begrenzt (Frommer et al., 1994). Die Hauptstickstoffquellen im Boden sind Nitrat, Ammonium und in geringerem Maß Aminosäuren. Nach der Transporter-vermittelten Aufnahme dieser Stoffe aus dem Boden über die Wurzel wird der anorganische Stickstoff in einem energieabhängigen Prozess in Aminosäuren umgewandelt. Die Ammoniumassimilation findet dabei in Wurzeln, die Nitratassimilation je nach Spezies und Umweltbedingungen in Wurzeln oder Blättern statt. Nitrat wird im Zytosol der Mesophyll- oder Wurzelzellen durch die dort vorhandene Nitrat-Reduktase zunächst zu Nitrit und dann durch die Nitrit-Reduktase der Chloroplasten bzw. Leukoplasten weiter zu NH_4^+ reduziert. Durch Aufnahme in die Vakuole können große Mengen Nitrat im Blatt gespeichert werden. Die Assimilation von Ammonium, welches aus der Nitratreduktion und Photorespiration stammt, ist vom plastidären GS/GOGAT-Zyklus abhängig (Weber and Flügge, 2002). Reduzierter Stickstoff wird hauptsächlich in Form von Aminosäuren, Amiden und Ureiden im Leitsystem der Pflanze transportiert. Der Transport von Aminosäuren zu den Blättern erfolgt hauptsächlich im Xylem, ihre Verteilung ausgehend von den Blättern in Gewebe, die nicht an der N-Assimilation teilnehmen, im Phloem (Frommer et al., 1994). Reduzierter Stickstoff kann in vegetativen Organen oder im Speichergewebe der Samen akkumuliert werden. Der gespeicherte Stickstoff dient der Versorgung der nächsten Generation und wird während der Pflanzenentwicklung innerhalb der Pflanze verteilt. Wichtige Exportquellen sind Wurzeln und Blätter während der Pflanzenentwicklung bzw. Endosperm und Kotyledonen während der Keimung.

1.2 Samenentwicklung in Leguminosen und Gerste

Wachsende Leguminosen- und Gerstensamen sind heterogene, hoch organisierte Systeme, die aus dem maternalen Samengewebe (Samenschale bei Leguminosen, Perikarp bei Gerste) sowie dem filialen Embryo und Endosperm bestehen. Die Samenentwicklung weist bei den dikotylen Leguminosen und der monokotylen Gerste einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede auf. Ein wesentlicher Unterschied ist das Speicherorgan. Während

Leguminosen Nährstoffe im Embryo speichern, ist bei Gerste das Endosperm das Hauptspeicherorgan. Zusätzlich liegt ein genetischer Unterschied vor. Der Leguminosen-Embryo ist diploid und das Gerste-Endosperm triploid mit einem 2:1-Verhältnis von maternalem zu paternalem Genom. Verschieden sind auch die Speicherstoffe. Während der Samenentwicklung werden im Embryo von Leguminosen vorwiegend Proteine, aber auch Stärke und Lipide gespeichert. Das Endosperm der Gerste ist spezialisiert auf die Einlagerung von Stärke, Proteine stellen einen wesentlich geringeren Anteil der Speicherstoffe dar. Außerdem ist die Speicherung von Stärke und Proteinen bei Gerste räumlich voneinander getrennt. Stärke wird im Endosperm gespeichert, Proteine akkumulieren im Endosperm und Aleuron. Das Aleuron, welches von den äußeren Zellreihen des Endosperms gebildet wird, speichert ausschließlich Proteine.

Für *Vicia faba* wurden sieben Stadien der Samenentwicklung beschrieben (Borisjuk et al., 1995). In den Stadien I-III finden Organogenese und Morphogenese statt, in den Stadien IV-VII die Differenzierung zu Speichergeweben und die Speicherstoffakkumulation. Junge Kotyledonen (Phase I bis IV) sind mitotisch sehr aktiv, in der folgenden Phase V (Transitionsphase) sind die inneren Zellen vor allem durch Streckungswachstum gekennzeichnet, während sich die äußeren noch weiter teilen. Stadium VI stellt die Hauptspeicherphase dar und in Phase VII erreichen die Kotyledonen ihre physiologische Reife, in der Zellstreckung und Speicheraktivität zunächst in der Mitte und dann graduell in den äußeren Regionen aufhören.

In Gerste ist die Endosperm-Entwicklung ebenso durch aufeinander folgende Entwicklungsstadien charakterisiert (Weschke et al., 2003; Weschke et al., 2000). Ungefähr am 3. Tag nach der Blüte (DAF, days after flowering) beginnt die Zellularisierung des Stärkeendosperms, diese ist am 4. DAF abgeschlossen. Diese Vorspeicherphase ist durch Zellteilungen und die Abwesenheit von Stärke im Endosperm gekennzeichnet. In den Tagen 5-8 erfolgt die Umschaltung von der mitotischen in die Speicherphase (Intermediär- oder Transitionsphase der Karyopse), und die Stärkeeinlagerung im Endosperm beginnt (6. DAF). In den Tagen 9-15 nach der Blüte werden große Mengen an Stärke akkumuliert. Die Aleuronzellen speichern keine Stärke, initiieren aber die Proteinakkumulation ungefähr ab dem 9. DAF.

Neben den genannten Unterschieden in der Samenentwicklung gibt es auch Gemeinsamkeiten. Die Samenentwicklung beginnt sowohl bei Leguminosen als auch bei Gerste in den maternalen Geweben gefolgt von den filialen Samenteilen, die sich zu hoch spezialisierten Speicherorganen entwickeln (Borisjuk et al., 2004; Weber et al., 2005). Die Differenzierung der Speichergewebe erfolgt sowohl bei Leguminosen als auch bei Gerste wellenartig, d.h. in den reifenden Geweben entstehen Entwicklungsgradienten. Ein komplexes regulatorisches Netzwerk löst die Samenreifung und die Akkumulation von

Speicherprodukten aus. Darin eingeschlossen ist ein Umschalten auf transkriptioneller und physiologischer Ebene, welches durch zucker- und hormongesteuerte Stoffwechselwege vermittelt wird (Gibson, 2004; Wobus and Weber, 1999).

Generell kann die Samenentwicklung in drei Stadien unterteilt werden: Zellteilungs- oder Vorspeicherphase, Speicherphase und Austrocknungsphase. Die frühe Samenentwicklung wird hauptsächlich maternal kontrolliert (Weber et al., 2005). Zwischen den ersten beiden Stadien liegt die Transitionsphase, in der hormonelle, transkriptionelle und metabolische Regulationsprozesse von maternaler auf filiale Kontrolle umgeschaltet werden. Die Transitionsphase ist begleitet von Differenzierungsprozessen in den filialen Samenteilen und gekennzeichnet durch eine *lag*-Phase in der Wachstumskurve der Samen. Die Abb. 1.1 zeigt typische Phasen der Samenentwicklung.

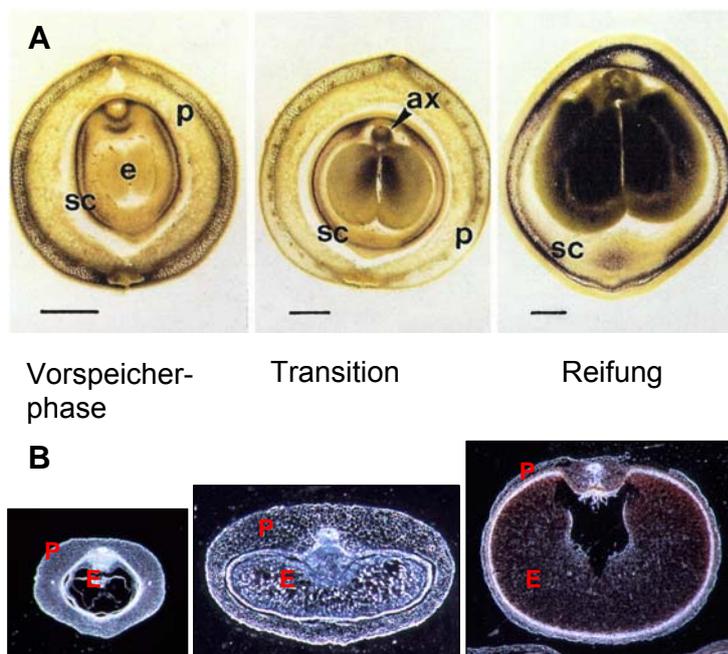


Abb. 1.1: Stadien der Samenentwicklung von *V. faba* (A, Stärkefärbung) bzw. *H. vulgare* (B). Gezeigt sind Querschnitte der Samen. p: pod (Hülle), sc: Samenschale, e: Embryo, ax: Embryoachse, P: Perikarp, E: Endosperm. Aus (Borisiuk et al., 2004).

In der Transitionsphase werden die sogenannten Transferzellen funktionell. Transferzellen sind durch sekundäre Zellwandeinwüchse charakterisiert. Dadurch entsteht eine vergrößerte Plasmamembran-Oberfläche, die einen verstärkten Assimilattransport gewährleistet (Offler et al., 2003). Die Transferzellen bilden sich bei Gerste in den äußeren Zellreihen des Endosperms gegenüber der nuzellaren Projektion der Karyopse (Weschke et al., 2000). Bei *V. faba* werden die Transferzellen in der abaxialen Epidermis gebildet (Offler et al., 1997; Weber et al., 1997b). Transferzellen sind gekennzeichnet durch die Expression von Transportproteinen, z.B. Saccharosetransportern (Weber et al., 1997b; Weschke et al., 2000). In der Transitionsphase nehmen die Speichergewebe von Leguminosen und Gerste verstärkt Saccharose auf. Außerdem setzen Zellexpansion und die Expression von Speicherungs-assoziierten Genen ein. Alle genannten Entwicklungsprozesse unterliegen

auch der metabolischen Kontrolle, wobei Saccharose eine wichtige Funktion vor allem als Nährstoff hat. Saccharose wird während der Samenentwicklung importiert und der Saccharose-Abbau in den maternalen Geweben, gekoppelt an die Expression von Zellwandinvertasen, ist wichtig für die frühe Entwicklung (Weber et al., 1997a; Weschke et al., 2003). Der aus dem Saccharose-Abbau resultierende hohe Hexosestatus in den filialen Geweben ist mit Wachstum und Zellteilung verknüpft. Nach der Herunterregulation der Invertase-Transkription wird die Speicher- bzw. Reifungsphase initiiert, in der ein aktives Saccharosetransportsystem aufgebaut wird. Ein Marker für die Samenreifung ist die Expression von Genen, die für Speicherproteine codieren.

Die Arbeitsgruppe Genwirkung beschäftigt sich mit der Samenentwicklung von mono- und dikotylen Kulturpflanzen am Beispiel von Gerste und Leguminosen mit dem Ziel, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen diesen beiden Kulturpflanzen hinsichtlich der Samenentwicklung herauszustellen und zu analysieren. Ziel ist es zu verstehen, wie die Samenentwicklung mit Wachstum, Transportprozessen und der Kontrolle von Stoffwechselwegen verknüpft ist.

1.3 Stickstoffremobilisierung und Samenspeicherproteinakkumulation in Leguminosen

Leguminosen nehmen Stickstoff zu Beginn ihrer Entwicklung vorwiegend aus dem Boden auf. Die N-Fixierung aus der Luft beginnt erst später mit der Knöllchenbildung und ist während der frühen Samenfüllung am höchsten (Sagan et al., 1993). Mit fortlaufender Samenentwicklung nehmen sowohl N-Assimilierung als auch N-Fixierung ab. Da die sich füllenden Samen ein starkes *sink* für Stickstoff darstellen, reicht der aufgenommene N nicht für den hohen Bedarf aus. Daher setzt zum Ende der Wachstumsphase die Remobilisierung von Reserven aus den vegetativen Organen, vor allem der Blätter und Stängel, ein (Salon et al., 2001). Dabei stammt der meiste N aus dem enzymatischen Abbau von Proteinen, an dem verschiedene Peptidasen beteiligt sind. Die daraus entstehenden Aminosäuren werden über das Phloem exportiert. Die Akkumulation von Speicherproteinen im Samen wird von der N-Verfügbarkeit während der Samenfüllung beeinflusst. So steigen die N-Akkumulation und N-Konzentration in Kotyledonen von isolierten Soja-Embryonen proportional mit der N-Konzentration im Medium an (Balconi et al., 1991; Barratt, 1982; Lhullier-Soundélé et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass samenlokalisierte N-Aufnahme und N-Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen. (Rolletschek et al., 2005) konnten zeigen, dass die Überexpression von *VfAAP1* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors in *P. sativum* und *V. narbonensis* eine größere Aufnahmekapazität für Aminosäuren bewirkt und

zu höheren Samenspeicherproteingehalten führt. Ein hoher Proteingehalt ist im Allgemeinen mit einer verspäteten Blattseneszenz sowie einer längeren Photosyntheseperiode und N-Akkumulation verbunden. So wurde bei bestimmten Mais- und Sojasorten eine längere N-Aufnahmephase während der Samenfüllung festgestellt (Kumudini et al., 2002). Darüber hinaus wurden in Maisgenotypen mit erhöhtem Samenproteingehalt mehr N-Assimilate in den Blättern nachgewiesen (Lohaus et al., 1998; Lohaus and Moellers, 2000). Die Proteinakkumulation im Samen wird aber auch über die N-Verfügbarkeit in der gesamten Pflanze reguliert. Diese ist wiederum von der N-Aufnahme aus dem Boden, der N-Assimilation in der Pflanze, der Fixierung von Luftstickstoff innerhalb der Knöllchen und von der N-Remobilisierung aus den vegetativen Organen während der Samenfüllung abhängig. Der größte N-Anteil, der in die Samen gelangt, stammt dabei aus der Remobilisierung. Aminosäure- und Peptidtransporter spielen offensichtlich für die Remobilisierung von Reserven und deren Translokation innerhalb der Pflanze eine wichtige Rolle. Mögliche Strategien zur Erhöhung der Samenproteingehalte wären die Erhöhung der Samen-*sink*-Stärke, aber auch die effektivere Gestaltung von N-Akquisition und N-Remobilisierung.

Der Samenproteingehalt variiert zwischen 20 % und 40 % des Trockengewichts bei den verschiedenen Leguminosen (Shewry et al., 1995). Die Samen von Leguminosen stellen somit eine wichtige Proteinquelle dar. Erbsen werden in Europa aufgrund ihres Proteingehaltes vor allem für die tierische Ernährung angebaut. Verbesserungen der Proteinmenge und -qualität sind folglich wünschenswert. Der Proteingehalt von Erbsensamen liegt je nach Sorte und Umweltbedingungen zwischen 20 % und 25 %. Diese Proteine stellen einen Speicher für Aminosäuren dar, die dann während der Keimung benötigt werden. Samenspeicherproteine werden in großen Mengen in speziellen Geweben und in bestimmten Entwicklungsstadien synthetisiert. In reifen Samen werden sie in sogenannten Proteinkörperchen gespeichert. Die Speicherproteine werden aufgrund ihrer Löslichkeit in Wasser (Albumine), verdünnter Salzlösung (Globuline), Alkohol/Wasser-Gemisch (Prolamine) bzw. verdünnter Säure oder Base (Gluteline) in verschiedene Gruppen unterteilt. Bei Leguminosen sind Globuline und Albumine die am häufigsten vorkommenden Speicherproteine, wobei Globuline in etwa 3 x höheren Mengen vorkommen als Albumine. Die Globuline wiederum werden aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten in den 7S Vicillin- und den 11S Legumintyp untergliedert. Globuline enthalten nur sehr geringe Mengen der essentiellen Aminosäuren Cystein und Methionin (Shewry et al., 1995). Daher wird angestrebt den Anteil dieser AS zu erhöhen, um die Proteinqualität zu erhöhen. Albumine werden wegen ihres Sedimentationskoeffizienten von ca. 2 als eigene Gruppe beschrieben (Youle and Huang, 1981).

1.4 Aminosäure- und Peptidtransport in Pflanzen

Aminosäuren (As) stellen wahrscheinlich die prinzipielle Langstreckentransportform für organischen Stickstoff dar (Lalonde et al., 2004). Die Konzentration proteinogener As im Phloem liegt bei ungefähr 100-200 mM und im Xylem bei etwa 10-20 mM. Dabei überwiegen Amine (Glutamin, Asparagin) und saure As (Glutamat, Aspartat). Aus dem Boden werden vor allem Nitrat und Ammonium, aber auch As in die Wurzeln aufgenommen. As werden über aktive Systeme aufgenommen und anschließend über das Xylem exportiert. Die Verteilung der As ausgehend von den Blättern und der Import in die Samen erfolgt jedoch über das Phloem; d.h. es ist ein Xylem-Phloem-Transfer notwendig (Frommer et al., 1994). Dazu werden die Aminosäuren von der Plasmamembran der Geleitzellen in die Zellwand freigesetzt und anschließend über einen protonengekoppelten Symport in das Phloem transportiert. Dieser Prozess wird von einer H^+ -ATPase in der Plasmamembran energetisiert. In Pflanzenwurzeln sind verschiedene Transportsysteme an der Aufnahme von As, ihrer Mobilisierung aus den Wurzeln ins Xylem, der Phloementladung zurück in die Wurzeln und möglicherweise an einem direkten Transfer zwischen Phloem und Xylem beteiligt. In Blättern sind zwei Systeme für eine Phloembeladung notwendig und eventuell ein zusätzliches für die As-Aufnahme aus dem Xylem. Auch Samen als *sink*-Organe benötigen mindestens zwei Transportsysteme, eines im maternalen Gewebe für die Entladung von As aus dem Phloem und eines für die Aufnahme in den sich entwickelnden Embryo, da dieser symplastisch vom maternalen Gewebe isoliert ist (Frommer et al., 1994).

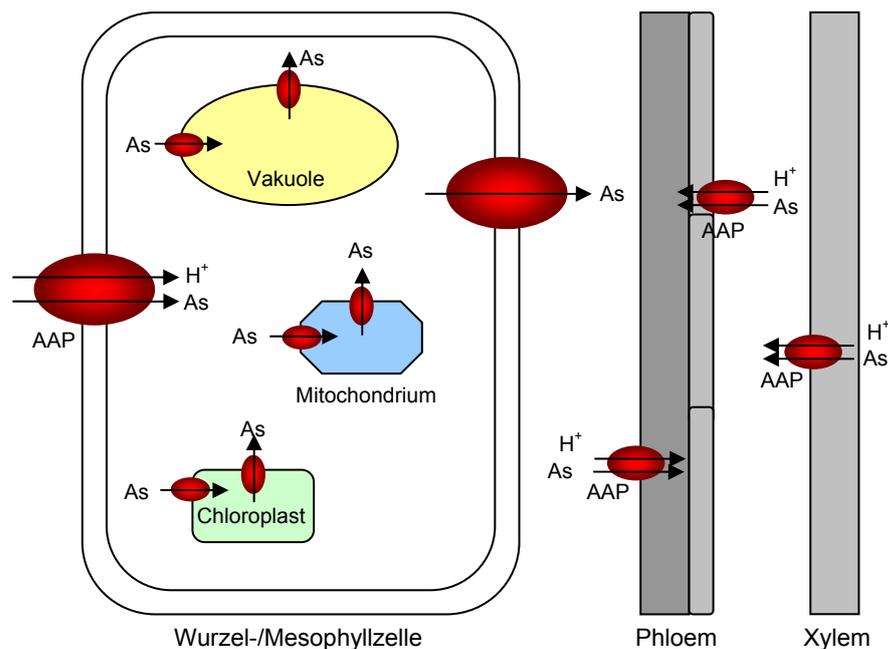


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von Aminosäuretransportern in pflanzlichen Zellen und ihre Funktion bei der Phloembe- und -entladung. As: Aminosäure, AAP: Aminosäurepermease

Neben Aminosäuren werden auch Peptide mit 2-6 Aminosäuren aktiv von pflanzlichen Zellen über Membranen transportiert. Peptidtransport wird oft assoziiert mit Geweben, in denen eine rasche Proteinhydrolyse stattfindet, so z.B. in keimenden Samen oder seneszierenden Blättern (Higgins and Payne, 1982). In Gerste werden Peptide aus der Samenproteinhydrolyse während der Keimung vom Endosperm über das Scutellum, ein modifiziertes Kotyledo, in den Embryo transportiert (Ranki et al., 1994). Die Hydrolyse der Peptide erfolgt innerhalb der Zelle durch Peptidasen, die daraus entstehenden Aminosäuren können für die Proteinsynthese oder als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle verwendet werden (Steiner et al., 1995). Eine weitere Funktion des Peptidtransports könnte eine Schutzfunktion sein, die Aminosäuren vor Abbau durch bestimmte Enzyme im Phloem schützt (Higgins and Payne, 1980). Peptidtransportsysteme könnten außerdem am Transport von Peptid-Hormonkonjugaten über Zellmembranen beteiligt sein (Higgins and Payne, 1982). Diese Konjugate kommen beispielsweise im Leitgewebe und Endosperm vor.

1.5 Pflanzliche Aminosäuretransporter

Bereits seit den 1970er Jahren wird für die Aminosäureaufnahme bei Pflanzen ein Carrier-vermittelter Mechanismus vermutet, da dieser Prozess energieabhängig ist. Verschiedene Forschergruppen schlugen entweder nur ein Transportsystem für alle Aminosäuren vor (Barran and Singh, 1982; Cheruel et al., 1979; McDaniel et al., 1982; Robinson and Beevers, 1981) oder aber mehrere unabhängige Systeme (Berlin and Mutert, 1978; Harrington and Henke, 1981; Soldal and Nissen, 1978). Ein Wasserstoffprotonengradient stellt dabei die Energiequelle für den Transport dar (Reinhold & Kaplan, 1984). Der Eintransport der Aminosäuren ist an einen H^+ -Einstrom über ein Transportsystem gekoppelt, welches sowohl Aminosäuren als auch die Protonen bindet. Der Ionengradient wird durch eine ATPase in der Plasmamembran aufgebaut. 1993 wurde parallel von zwei Gruppen der erste Aminosäuretransporter aus Arabidopsis durch funktionelle Komplementation einer Hefemutante kloniert (Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993). Da der als AAP1 (amino acid permease 1) bezeichnete Transporter nicht alle Aminosäuren transportierte, wurde darauf geschlossen, dass noch mehr Aminosäuretransporter existieren müssen. Die Komplementation einer Hefemutante mit Defekten in verschiedenen Aufnahmesystemen für Aminosäuren erlaubte schließlich die Isolierung verschiedener pflanzlicher Aminosäuretransporter-cDNAs. So wurden nachfolgend AAP2 (Kwart et al., 1993), AAP3-5 (Fischer et al., 1995) und AAP6-8 (Okumoto et al., 2002) identifiziert. Die AAP-Familie von Aminosäuretransportern besteht insgesamt aus 8 Mitgliedern in Arabidopsis, die aber im Hefesystem nicht alle funktionell sind. Die AAPs zeigen ein ähnliches Substratspektrum, sie

sind aber dennoch nicht redundant, da sie in verschiedenen Zelltypen und entwicklungspezifisch exprimiert werden.

Im Genom von Arabidopsis gibt es ca. 53 putative Aminosäuretransporter-Gene, bei Reis ca. 59. Diese lassen sich in zwei Überfamilien gliedern, die APC-Familie (*amino acid-polyamine-choline transporter*) und die ATF-Familie (*amino acid transporter family*) (Fischer et al., 1998; Wipf et al., 2002). Zur APC-Familie gehören Aminosäuretransporter mit 12-14 Transmembrandomänen, die in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Die ATF-Familie wurde zuerst in Pflanzen beschrieben, später aber auch in Hefe und im tierischen System gefunden. Deren Mitglieder besitzen 9-11 Transmembrandomänen mit einem zytosolischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus. Es gibt sechs Unterfamilien. In der Tabelle 1.1 sind die beiden Hauptfamilien ATF und APC sowie deren Unterfamilien aufgelistet. AAPs werden bevorzugt im Leitgewebe exprimiert. Prolintransporter transportieren Prolin, Betain und GABA und akkumulieren besonders unter Salzstress.

APC (Aminosäure/Polyamin/Cholin Transporter)	ATF (Aminosäuretransporter)
CAT (kationische Aminosäuretransporter)	AAP (Aminosäurepermeasen)
LAT (L-Typ Aminosäuretransporter)	LHT (Lysin-Histidin-Transporter)
GAP (GABA-Permeasen)	ProT (Prolintransporter)
	GAT (GABA-Transporter)
	AUX (Auxin-Transporter)
	ANT (neutrale AS-Transporter)

Tab. 1.1: Übersicht der Hauptfamilien pflanzlicher Aminosäuretransporter.

1.6 Pflanzliche Peptidtransporter

Pflanzliche Peptidtransporter werden in zwei Familien unterteilt, die Peptidtransporterfamilie (PTR) und die Oligopeptidtransporter (OPT). Im Genom von Arabidopsis wurden etwa 10x mehr Peptidtransporter vorhergesagt als in allen anderen bisher sequenzierten Organismen (Pro- und Eukaryonten), gibt es 51 putative PTR-Gene und 9 OPT-Gene (Stacey et al., 2002). Bei Reis sind es sogar 80 Gene, die der PTR-Familie angehören (Tsay et al., 2007). Peptidtransporter scheinen demzufolge eine wichtige Rolle während Pflanzenentwicklung und Pflanzenwachstum zu spielen.

Hydropathy-Diagramme der PTR-Mitglieder schlagen eine Struktur mit 12 möglichen Transmembrandomänen und einem für PTR-Proteine charakteristischen Aminosäuresequenzmotiv „FING“ (FYxxINxGSL) im vierten oder fünften hydrophoben Segment vor (Steiner et al., 1995). Dieses Motiv scheint für den Peptidtransport notwendig

zu sein, denn Mutationen des konservierten Tyrosin (Y167) im menschlichen Peptidtransporter hPepT1 (PTR-Familie) führen zum vollständigen Verlust dessen Aktivität (Yeung et al., 1995). Die bisher funktionell charakterisierten PTRs transportieren vor allem Di- und Tripeptide, aber auch Aminosäuren und Nitrat. Die ersten charakterisierten pflanzlichen Peptidtransporter waren CHL1, ein Nitrattransporter aus Arabidopsis (Huang et al., 1996) und AtPTR2B (Rentsch et al., 1995; Song et al., 1996). AtPTR2B wurde auch als AtNTR1 und später als AtPTR2 bezeichnet. Dieser Peptidtransporter besitzt 12 putative Transmembrandomänen und transportiert verschiedene Dipeptide, jedoch keine Aminosäuren und Nitrat. *AtPTR2* wird vor allem in der Blüte, im Blatt sowie in Stängel, Wurzel und Keimlingen exprimiert. AtPTR2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Versorgung der Samen, denn *AtPTR2-antisense* Pflanzen zeigen einen spät blühenden Phänotyp und zum Teil sterben die Samen ab (Song et al., 1997). Außerdem wurden in Arabidopsis noch zwei weitere Peptidtransporter, AtPTR1 und AtPTR3, näher beschrieben. AtPTR1 ist ebenfalls ein funktioneller Peptidtransporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und Di- sowie Tripeptide unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung transportiert (Dietrich et al., 2004). Seine Expression während der Samenkeimung, in sich entwickelnden Schoten und in Wurzelspitzen deutet auf eine mögliche Rolle bei der Mobilisierung von Reserven, der Samenentwicklung und auch der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden hin. Von AtPTR3 ist hingegen nur bekannt, dass seine Expression durch mechanische Verletzung und Salzstress induzierbar ist, über die Funktionalität des Proteins ist bisher nichts beschrieben worden (Karim et al., 2005). Mitglieder der Oligopeptidtransporter weisen 12-14 Transmembrandomänen auf und transportieren bestimmte Tetra- und Pentapeptide. Sie zeigen keine Sequenzähnlichkeit zu den PTR-Transportern. Von den neun OPTs in Arabidopsis sind bisher sieben näher untersucht worden, wobei fünf eine Hefemutante funktionell komplementieren konnten (Koh et al., 2002). Alle OPTs zeigen ein gewebespezifisches Expressionsmuster, was auf unterschiedliche Funktionen in der Pflanze schließen lässt.

1.7 N-Transporter aus Leguminosen (*Vicia faba*, *Pisum sativum*) und Gerste

1.7.1 Aminosäuretransporter

Bei Leguminosen erfolgt die Phloementladung von Aminosäuren in die Samenschale symplastisch, die Freisetzung aus der Samenschale wahrscheinlich über erleichterten Transport mit Hilfe von nicht selektiven Poren (De Jong et al., 1997). An der Aufnahme der As aus dem Samenapoplast in den Embryo könnten, ähnlich wie für Saccharose

beschrieben, Transferzellen beteiligt sein, welche die innere Oberfläche der Samenschale und die äußere Epidermis der Kotyledonen bilden (Tegeder et al., 1999; Weber et al., 1997b).

Für *P. sativum* sind zwei Aminosäuretransporter beschrieben worden, die der AAP-Familie zugehören. *PsAAP1* wird in vegetativen Organen und in den embryonalen Transferzellen exprimiert, *PsAAP2* konnte mittels Northern-Analysen nicht detektiert werden (Tegeder et al., 2000). Die Transkriptverteilung von *PsAAP1* könnte auf eine mögliche Rolle bei der Rückgewinnung von Aminosäuren aus dem Apoplast während des symplastischen Transports durch die Samenschale hindeuten. *PsAAP1* transportiert verschiedene Aminosäuren, darunter Prolin, Citrullin, Glutamin und Lysin. *PsAAP2* hingegen ist ein unvollständiger cDNA-Klon, und es wurden keine Transportanalysen durchgeführt. Trotz der phylogenetischen Nähe zu *P. sativum* ist die Situation bei *V. faba* anders, hier sind bisher sieben AAPs bekannt. Es wurden drei vollständige cDNA-Klone aus einer samenspezifischen cDNA-Bank von *V. faba* isoliert, *VfAAP1*, *VfAAP3* und *VfAAP4* (Miranda et al., 2001). *VfAAP1* (ortholog zu *PsAAP2*) transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren, wenn das Protein heterolog in Hefezellen exprimiert wird, zeigt aber eine gewisse Präferenz für Cystein. *VfAAP3* transportiert in Hefezellen ebenfalls verschiedene Aminosäuren mit einer Präferenz für basische Aminosäuren (Lysin, Arginin). *VfAAP1* wird stark vor Beginn der Speicherproteinsynthese in sich entwickelnden Kotyledonen exprimiert. *In situ* Hybridisierungen zeigen die *VfAAP1*-mRNA in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen, nicht aber in den Transferzellen. Zusätzlich wird *VfAAP1* noch in verschiedenen vegetativen Geweben (Stängel, Wurzel, Hülse, *sink*-Blatt) sowie in der Samenschale exprimiert. Dagegen wird *VfAAP3* stark in verschiedenen *sink*-Organen aber nur wenig im Embryo exprimiert. Die mRNA von *VfAAP4* (ortholog zu *PsAAP1*) konnte mittels Northern-Analysen nicht nachgewiesen werden. Vier weitere Vertreter der AAP-Familie aus *V. faba* (*VfAAP2*, *VfAAPa*, *VfAAPb* und *VfAAPc*) unterscheiden sich wesentlich in ihrem Expressionsmuster. *VfAAP2* ist ein vollständiger cDNA-Klon und wurde aus einer blattspezifischen cDNA-Bank isoliert und zeigt die höchste Sequenzidentität mit *AAP2* und *AAP4* aus *Arabidopsis*. In Hefe exprimiert, transportiert *VfAAP2* Prolin sowie aromatische und neutrale Aminosäuren. *VfAAP2* wird am stärksten im Stängel, in *sink*-Blättern und in Hülsen exprimiert, nicht aber im Samen. Die drei partiellen cDNA-Klone *VfAAPa*, *VfAAPb* und *VfAAPc* zeigen ein hohes mRNA-Expressionslevel in der Blüte, *VfAAPa* wird zusätzlich im Stängel, *VfAAPb* im Samen und *VfAAPc* in *source*-Blättern exprimiert (Montamat et al., 1999).

Aus Gerste sind bisher außer einem durch Salzstress induzierbaren Prolintransporter (Ueda et al., 2001) keine weiteren Aminosäuretransporter funktionell beschrieben worden.

1.7.2 Peptidtransporter

Aus *V. faba* wurden bisher zwei Peptidtransporter aus einer samenspezifischen cDNA-Bank kloniert. Der partielle cDNA-Klon *VfPTR2* wird schwach in Wurzeln, der Wurzelspitze und im Blatt exprimiert, über die Transporteigenschaften ist noch nichts bekannt. *VfPTR1* komplementiert die Hefemutante LR2, die auf Medien mit Histidylpeptiden als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen kann, und ist demzufolge ein funktioneller Peptidtransporter. *VfPTR1* wird einerseits in den Wurzeln, Wurzelhaaren und Kotyledonen keimender Samen exprimiert, zum anderen auch in späteren Stadien der Samenentwicklung, zwischen Tag 20 und 35 nach der Blüte (Miranda et al., 2003). In keimenden Embryonen wird *VfPTR1* ab dem 4. Tag nach der Keimung exprimiert, das Expressionslevel steigt dann bis zum 8. Tag an, dabei ist die Expression in den Bereichen kurz oberhalb der Wurzelspitze am stärksten. *In situ* Hybridisierungen haben eine spezifische Expression im Leitgewebe von Keimlingen gezeigt. Außerdem konnte die *VfPTR1*-mRNA in der Epidermis von Kotyledonen, der Wurzelepidermis und in Wurzelhaaren detektiert werden. Dabei sind die *VfPTR1* mRNA-Mengen in Wurzeln abhängig von der Stickstoffquelle. In Wurzeln, die in Medium mit 1 mM des Dipeptids Leu-Leu oder 1 mM Gln kultiviert wurden, findet sich weniger mRNA als in Wurzeln, die ohne diese Zusätze gewachsen sind (Miranda et al., 2003). Während der Samenentwicklung wird die *PTR1*-Expression räumlich kontrolliert, so wird der Transporter in den Stadien V und VI der Samenentwicklung zunächst in der Epidermis exprimiert. Später finden sich *PTR1*-Transkripte in den Zellen, die die Leitbündel umgeben (Stadium VI) und während der Hauptspeicherphase in den Speicherparenchymzellen (Stadium VII). In den Transferzellen konnte hingegen keine *PTR1*-Expression nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster deutet zum einen auf eine mögliche Rolle bei der Samenentwicklung hin, die Substrate für *VfPTR1* könnten aus der Remobilisierung bei einsetzender Blattseneszenz stammen, die parallel zur Samenreifung verläuft. Zurzeit ist allerdings nicht klar, inwieweit der Langstreckentransport von Peptiden und deren Aufnahme in die Samen zur Speicherproteinakkumulation beitragen. Weitere Funktionen des *VfPTR1* könnten der Transport von Peptiden aus der Speicherproteinhydrolyse in die Leitgewebe des Keimlings sowie die Aufnahme von Peptiden aus dem Boden in die Wurzel sein.

Aus *P. sativum* sind noch keine Peptidtransporter charakterisiert worden. In *H. vulgare* wurde bisher *HvPTR1* funktionell beschrieben. *HvPTR1* wird stark samenspezifisch exprimiert, zum einen in den Epithelzellen des Scutellums während der Keimung und zum anderen im Gerstenkorn über die gesamte Samenentwicklung hinweg (West et al., 1998). Im keimenden Gerstensamen könnte die Funktion von *HvPTR1* darin bestehen, Peptide aus dem Endosperm über das Scutellum in den Embryo zu transportieren. Das Scutellum ist ein absorptives Gewebe, welches das Endosperm vom Embryo trennt (Waterworth et al., 2005).

Peptide sind die ersten Produkte des Proteinabbaus im Endosperm und liefern Nährstoffe für die erste Wachstumsphase des Keimlings. Bei Getreide ist Peptidtransport zu Beginn der Keimung allein dafür verantwortlich, den Embryo mit organischem Stickstoff zu versorgen. Aminosäuretransport wird erst 48-72h nach Beginn der Quellung wichtig (Waterworth et al., 2005). Aminosäuren, die ebenfalls Produkte der Proteinhydrolyse aus dem Endosperm sind und deren Konzentration während der Remobilisierung ansteigt, hemmen die Peptidaufnahme in das keimende Korn. Dabei sind die mRNA- und Proteinlevel von HvPTR1 unverändert, d.h. die Regulation findet auf post-translationaler Ebene statt. HvPTR1 wird in Anwesenheit von Aminosäuren an Serinresten phosphoryliert und diese Phosphorylierung senkt seine Fähigkeit Peptide zu transportieren (Waterworth et al., 2005).

1.8 Funktionen von GABA in Pflanzen

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht proteinogene Aminosäure, die in Pro- und Eukaryonten vorkommt. GABA wurde bereits vor über 50 Jahren in Pflanzen als Bestandteil von Kartoffelknollen entdeckt (Steward et al., 1949), aber das Forschungsinteresse verlagerte sich hin zum tierischen System als man herausfand, dass GABA ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen Nervensystems ist. Die Aufnahme von GABA in Neuronen und Gliazellen wird durch Na^+ -abhängige GABA-Transporter (GATs) vermittelt, womit die GABA-Konzentration in der Synapse reguliert wird (Borden, 1996; Chen et al., 2004). Zusätzlich zur Funktion als Neurotransmitter spielt GABA bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle, indem es Migration, Differenzierung und Proliferation fördert (Owens and Kriegstein, 2002). In Bakterien und Hefe wird GABA hauptsächlich von Transportern der APC-Familie aufgenommen (Hosie et al., 2002; Jack et al., 2000) und ist vorwiegend am Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus beteiligt (Kumar and Punekar, 1997; Shaibe et al., 1985; Solomon and Oliver, 2002). Andere Funktionen, wie z. B. bei der pH-Regulation in *E. coli* und bei der oxidativen Stresstoleranz in *S. cerevisiae*, wurden ebenfalls beschrieben (Coleman et al., 2001; Yohannes et al., 2004). Über die Funktionen und den Transport von GABA in Pflanzen ist weit weniger bekannt. GABA wird schnell und in großen Mengen bei biotischem und abiotischem Stress gebildet (Kinnersley and Turano, 2000; Shelp et al., 1999; Snedden and Fromm, 1999). In Pflanzen wird GABA durch die Decarboxylierung von Glutamat gebildet und im sogenannten GABA-*shunt* über Succinat-Semialdehyd zu Succinat metabolisiert (vgl. Abb. 3.55, [Shelp et al., 1999]). GABA und der GABA-*shunt* werden in Pflanzen mit verschiedenen physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht (z. B. Regulation des zytosolischen pH, Kohlenstoffflüsse in den TCA-Zyklus, Stickstoffmetabolismus, Abwehr von Insekten, Schutz vor oxidativem Stress, Osmoregulation und Signalfunktion (Bouché and Fromm, 2004; Bouché et al., 2003a). Ein

Ausschalten des *SSADH*-Gens (Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase) in Arabidopsis führt in den Pflanzen zu nekrotischem Zelltod durch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies unter Stresseinwirkung (Bouché et al., 2003b). Palanivelu et al. (2003) haben kürzlich beschrieben, dass ein GABA-Konzentrationsgradient für das gerichtete Wachstum von Pollenschläuchen notwendig ist. Möglicherweise hat diese Aminosäure dabei eine interzelluläre Signalfunktion. All diese Funktionen sind auf den intra- und interzellulären Transport von GABA angewiesen. Die Aminosäurepermease AtAAP3 und die Prolintransporter aus Arabidopsis transportieren GABA mit niedriger Affinität (Breitkreuz et al., 1999; Fischer et al., 2002; Grallath et al., 2005). Mit AtGAT1 wurde erstmals ein GABA-Transporter der ATF-Familie beschrieben, der GABA mit hoher Affinität transportiert (Meyer et al., 2006).

1.9 Stickstoffmetabolismus und Seneszenz

Seneszenz ist das letzte Stadium der Blattentwicklung vor dem Zelltod und ist charakterisiert durch den Wechsel von Nährstoffassimilation hin zur Nährstoffremobilisierung (Feller and Fischer, 1994; Masclaux et al., 2000). Die Bestandteile von abgebauten Makromolekülen werden in andere Teile der Pflanze transportiert, vor allem in sich entwickelnde Samen. Dies geschieht mittels Langstreckentransport im Phloem (Hill, 1980). Da ein Großteil des Stickstoffs, der für die Samenfüllung benötigt wird, aus vegetativen Teilen der Pflanze stammt und nur ein geringer Anteil während der Samenentwicklung aus dem Boden aufgenommen wird, ist die Remobilisierung aus seneszierenden Blättern vor allem für den Nährstoffgehalt in Samen von Kulturpflanzen unerlässlich (Feller and Keist, 1986). Chloroplasten sind die ersten Organellen, die dem Abbau unterliegen, was zu einem rapiden Abfall der Photosyntheseaktivität führt (Noodén et al., 1997). Stickstoff stammt hauptsächlich aus dem Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren (Hörtensteiner and Feller, 2002) und ist mit ca. 90 % der häufigste recycelte Nährstoff während der Seneszenz (Himmelblau and Amasino, 2001). Verschiedene Transporter für intrazelluläre Stickstofftranslokation wurden beschrieben, darunter Oligopeptidtransporter, aromatische Aminosäurepermeasen, Ammoniumtransporter sowie Purin- und Pyrimidintransporter (Guo et al., 2004). Amide, Glutamin und Asparagin sind die am häufigsten transportierten Aminosäuren im Phloem seneszierender Blätter (Feller and Fischer, 1994; Kamachi et al., 1992). Ammonium wird wahrscheinlich durch die Deaminierung von Aminosäuren und den Abbau von Nukleinsäuren gebildet und durch die Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt (Kamachi et al., 1992). Seneszenz wird ausgelöst, wenn die Pflanze ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht, kann aber auch durch verschiedene Umwelteinflüsse (Trockenstress, Nährstoffknappheit, Krankheitserreger, Temperatur) vorzeitig induziert werden. In genomischen Untersuchungen

wurden zahlreiche seneszenz-assoziierte Gene (SAGs) identifiziert, deren Produkte an der Initiation und Regulation der Seneszenzvorgänge beteiligt sind (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Van der Graaff et al., 2006; Yoshida, 2003). Dazu zählen beispielsweise verschiedene hydrolytische Enzyme, die den Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden katalysieren. Gene, die für Proteasen codieren, werden während der Seneszenz verstärkt exprimiert. Dabei handelt es sich oft um vakuolär lokalisierte Proteasen, die zunächst inaktiv vorliegen und während späterer Seneszenzstadien zu aktiven Enzymen prozessiert werden (Yamada et al., 2001). Zu diesen Proteasen gehören auch Gene von Cysteinproteinasen, deren Expression kurz vor der Autolyse der Zellen induziert wird (Buchanan-Wollaston, 1997; Hörtensteiner and Feller, 2002).

1.10 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf zwei Kulturpflanzen, Leguminosen und Gerste. Die Arbeitsgruppe Genwirkung (IPK) beschäftigt sich hauptsächlich mit der Samenentwicklung dieser beiden Kulturpflanzen. Leguminosensamen sind eine der wichtigsten pflanzlichen Proteinquellen und der Samenproteingehalt ist daher ein wichtiges Ertrags- und Qualitätsmerkmal. Die Proteinakkumulation im Samen ist vom verfügbaren Stickstoff in den Pflanzen abhängig. Faktoren wie die N-Aufnahme in die Wurzeln, N-Fixierung und –assimilation sowie die Remobilisierung von Reserven und deren Translokation innerhalb der Pflanze können Kontrolle über dieses Merkmal ausüben. Aminosäure- und Peptidtransporter spielen wahrscheinlich bei den letztgenannten Prozessen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion des Peptidtransporters PTR1 aus *V. faba* in den Kulturpflanzen Erbse bzw. *V. faba* in Bezug auf N-Translokation innerhalb der Pflanze und Samenproteinakkumulation untersucht werden. Ein Ziel war dabei die weiterführende molekulare Charakterisierung von VfPTR1 in *V. faba*. Dabei standen die Isolierung des *PTR1*-Promotors und Untersuchung der Expression sowie die intrazelluläre Lokalisierung des PTR1-Proteins im Vordergrund. Weiterhin sollten transgene Erbsenpflanzen erstellt werden, die *VfPTR1 antisense* unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren. Dadurch sollte Aufschluss über die potenziell ratenlimitierende Rolle von VfPTR1 in Bezug auf Samenproteingehalt und Remobilisierung gewonnen werden. Des Weiteren war geplant, transgene Erbsenlinien zu regenerieren und etablieren, die die Aminosäurepermease *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors exprimieren. Dies soll Aufschluss über die Transporterfunktionen *in vivo* geben. Durch diesen Ansatz könnte der Transfer von N-Metaboliten wie Aminosäuren und Peptiden aus der Remobilisierung in

das Phloem verbessert sein. Die Remobilisierung von Reservestoffen könnte somit effizienter gestaltet werden und indirekt zu einem erhöhten Samenproteingehalt beitragen.

Bisherige Kenntnisse über N-Transporter stammen vorwiegend aus Untersuchungen der Modellpflanze *Arabidopsis*. Es ist anzunehmen, dass viele regulatorische Mechanismen zwischen den Arten konserviert sind, aber es sollte dennoch nicht generalisiert werden. Leguminosen sind spezialisiert auf einen hohen Samenproteingehalt und verfügen daher über weitaus höhere Stoffflüsse und *pool*-Größen bestimmter Metabolite als z. B. *Arabidopsis*. Es ist daher wichtig, Untersuchungen zur ratenlimitierenden Funktion von Transportern bezüglich der Samenproteinakkumulation direkt an Kulturpflanzen vorzunehmen.

Gerste ist innerhalb der Getreide eine wichtige Modellpflanze, deren Samen vor allem Stärke aber auch Proteine speichern. Der geringe Proteingehalt (ca. 10 %) stellt einen Mangel vor allem bei den Futtergetreiden dar. Das Ziel der Züchtung ist daher ein höherer Proteingehalt in den Körnern von Futtergetreiden. Möglicherweise spielen Aminosäuretransporter eine Rolle bei der Remobilisierung von Reserven und dem Transport in die sich entwickelnden Samen. Es ist daher wichtig, diese Transportvorgänge und die zugehörigen Transporter an der Kulturpflanze Gerste direkt zu untersuchen. Über Aminosäuretransporter aus Gerste ist bisher noch nichts bekannt. Der zweite Teil der Arbeit sollte sich vorwiegend mit der Identifizierung und Charakterisierung von Aminosäuretransportern aus *H. vulgare* befassen. Dabei war das Ziel, Aminosäuretransporter zu finden, die eine Funktion während der Samenentwicklung und Seneszenz übernehmen.