

## 4 Diskussion

### 4.1 N-Transporter aus Leguminosen

Teil eins der vorliegenden Arbeit befasste sich zunächst mit der weiterführenden Charakterisierung des Peptidtransporters 1 aus *V. faba* (VfPTR1). Dabei sollte das Expressionsmuster von *VfPTR1* mit Hilfe von Promotor/Reporterfusionen genauer untersucht und der Transporter außerdem innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Hauptanliegen dieses Teils der Arbeit war jedoch die Erzeugung und Analyse transgener Erbsenpflanzen, die die funktionell charakterisierten Transporter *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors exprimieren.

#### 4.1.1 Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1

Ausgehend vom 5'-Ende der *VfPTR1* cDNA-Sequenz konnten mittels *genome walking* zwei putative *PTR1*-Promotorfragmente amplifiziert werden, die jeweils typische *cis*-regulatorische Promotorelemente enthielten. Nur eines dieser Fragmente konnte in transient transformierten Protoplasten die Expression des GUS-Reportergens vermitteln (vgl. Abb. 3.5) und muss folglich alle nötigen regulatorischen Elemente für eine Expression in Protoplasten enthalten. In der Sequenz des nicht aktiven Fragments befinden sich putative *core*-Promotorelemente wie TATA- und CAAT-Box stromabwärts des vorhergesagten Transkriptionsstartpunktes. Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, dass keine Transkription des GUS-Gens initiiert werden konnte. Ein *genome walking* ausgehend von beiden Promotorfragmenten in 3'-Richtung resultierte in der Amplifizierung von zwei zu *VfPTR1* ähnlichen Sequenzen, die jedoch nur innerhalb der ersten 157 bp identische Nukleotide aufwiesen. Die ausgehend vom aktiven Promotorfragment amplifizierte Sequenz entspricht *VfPTR1*, in der Sequenz ausgehend vom inaktiven Promotorfragment wurde durch eine Punktmutation an Position 13 ein Stoppcodon eingeführt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem amplifizierten Bereich um Teile eines Pseudogens.

Die spezifische Expression eines Gens kann durch das Vorhandensein entsprechender *cis*-Elemente in ihren Promotoren kontrolliert werden. In der Sequenz des *VfPTR1*-Promotors wurden mehrere *cis*-regulatorische Elemente gefunden, darunter ein Endosperm-Element (Stalberg et al., 1996), eine GATA-Box, die in die Lichtregulation involviert ist (Lam and Chua, 1989), ein *auxin responsive element* (Ulmasov et al., 1999) und ein ABRE-Motiv (Simpson et al., 2003). Inwieweit diese Regulatorelemente einen Einfluss auf die

Promotoraktivität haben, bleibt noch zu untersuchen. Außerdem könnte überprüft werden, ob sich die Promotoraktivität auch durch die von VfPTR1 transportierten Substrate beeinflussen lässt. Durch Zugabe des Dipeptids His-Ala in das Protoplasten-Kulturmedium konnte in ersten Versuchen keine Veränderung der Promotoraktivität verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptmengen von *VfPTR1* in Wurzeln sinken leicht bei Zugabe geringer Konzentrationen des Dipeptids Leu-Leu oder der Aminosäure Glutamin (Miranda et al., 2003). Einige N-Transporter wie z. B. VfAAP1 werden durch Aminosäuren negativ reguliert (Miranda et al., 2001).

Northern Blot Analysen haben gezeigt, dass *VfPTR1* stark in Keimlingswurzeln exprimiert wird. *VfPTR1* Transkripte wurden auch im Hypokotyl sowie in den keimenden Kotyledonen gefunden. Promotor/GFP-Untersuchungen an Tabakwurzeln haben Fluoreszenzsignale in den Zellen gezeigt, die den Zentralzylinder umgeben. Die unmittelbare Wurzelspitze war nicht markiert, Signale gab es erst in der Streckungszone. Mittels GUS-Färbungen an transgenen Tabakpflanzen konnte eine Aktivität des *PTR1*-Promotors ebenfalls in Wurzeln nachgewiesen werden. Dabei waren vor allem Parenchymzellen, aber auch die Epidermis und Wurzelhaare gefärbt. Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Northern Analysen und *in situ* Hybridisierungen, in denen bereits eine Expression von *VfPTR1* in keimenden Kotyledonen und in der Wurzel nachgewiesen werden konnte (Miranda et al., 2003). Die Ergebnisse unterstützen die für VfPTR1 vermutete Rolle bei der Aufnahme von Peptiden aus der Speicherproteinhydrolyse in die Leitgewebe des Keimlings. Möglicherweise hat VfPTR1 eine direkte Funktion bei der Phloembeladung. Dies gewährleistet, dass organischer Stickstoff für die wachsenden Gewebe bereitgestellt werden kann. Die Expression in der Wurzelepidermis und in Wurzelhaaren deutet auf eine weitere Funktion von VfPTR1 bei der Aufnahme von Peptiden aus dem Boden hin. In *Ricinus communis* wurde ein protonenabhängiges Aminosäureaufnahmesystem beschrieben und *RcAAP1*-Transkripte in Wurzelhaaren weisen darauf hin, dass dieser Transporter an der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Boden beteiligt sein könnte (Bick et al., 1998; Weston et al., 1994). AAP1 aus *Arabidopsis* wird in der Wurzelhaube, der Wurzelepidermis und in den Wurzelhaaren exprimiert und transportiert neutrale Aminosäuren in die Wurzeln (Lee et al., 2007). Es gibt Hypothesen über die mögliche Rolle von Peptidtransportern bei der direkten Aufnahme kleiner Peptide aus dem Boden (Waterworth et al., 2001). Einige Pflanzen scheinen ihren Bedarf an organischem Stickstoff, wie z. B. Aminosäuren und Peptiden, direkt durch die Aufnahme aus dem Boden zu decken (Yamagata et al., 2001). Zusätzlich zu den Markierungen in Wurzeln konnte eine GUS-Aktivität im Stängel im Bereich des Blattansatzes gezeigt werden. Die Blaufärbung der Parenchymzellen nimmt von außen nach innen ab, das Leitgewebe scheint nicht markiert zu sein. Es kann spekuliert werden, dass VfPTR1 hier möglicherweise eine Funktion beim Transport von Peptiden innerhalb des Stängels

übernimmt. Erbsensamen, die pPTRGFP exprimieren, zeigten Fluoreszenzsignale in den Epidermis- und Parenchymzellen der Kotyledonen (26 DAF), wobei die äußeren Zellreihen stärker markiert, die inneren hingegen ohne Fluoreszenz waren. Somit konnte bestätigt werden, dass der *PTR1*-Promotor im mittleren Samenentwicklungsstadium aktiv ist. Die Aktivität von Peptidtransportern der PTR-Familie scheint generell mit intensiver Proteolyse (z. B. Verwundung, Seneszenz, Abbau von Speicherproteinen) assoziiert zu sein (Stacey et al., 2002). In diesen Phasen ist der Transport von Peptiden sehr wichtig, um organischen Stickstoff möglichst schnell zu exportieren (Higgins and Payne, 1978). Es ist denkbar, dass die Substrate für VfPTR1 aus der Remobilisierung während der Blattseneszenz stammen, die parallel zur Samenentwicklung abläuft. Der *VfPTR1*-Promotor ist in der Epidermis der Kotyledonen aktiv und epidermale Transferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen in die Kotyledonen (Offler et al., 1989; Weber et al., 1998a). Verschiedene Transporter für Saccharose, Hexosen und Aminosäuren von *V. faba* und *P. sativum* werden in diesen Zellen exprimiert (Tegeeder et al., 2000; Tegeeder et al., 1999; Weber et al., 1997b). Die Expression von *VfPTR1* in den Parenchymzellen der Kotyledonen lässt auf eine weitere Funktion beim Transport innerhalb des Samens schließen.

Bisher wurden drei PTR-Mitglieder aus Arabidopsis und ein PTR aus Gerste beschrieben. Ähnlichkeiten im Expressionsmuster finden sich beim Vergleich von *VfPTR1* mit den Arabidopsis-PTRs. *AtPTR1* wird in allen Organen exprimiert, hauptsächlich aber in Leitgeweben und während der Keimung (Dietrich et al., 2004). Dies deutet auf eine Rolle im Langstreckentransport hin, möglicherweise bei der Beladung des Phloems mit Peptiden aus *source*-Organen. *AtPTR1* könnte zusätzlich eine Funktion bei der Versorgung der Samen mit organischem N haben (Hirner et al., 1998) sowie bei der Remobilisierung von Peptiden aus dem Speicherproteinabbau. Auch *AtPTR2*-Transkripte konnten in allen Teilen der Pflanze nachgewiesen werden, vor allem aber in jungen Blättern, Wurzeln und Keimlingen (Song et al., 1996). Für *AtPTR2* wird eine eher generelle Funktion im Peptidtransport vorgeschlagen, bei der Versorgung der Pflanze mit einer Mindestmenge an Peptiden. *VfPTR1* weist auf Proteinebene 76 % identische Aminosäuren zu *AtPTR2* und 62 % zu *AtPTR1* auf und ist somit zumindest hinsichtlich der Sequenz das orthologe Protein zu *AtPTR2*. Die Expression von *AtPTR3* wird durch Verwundung und Salzstress induziert, das Protein ist aber noch nicht funktionell charakterisiert worden (Karim et al., 2005). Im Gegensatz zu *VfPTR1* und den Arabidopsis-PTRs wird *HvPTR1* stark gewebespezifisch im Scutellum des Keimlings exprimiert (West et al., 1998). Während der Keimung werden Peptide wahrscheinlich aus dem Endosperm, in dem die Speicherproteinhydrolyse stattfindet, über das Scutellum in die wachsenden Embryonen aufgenommen.

Ursprünglich war geplant, den *VfPTR1*-Promotor für die Erzeugung von *VfPTR1 antisense* Erbsenpflanzen zu verwenden. Damit sollte untersucht werden, inwieweit VfPTR1 raten-

limitierend in bezug auf Samenproteingehalt bzw. Remobilisierung ist. Zwar gelang die Regeneration transgener Erbsenpflanzen, jedoch konnten keine stabilen Linien erzeugt werden. Die Primärtransformanten verloren das Transgen in der Folgegeneration wieder und somit konnten keine Erkenntnisse über die raten-limitierende Rolle von VfPTR1 in Erbse gewonnen werden. In *Arabidopsis* führt die *antisense*-Expression von *AtPTR2* zu einer verspäteten Blüte und beeinträchtigt die Samenentwicklung. Die Pflanzen haben weniger, dafür aber größere Samen (Song et al., 1997).

#### 4.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1

Der Peptidtransporter VfPTR1 wurde bereits ausführlich charakterisiert, über die Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle war jedoch nichts bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisierung untersucht werden. Um Transporter intrazellulär zu lokalisieren, werden häufig translationale Fusionen mit GFP benutzt. Bei der transienten Expression in *V. faba* Protoplasten gab es zunächst deutliche Hinweise darauf, dass VfPTR1 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Alle transformierten Protoplasten zeigten die gleiche klare Markierung der Zentralvakuole sowie, wenn vorhanden, von kleineren Vakuolen. Dieses Ergebnis war unerwartet, da VfPTR1 eine PTR-Hefemutante funktionell komplementieren kann und somit zumindest bei der Expression in Hefe in der Plasmamembran lokalisiert sein müsste. Der für die Komplementation verwendete Hefestamm LR2 trägt Mutationen im *PTR2*-Gen, in seinem Histidinpermease-Gen und ist zusätzlich *his*-auxotroph, d.h. dieser Stamm kann nicht auf Medium wachsen, welches Histidin ausschließlich in Form von Dipeptiden enthält (Rentsch et al., 1995). Vom Hefesystem kann allerdings nicht unmittelbar auf die Situation *in planta* geschlossen werden. N-Transporter übernehmen nicht nur eine Funktion beim Transport von Nährstoffen über die Plasmamembran, sondern sind auch in intrazellulären Membranen wie der Vakuolenmembran notwendig. Vakuoläre Transporter sind Teil eines komplexen Netzwerks, das es der Pflanze ermöglicht, schnell auf wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren (Martinoia et al., 2007). Tonoplast-lokalisierte Aminosäure- und Peptidtransporter könnten dabei eine wichtige Rolle bei der vorübergehenden Speicherung von Nährstoffen innerhalb der Vakuole spielen. In Zeiten des Nährstoffüberangebotes können diese gespeichert und bei Nährstoffknappheit wieder ins Zytoplasma abgegeben werden. Somit wird eine gleich bleibende Konzentration von Nährstoffen aufrechterhalten. Die putative Funktion von VfPTR1 bei der Beladung des Phloems mit Peptiden lässt sich nicht so einfach mit einer vakuolären Lokalisierung in Einklang bringen. Phloemzellen besitzen nur wenige kleine Vakuolen. Auch die mögliche Rolle bei der Aufnahme von Peptiden aus dem Boden in die

Wurzelhaare spricht eher für eine Lokalisierung von VfPTR1 in der Plasmamembran. Eine Überprüfung des VfPTR1GFP-Fusionskonstruktes auf funktionelle Komplementation der Hefemutante LR2 zeigte, dass das Fusionsprotein nicht mehr funktionell ist, wohingegen VfPTR1 ohne GFP in der Lage war, die Mutation im endogenen Peptidtransporter zu komplementieren. Es kann vermutet werden, dass sich das GFP in irgendeiner Weise störend auf die Funktionalität von VfPTR1 auswirkt. Beispielsweise könnte die korrekte Integration des Fusionsproteins in die Plasmamembran durch GFP am C-Terminus verhindert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass VfPTR1 zwar in die Plasmamembran gelangt, dort aber aufgrund sterischer Behinderungen durch GFP die Transportfunktion nicht mehr ausführen kann. Möglicherweise ist die Substratbindungsstelle durch GFP nicht mehr zugänglich, folglich könnten keine Peptide gebunden werden. Außerdem könnte die korrekte Faltung des VfPTR1-Proteins nicht mehr gewährleistet sein, was ebenfalls zu einem Funktionsverlust führen würde. Es bleibt zu untersuchen, ob eine Fusion des GFP am N-Terminus von VfPTR1 zu den gleichen Resultaten führt oder ob ein solches Konstrukt funktionell wäre. Von AtPTR1 ist bekannt, dass sowohl N- als auch C-terminale Fusionen mit GFP in Hefe funktionell sind und den Eintransport von Dipeptiden (His-Ala) vermitteln. GFP-AtPTR1 konnte jedoch kein Wachstum auf limitierenden Histidinkonzentrationen bewirken. Das zu VfPTR1 auf Sequenzebene orthologe Protein aus Arabidopsis, AtPTR2, konnte den Transport von Peptiden vermitteln, wenn es heterolog in Hefezellen exprimiert wird (Song et al., 1996). AtPTR2 wurde kürzlich bei verschiedenen Proteom-Untersuchungen an isolierten Vakuolen aus Arabidopsis in der Vakuolenmembran lokalisiert (Carter et al., 2004; Shimaoka et al., 2004).

Alternativ zur Lokalisierung über eine GFP-Fusion wurde ein VfPTR1c-myc Konstrukt erstellt und mittels eines anti-*c-myc* Antikörpers sollte dieses Fusionsprotein intrazellulär lokalisiert werden. Der *c-myc tag* ist deutlich kleiner als GFP und sollte sich weit weniger störend auf Konformation und Funktionalität des Fusionsproteins auswirken. Das *c-myc* Peptid wurde in den intrazellulären *loop* von VfPTR1 eingebaut. Vom Saccharosetransporter AtSUC3 aus Arabidopsis ist bekannt, dass ein solcher *loop* nicht für die Transportfunktion in AtSUC3 exprimierenden Hefezellen benötigt wird (Meyer et al., 2000). Das VfPTR1c-myc Fusionskonstrukt war in Hefe funktionell, somit beeinträchtigt das *c-myc* Peptid nicht die Funktion des Transporters. In transient transformierten Protoplasten konnte jedoch keine Aussage zur Lokalisierung von VfPTR1 getroffen werden, da durch den Fixierungs- und Einbettungsprozess die Strukturhaltung der Protoplasten nicht mehr gegeben war. Goldmarkierungen an Membransystemen konnten keinem genauen Membrantyp zugeordnet werden.

Durch die Verwendung von Peptidantikörpern, die gegen den N- und C-Terminus von VfPTR1 gerichtet waren, gelang eine spezifische Markierung der Plasmamembran. Die

Entscheidung für Peptidantikörper wurde getroffen, da das vollständige VfPTR1-Protein als Antigen nicht zur Verfügung stand. Membranproteine lassen sich in *E. coli* und auch im Hefesystem nur sehr schwer in großen Mengen exprimieren. Die ausgewählten Sequenzen vom N- und C-Terminus weisen nahezu keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen auf und eignen sich somit sehr gut als Antigene. In fixierten Zellen aus *V. faba* Suspensionsgewebekulturen konnten elektronenmikroskopisch spezifische Goldmarkierungen entlang der Plasmamembran gezeigt werden. Intrazelluläre Membranen und vor allem die Vakuolenmembran waren nicht markiert. Durch diese Versuche wird die ursprüngliche Vermutung einer Plasmamembranlokalisierung bestätigt. Der Peptidtransporter AtPTR1 konnte mittels GFP-Fusionen an der Plasmamembran lokalisiert werden. Allerdings war bei der N-terminalen Fusion das *targeting* nicht vollständig und intrazelluläre Membranen zeigten ebenfalls eine Markierung (Dietrich et al., 2004). Für HvPTR1 wurde ebenfalls eine Lokalisierung in der Plasmamembran beschrieben (Waterworth et al., 2000). Der anti-VfPTR1 Antikörper detektiert im Western Blot in Proteinextrakten aus *V. faba* Keimlingswurzeln und Suspensionszellen eine spezifische Bande mit einer Größe von ca. 55 kDa. Diese Bande lässt sich durch eine Vorinkubation des Antiserums mit den Peptiden erfolgreich kompetitieren. Die Bande bei 55 kDa liegt etwa 10 kDa unter dem theoretisch berechneten Molekulargewicht für VfPTR1. Dies ist allerdings für Membranproteine nicht ungewöhnlich und kann mit deren hoher Lipophilität begründet werden. Zusätzlich zu der wahrscheinlich VfPTR1 entsprechenden Bande wird im Western Blot eine weitere Bande von weitaus stärkerer Intensität mit einer Größe von etwa 28 kDa detektiert. Diese lässt sich nicht sichtbar mit den eingesetzten Peptidkonzentrationen kompetitieren. Ob es sich bei dieser Bande um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit einem anderen Protein handelt, kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre auch ein durch Endoproteasen entstandenes Spaltprodukt von VfPTR1. Aus dem entsprechenden Coomassie-gefärbten Proteingel wurden Banden in der Höhe von 55 kDa sowie 28 kDa ausgeschnitten und einer ersten Peptidepitopanalyse unterzogen. Dabei wurden keine mit VfPTR1 oder anderen Transportern verwandten Sequenzbereiche identifiziert. Möglicherweise aber ist VfPTR1 nur in geringen Mengen in den Extrakten vorhanden, da die spezifische Bande von anderen Proteinen überlagert wird. Ein erneuter Versuch mit einer größeren Auftrennung der einzelnen Banden speziell im Bereich von 28 kDa könnte mehr Aufschluss geben. Aufgrund der Western Blot Ergebnisse kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, dass die in der Immunogoldmarkierung beobachtete Plasmamembranmarkierung tatsächlich von VfPTR1 stammt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Lokalisierung von VfPTR1 in der Vakuolenmembran fraglich ist, da das VfPTR1/GFP-Fusionsprotein nicht mehr funktionell ist. Der VfPTR1 Antikörper eignet sich gut für die Immunlokalisierung mittels

Elektronenmikroskop, erkennt jedoch im Western Blot eine zusätzliche Bande, von der nicht klar ist, ob sie VfPTR1 zugeordnet werden kann.

#### 4.1.3 Phloemspezifische Expression von VfAAP1 und VfPTR1 in *P. sativum*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Aminosäurepermease VfAAP1 und der Peptidtransporter VfPTR1 unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors in Erbse exprimiert werden. Der *SUC2*-Promotor ist im Phloem aller grünen Gewebe von *Arabidopsis* aktiv, wie z. B. Rosettenblätter, Stängel und Kelchblätter (Truernit and Sauer, 1995). Während *AtSUC2* in jungen *sink*-Blättern nur an der Blattspitze exprimiert wird, ist der Promotor in voll ausgebildeten *source*-Blättern in allen Blattadern aktiv. Zusätzlich zur Expression in Blättern zeigt *AtSUC2* auch in anderen *sink*-Gewebe wie Wurzeln oder sich entwickelnden Schoten eine Aktivität. Eine Funktionalität des Promotors konnte auch in Tabak demonstriert werden (Wright et al., 2003). Somit ist anzunehmen, dass *AtSUC2* auch für die Expression in Erbse erfolgreich verwendet werden kann. Die Expression von VfAAP1 und VfPTR1 in Leitgeweben oder mit Leitgeweben assoziierten Geweben lässt auf eine Rolle bei der Phloembeladung schließen. Das Ziel dieses Ansatzes war es, die Translokation von Aminosäuren und Peptiden aus den Blättern in das Phloem zu erhöhen und somit einen gesteigerten Nährstofffluss zu erreichen. Dies könnte die Remobilisierung verbessern und es wäre möglich, dass mehr Aminosäuren und Peptide in die wachsenden Samen aufgenommen und für die Speicherproteinsynthese verwendet werden können. Dies könnte letztlich zu einer Erhöhung des Proteingehaltes in den reifen Samen führen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, für beide Konstrukte (*sucAAP* und *sucPTR*) transgene Erbsenpflanzen zu regenerieren und stabile homozygote Linien zu etablieren. Die Expression von VfPTR1 bzw. VfAAP1 in Blättern transgener Pflanzen konnte mittels RT-PCR bzw. qRT-PCR gezeigt werden. Demzufolge ist der *AtSUC2*-Promotor auch in Erbsenpflanzen aktiv und induziert die Expression der nachgeschalteten Gene. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die phloemspezifische Expression von VfAAP1 und VfPTR1 zu einer Erhöhung des Globulingehaltes in den reifen Samen führt. Dies konnte für jeweils zwei unabhängige Linien der T<sub>2</sub>-Generation von *sucAAP* bzw. *sucPTR* gezeigt werden (vgl. Abb. 3.25). Es wurde entschieden, für weitere Anzuchten nur mit der Linie 5 (*sucAAP*) bzw. 31 (*sucPTR*) weiter zu arbeiten, da diese in der T<sub>2</sub> die stärksten Effekte zeigten. Die in der T<sub>2</sub>-Generation gemessene Proteinerhöhung konnte in den Folgegenerationen bestätigt werden und betraf auch dort nur die Globulinfraction, welche den mengenmäßig größten Anteil der Speicherproteine ausmacht. Prozentual ausgedrückt lag die Steigerung des Globulingehaltes für das *sucAAP*-Konstrukt bei zwei verschiedenen Nachkommen der Linie 5 (5/3 und 5/8)

zwischen 11 % und 16 %. Das Samengewicht von sucAAP Samen war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Bei verschiedenen Nachkommen der Linie 31 (sucPTR 31/2 und 31/9) konnte eine Globulinerhöhung zwischen 10 % und 19 % ermittelt werden. SucPTR-Samen waren zum Teil schwerer als Wildtypsamen (vgl. Abb. 3.30). Bei den verschiedenen Anzuchten gab es jedoch auch Schwankungen. Die gemessenen Erhöhungen der Speicherproteine konnten nicht immer in beiden untersuchten Nachkommen gezeigt werden, was sowohl für sucAAP als auch für sucPTR galt. So hatten in der T<sub>4</sub> nur die Samen der sucAAP 5/8 erhöhte Globulinwerte, in der T<sub>5</sub> hingegen die Samen beider Nachkommen (5/3 und 5/8). Ähnlich ist es auch bei sucPTR: in der T<sub>4</sub> zeigten die Samen der Pflanzen 31/2 und 31/9 einen gesteigerten Globulingehalt im Vergleich zum Wildtyp, in der T<sub>5</sub> dagegen nur die Samen der Pflanze 31/2. Möglicherweise spielen die verschiedenen Umweltbedingungen, unter denen die Pflanzen angezogen wurden, eine Rolle. Dabei gibt es zum einen Unterschiede zwischen Phytokammer und Gewächshäusern in Bezug auf die Licht- und Temperaturregulation, zum anderen sind die Bedingungen in den Gewächshäusern in zwei aufeinanderfolgenden Jahren nicht identisch. SucPTR-Pflanzen wurden in Phytokammern (T<sub>4</sub>-Generation) bzw. in Gewächshäusern (T<sub>5</sub>-Generation) angezogen, die sucAAP-Pflanzen der T<sub>4</sub>- und T<sub>5</sub>-Generation in Gewächshäusern.

Dass Veränderungen des N-Metabolismus durch transgene Ansätze in Leguminosen meist eher eine Erhöhung des Globulingehaltes in den reifen Samen bewirken, ist bereits auch aus der Arbeit von Rolletschek et al. (2005) bekannt. Hier führt die samenspezifische Expression von *VfAAP1* in *V. narbonensis* und *P. sativum* zu einer Steigerung von 30 % (*V. narbonensis*) bzw. 43 % (*P. sativum*) im Globulingehalt. In diesen Pflanzen ist im Gegensatz zu den hier untersuchten auch der Gesamtstickstoffgehalt um 10 – 25 % erhöht. Die Albuminfraktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten sucAAP und sucPTR Samen war von der Erhöhung der Speicherproteine nicht betroffen und auch im Gesamtstickstoffgehalt konnte keine signifikante Steigerung gemessen werden. Eine Ausnahme bildet die Linie sucPTR 31/9, bei der in Samen aus Phytokammerpflanzen eine signifikante N-Erhöhung gemessen wurde. Diese konnte jedoch in der Folgegeneration, die in Gewächshäusern wuchs, nicht erneut gezeigt werden. Aus dem Gesamtstickstoffgehalt kann über die Multiplikation mit einem Faktor auf den Gesamtproteingehalt der Samen geschlossen werden (Mossé, 1990). Da die Konzentration an freien Aminosäuren in reifen Samen sehr niedrig ist (< 3 % des Gesamtstickstoffgehaltes), spiegelt der Gesamt-N-Wert direkt den Proteingehalt wieder (Rolletschek et al., 2002). Die beobachtete Erhöhung der Globuline müsste sich demzufolge zumindest tendenziell auch im N-Gehalt widerspiegeln. Die N-Werte korrelieren zwar immer mit den Globulinwerten, sind aber in den transgenen Pflanzen nicht signifikant erhöht, obwohl die Mittelwerte leicht über denen des Wildtyps liegen. Es kann spekuliert werden, dass die Pflanzen nicht mehr N aufgenommen haben.



Denkbar wäre aber auch, dass für die Bestimmung des N-Gehaltes nicht genügend Samen verwendet wurden, um signifikante Änderungen zu messen. Da der Albumingehalt in den transgenen Pflanzen nicht verringert war, kann ausgeschlossen werden, dass nur eine Verschiebung hin zu den Globulinen stattgefunden hat, ohne den Gesamtproteingehalt zu erhöhen. Ebenso konnte in den sucAAP Samen kein veränderter Stärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Dies schließt aus, dass eine verringerte Stärkesynthese zugunsten der Speicherproteinsynthese abläuft. In Freilandversuchen mit Erbsen, die *VfAAP1* samenspezifisch unter Kontrolle des *LeB4*-Promotors exprimieren, wurden in den reifen Samen verringerte Stärke- sowie Saccharosegehalte nachgewiesen (K. Weigelt, pers. Mitteilung). Es stellt sich die Frage, woher die zusätzlich benötigten Bausteine für die vermehrte Synthese von Globulinen stammen, wenn der Samen-N-Gehalt in den sucAAP-Erbsen unverändert ist. Die Bestimmung der Konzentrationen an freien Aminosäuren in den Kotyledonen während der Samenentwicklung und auch im Phloem könnte darüber Aufschluss geben. Durch die Überexpression der N-Transporter im Phloem wird eine höhere Kapazität für die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden geschaffen. Inwieweit diese auch realisiert werden kann, um tatsächlich mehr Aminosäuren und Peptide in die Samen aufzunehmen und mehr Speicherproteine zu synthetisieren, kann nicht abschließend geklärt werden. Die höhere Aufnahmekapazität erfordert auch eine vermehrte N-Aufnahme aus dem Boden, N-Fixierung und N-Verteilung sowie Remobilisierung aus vegetativen Geweben. An dieser Stelle könnte beispielsweise die N-Aufnahme über die Wurzeln zum limitierenden Faktor werden. Andererseits könnte auch spekuliert werden, ob Kompensationseffekte innerhalb der Pflanze auftreten. Möglicherweise nimmt die Konzentration anderer Proteine oder Metabolite ab, die in den durchgeführten Messungen nicht bestimmt wurden. Somit könnte die Verlagerung in Richtung der Globuline erklärt werden, ohne dass sich am Gesamtstickstoffgehalt etwas ändert. Eventuell liegt auch ein statistisches Problem vor. Der Probenumfang müsste weiter erhöht werden, um genauere Aussagen über die Proteinkonzentrationen treffen zu können.

Die hervorgerufenen Erhöhungen im Globulingehalt bei sucAAP und sucPTR Samen sind im Vergleich mit den Pflanzen, die *VfAAP1* samenspezifisch exprimieren (Rolletschek et al., 2005), geringer, aber dennoch signifikant. Möglicherweise ist der verwendete *AtSUC2*-Promotor nicht stark genug und eine Kopie des *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* Gens reicht dann nicht aus, um drastischere Änderungen im Speicherproteingehalt zu erzielen.

#### 4.1.4 Kreuzung einer sucAAP- mit einer LeB4AAP-Erbse

Bereits in den ersten Generationen der sucAAP-Erbse wurde ein erhöhter Speicherproteingehalt in den reifen Samen gemessen. Aber man konnte bereits zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass dieser Effekt nicht besonders stark ist und nur eine Insertion des *VfAAP1* Gens im Erbsengenom unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors nicht hinreichend ist, um zu deutlich höheren Samenproteingehalten zu führen. Daher entstand die Idee, homozygote sucAAP-Pflanzen mit ebenfalls homozygoten LeB4AAP-Pflanzen zu kreuzen, die *VfAAP1* samenspezifisch unter Kontrolle des *Legumin B4*-Promotors exprimieren und für die eine stabile Proteinerhöhung in den Samen bereits nachgewiesen wurde. *LeB4* ist der Promotor des *Legumin B4*-Gens aus *V. faba*, ein Mitglied der 11S Globulin-Genfamilie. *Legumin* wird vorwiegend in Samen exprimiert, Transkripte wurden aber auch in Pollen gefunden (Zakharov et al., 2004). Der *Legumin B4*-Promotor wurde bereits mehrfach für die Transformation von *V. narbonensis* und *P. sativum* verwendet (Weber et al., 1998b; Weber et al., 2000). Die Kreuzung sollte zwei Effekte miteinander kombinieren: Zum einen könnten durch die samenspezifische *VfAAP1*-Expression mehr Aminosäuren direkt in die wachsenden Samen gelangen (LeB4AAP) und zum anderen sollen aus der Remobilisierung mehr Aminosäuren über das Phloem zu den Samen transportiert werden (sucAAP). Beide Strategien stellen zusätzliche Aminosäuren für eine vermehrte Speicherproteinsynthese während der Samenentwicklung zur Verfügung.

Die genannten Erbselinien wurden gekreuzt und die Nachkommenschaftsanalyse führte zu vier individuellen Pflanzen, die sowohl homozygot für sucAAP als auch für LeB4AAP waren. Die vier doppelt homozygoten Pflanzen wurden unabhängig voneinander analysiert. Für die Kreuzungsprodukte konnte analog zu den sucAAP Pflanzen mittels qRT-PCR ebenfalls eine Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in den Blättern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.33). Die Pflanzen 58 und 27 zeigten dabei die stärkste Expression, sie lag höher als in der Elternlinie sucAAP 5/8. Bei der zweiten Elternlinie LeB4AAP 14/10 konnte wie erwartet kein PCR-Produkt in den Blättern nachgewiesen werden, da *LeB4* in Blättern nicht aktiv ist. Bei der Bestimmung der Ertragsparameter fiel zunächst auf, dass die Pflanze 27 signifikant weniger Hülsen und Samen pro Pflanze aufwies als die anderen Kreuzungsprodukte, die Elternpflanzen und der Wildtyp. Die Analysen der Inhaltsstoffe der reifen Samen ergaben, dass die Pflanze 27 die deutlichste Erhöhung des N- und Proteingehaltes zeigte. Auch die Pflanze 58 hatte einen erhöhten N- und Proteingehalt in den Samen. In Samen der Pflanzen 27 und 58, die aus der Phytokammeranzucht stammten, konnte nicht nur eine statistisch signifikante Erhöhung des N- und Globulingehaltes im Vergleich zum Wildtyp, sondern auch zu den Elternpflanzen sucAAP und LeB4AAP nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.35). Da die Ausgangslinie

sucAAP 5/8 keine signifikante Erhöhung im Gesamt-N zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die höheren Werte in den Kreuzungsprodukten ausschließlich auf den Einfluss des LeB4AAP Konstruktes zurückzuführen sind. Das durchschnittliche Samengewicht der Pflanzen 27 und 58 war im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Bei Samen, die aus Gewächshäusern stammten, konnte die Proteinerhöhung im Vergleich zu den Elternpflanzen nicht bestätigt werden. Die Globulinwerte der Elternlinie LeB4AAP 14/10 waren bereits sehr hoch und konnten in den Kreuzungsprodukten nicht weiter gesteigert werden. Weiterhin fiel auf, dass der Albumingehalt in Samen der Pflanze 27 sowohl bei Phytokammer- als auch bei Gewächshauspflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt war. Somit geht der erhöhte Globulingehalt zum Teil zu Lasten der Albumine. Da Globuline den mengenmäßig größeren Anteil der Speicherproteine ausmachen und dabei etwa 3 x höher liegen als die Albumine (Saharan and Khetarpaul, 1994), ist das Gesamtprotein dennoch erhöht. Der Stärkegehalt war in reifen Samen aus Phytokammer-Pflanzen der Linie 14/10 und des Kreuzungsproduktes 58 im Vergleich zum Wildtyp leicht erniedrigt, der Saccharosegehalt war dagegen in diesen Pflanzen erhöht. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Umweltbedingungen in der Phytokammer zurückzuführen und stammt nicht vom Einfluss des Transgens. Die Samen werden in der Phytokammer teilweise nicht vollständig reif, d.h. die Stärkeeinlagerung wird nicht abgeschlossen. Dadurch erklärt sich der erhöhte Saccharosegehalt in den reifen Samen. Samen aus Gewächshauspflanzen zeigten keine signifikante Änderung des Stärke- und Saccharosegehaltes, obwohl die Mittelwerte in den transgenen Samen leicht unter denen des Wildtyps lagen. Eine Ausnahme bilden die Samen des Kreuzungsproduktes 58, die einen signifikant niedrigeren Saccharosegehalt aufwiesen. Die Erhöhung des N-Gehaltes machte sich bei sich entwickelnden Samen in der Linie 27 und 14/10 bereits ab dem 22. DAF bemerkbar, wohingegen ein erhöhter Globulingehalt erst ab dem 30. DAF messbar wird. Der *LeB4*-Promotor ist während der mittleren und späten Samenentwicklung in den Speicherparenchymzellen aktiv, wenn die Speicherproteine synthetisiert werden. Der *AtSUC2*-Promotor sollte während der Samenfüllung in den *source*-Blättern so lange aktiv sein, wie Nährstoffe aus ihnen remobilisiert werden können.

Jedoch ist zu vermuten, dass der erhöhte Speicherproteingehalt in den Samen der Pflanze 27 zu einem verringerten Samenertrag führt. Die Pflanzen entwickelten deutlich weniger Hülsen und Samen, die Samengröße hingegen war mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Anzahl der Blüten unterschied sich bei Pflanze 27 nicht von der der anderen Linien und des Wildtyps, jedoch konnten deutlich weniger Blüten auch Samenansätze entwickeln. Die Ursachen dafür sind unklar. Möglicherweise sind Umweltbedingungen, die nur diese Pflanze betreffen, dafür verantwortlich und rufen den gesunkenen Ertrag hervor. In Samen der Pflanze 58, die ebenfalls mehr Proteine haben, wurde diese Ertragsminderung nicht in

diesem Maße beobachtet. Die mittlere Samenanzahl war im Vergleich zum Wildtyp etwas reduziert, diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant.

Generell haben die Samen aller Pflanzen aus den Gewächshäusern einen höheren Stickstoff- und Proteingehalt als Pflanzen aus Phytokammern. Da die Gewächshauspflanzen im Boden und nicht in Töpfen angezogen werden, kann die Nodulation der Wurzeln stärker ausgeprägt werden und die Nährstoffversorgung ist insgesamt deutlich besser, was sich in den Inhaltsstoffen niederschlägt. Die Erde in den Gewächshäusern wurde nur vor der Aussaat gedüngt, wohingegen die Töpfe in den Phytokammern regelmäßig gedüngt werden. Die Düngung mit mineralischem Stickstoff in Form von Nitrat wirkt sich hemmend auf die Knöllchenbildung aus (Streeter, 1985).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Samen der Kreuzungsprodukte einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Speicherproteingehalt besitzen, dieser jedoch nicht stabil bei mehreren Anzuchten auch höher als der der Elternpflanzen war, vor allem der Linie LeB4AAP 14/10. Weitere Wiederholungen wären nötig, um eine endgültige Aussage darüber zu treffen, ob mittels Kreuzung ein höherer Proteingehalt in den reifen Samen erzielt werden kann.

## **4.2 Aminosäuretransporter aus Gerste**

Die meisten bisher funktionell charakterisierten N-Transporter stammen aus Arabidopsis. Über N-Transporter aus Kulturpflanzen ist noch relativ wenig bekannt. Die Gerste stellt innerhalb der Kulturpflanzen und vor allem der Getreide eine Modellpflanze dar. Gerstensamen sind spezialisiert auf die Speicherung hauptsächlich von Stärke, aber auch von Proteinen. Es wird vermutet, dass Aminosäuretransporter eine Rolle bei der Remobilisierung von Reserven und dem Transport in die sich entwickelnden Samen spielen. Es ist daher wichtig, Transportvorgänge und die dafür verantwortlichen Transporter an der Kulturpflanze Gerste direkt zu untersuchen. Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war folglich die Identifizierung von Aminosäuretransportern, vor allem solcher mit einer möglichen Funktion bei der Samenbeladung.

### 4.2.1 HvAAP1 und HvAAP2 sind funktionelle Aminosäuretransporter

In Arabidopsis gibt es acht AAP-Mitglieder, von denen sieben in der Lage sind, *in vitro* Aminosäuren aufzunehmen (Fischer et al., 1995; Kwart et al., 1993; Okumoto et al., 2002). Die Suche in der EST-Kollektion ergab, dass es auch in Gerste acht AAP-Mitglieder zu geben scheint (vgl. Abb. 3.37). Insgesamt gibt es etwa 53 Gene für Aminosäuretransporter

im Genom von Arabidopsis (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Wipf et al., 2002) und etwa 59 Gene im Reisgenom. Darunter sind die AAPs die am besten untersuchten Transporter von organischem Stickstoff (Fischer et al., 1998; Wipf et al., 2002). Aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften und Expressionsmuster scheinen die Transporter aber nicht redundant zu sein, sondern jeder übernimmt spezifische Funktionen hinsichtlich der Stickstoffverteilung in der Pflanze (Fischer et al., 1998; Fischer et al., 1995; Rentsch et al., 1998). Die Anzahl an Genen, die am Aminosäuretransport beteiligt sind, ist in Arabidopsis und Reis deutlich höher als in einzelligen Organismen, was auf eine wichtige Rolle im Langstreckentransport von Assimilaten in höheren Pflanzen schließen lässt (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Ausgehend von cDNAs putativer Aminosäuretransporter aus Arabidopsis konnten über den Vergleich mit orthologen Sequenzen aus Reis und Weizen letztlich 22 ESTs mit einer möglichen Funktion im Aminosäuretransport aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert werden. Darunter befanden sich die vollständigen Klone *HvAAP1* und *HvAAP2*, die der Familie der Aminosäurepermeasen (AAP) angehören. Die AAPs ordnen sich der Familie der Aminosäuretransporter (*amino acid transporter family*, ATF, vgl. Abschnitt 1.5) unter. Die isolierten Gersten-AAPs sind stark hydrophob, was für Membranproteine typisch ist. Für die beiden Vollängen-Klone *HvAAP1* und *HvAAP2* wurde eine Struktur von neun bzw. zehn membranspannenden Domänen vorhergesagt. Dies korreliert mit der typischen Struktur von 9 – 11 Transmembrandomänen von Transportern der ATF-Familie. Chang and Bush (1997) schlagen aufgrund experimenteller Daten ein Modell mit elf Transmembrandomänen für die AAP-Familie aus Arabidopsis vor, wobei der N-Terminus zytosolisch und der C-Terminus extrazellulär ausgerichtet ist. Die gleiche Lage der N- und C-Termini ist auch für *HvAAP1* wahrscheinlich. Bei *HvAAP2* wurde für den N-Terminus mit etwas größerer Wahrscheinlichkeit eine extrazelluläre Lokalisierung vorhergesagt. Eine zytosolische Lage, die eher mit dem Modell der AAPs übereinstimmen würde, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

*HvAAP1* und *HvAAP2* zeigen auf Aminosäureebene größere Ähnlichkeiten zu den Arabidopsis Transportern AAP2-4 als zu AAP1 und AAP5-8 (vgl. Tab. 3.3). Inwieweit dies relevant für die Funktion dieser AAPs ist, bleibt zu untersuchen.

Für beide AAPs konnte durch funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae*-Aminosäuretransportmutanten eine Transportaktivität nachgewiesen werden. Die Expression von heterologen Proteinen in Hefe hat zum einen den Vorteil der schnellen und kostengünstigen Kultivierung der Zellen. Zum anderen sind die Hefezellen aufgrund eines entsprechenden sekretorischen Stoffwechselweges in der Lage, post-translationale Modifikationen durchzuführen und die Fremdproteine korrekt zu sekretieren. Die Verwendung von Hefestämmen mit Mutationen in den endogenen Transportern für die

funktionelle Komplementation ist in der Literatur mehrfach beschrieben. So wurden beispielsweise verschiedene Aminosäurepermeasen aus Arabidopsis durch Transformation von Hefemutanten mit einer Arabidopsis-cDNA-Bank identifiziert (Frommer et al., 1993). HvAAP1 und HvAAP2 konnten mehrere Hefemutanten mit Defekten in unterschiedlichen Aminosäuretransportsystemen funktionell komplementieren, d.h. die Hefezellen konnten die entsprechenden Aminosäuren aus dem Medium aufnehmen. Dabei scheinen beide Gersten-AAPs ein eher breites Substratspektrum zu besitzen, da auch strukturell sehr unterschiedliche Aminosäuren transportiert werden (vgl. Tabelle 3.4). Teilweise haben HvAAP1 und HvAAP2 ein überlappendes Substratspektrum. So zeigten *HvAAP1*- und *HvAAP2*-exprimierende Hefezellen Wachstum auf Glutamat, Arginin, Lysin, Phenylalanin, Methionin, Isoleucin und Valin. HvAAP1 scheint zusätzlich GABA und HvAAP2 Prolin, Citrullin und Histidin zu transportieren. Welche dieser Aminosäuren bevorzugt transportiert werden, könnte in Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren genauer untersucht werden. Ebenso kann auf diese Weise herausgefunden werden, ob es sich bei HvAAP1 und HvAAP2 um hoch- oder niedrigaffine Aminosäuretransporter handelt. Vergleicht man die Substratspezifität der Gersten-AAPs mit den ihnen auf Proteinebene ähnlichsten Transportern AAP2-4 aus Arabidopsis, findet man Übereinstimmungen vor allem mit AtAAP3, der genau wie HvAAP1 und HvAAP2 die basischen As Lysin und Arginin sowie Phenylalanin und Isoleucin transportiert (Fischer et al., 2002).

#### 4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung und Expression von HvAAP1 und HvAAP2 – eine mögliche Rolle bei der Seneszenz

Bei den Versuchen, die beiden Gersten-AAPs über translationale Fusionen mit GFP intrazellulär zu lokalisieren, kann nur für HvAAP1 eine Aussage getroffen werden. Eine Expression des HvAAP2GFP-Fusionskonstruktes konnte weder in transient transformierten Gerste- bzw. Arabidopsis-Protoplasten noch in stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen nachgewiesen werden. Das Konstrukt wurde während aller Klonierungsschritte per Sequenzierung auf eine korrekte Orientierung überprüft, hauptsächlich am Übergang des *HvAAP2*-Gens zum GFP. Jedoch wurde keine vollständige Sequenzierung vorgenommen. Durch die Klonierung bedingte Veränderungen wie z.B. *frameshift*-Mutationen in der Sequenz sind möglich, die eine korrekte Transkription und Translation des entsprechenden Proteins verhindern. Die DNA selbst konnte in den transgenen Pflanzen mittels PCR nachgewiesen werden.

Die Aminosäurepermease HvAAP1 konnte über GFP-Fluoreszenz intrazellulär nachgewiesen werden. Dabei gab es beim Vergleich zwischen transient transformierten

Protoplasten und transgenen Pflanzen Unterschiede hinsichtlich der GFP-Signale. Während die GFP-Fluoreszenz in den Suspensionsprotoplasten vorwiegend an inneren Membransystemen und nur zum Teil an der Plasmamembran detektiert wurde, konzentrierte sich die Fluoreszenz bei den Protoplasten, die aus transgenen Pflanzen isoliert wurden, hauptsächlich entlang der Plasmamembran. Bei den zusätzlich gefundenen Signalen im Zytoplasma könnte es sich um HvAAP1GFP-Fusionsproteine handeln, die zwar bereits synthetisiert, aber noch nicht bis an die Plasmamembran transportiert wurden. Warum sich die Verteilung der GFP-Signale in transient transformierten Protoplasten von der in stabil transformierten Pflanzen unterscheidet, kann nicht genau erklärt werden. Möglicherweise wurde die Integration in die Plasmamembran in den Protoplasten nicht korrekt ausgeführt und das Fusionsprotein blieb im endogenen Membransystem zurück. Es könnte sich auch um artifizielle Signale handeln, die aufgrund der Überexpression entstehen. In *P. pastoris* führt die Überexpression von GFP zur Bildung von fluoreszierenden Partikeln innerhalb der Zelle (Zupan et al., 2004). Denkbar wäre aber auch eine komplexe Regulation dieses Transporters, welche eine Lokalisierung in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten notwendig macht. Da HvAAP1 in der Lage war, Hefemutanten zu komplementieren, kann man davon ausgehen, dass dieser Transporter in den *HvAAP1* exprimierenden Hefezellen in der Plasmamembran lokalisiert ist. Dies muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass dies auch die Lokalisierung des nativen Proteins *in planta* ist. Aufgrund der Daten der GFP-Lokalisierung in transgenen Arabidopsis-Pflanzen liegt eine Plasmamembranlokalisierung jedoch nah. Bisher wurden von den Arabidopsis-AAPs nur AtAAP1 und AtAAP3 intrazellulär lokalisiert. AtAAP1 wurde in der Plasmamembran von Wurzelepidermiszellen sowie in der äußeren Zellschicht der Wurzelhaube lokalisiert (Lee et al., 2007). Dies lässt auf eine Funktion bei der Aufnahme von Aminosäuren in die Wurzelzellen schließen. Okumoto et al. (2004) konnten zeigen, dass AtAAP3 in der Kernmembran, Organell-ähnlichen Strukturen und in der Plasmamembran lokalisiert ist, was möglicherweise für eine dynamische Relokalisierung innerhalb der Zelle spricht.

*HvAAP1* wird am stärksten in frühen maternalen Samentteilen wie Gynoecium und Perikarp (0. und 4. DAF) exprimiert. Das Perikarp und die Narbe stellen in frühen Entwicklungsstadien Speicherorgane dar, in denen vor allem Stärke gespeichert wird. Bereits mit Beginn der Befruchtung finden zunächst in der Narbe und etwas später auch im Perikarp aktive Remobilisierungsprozesse statt. Bei diesen Prozessen gelangen die aus der Stärkehydrolyse entstandenen Zucker zunächst von der Narbe in das Perikarp (0. DAF), und später dann in das Stärkeendosperm. Das Perikarp unterliegt dabei Seneszenz-ähnlichen Prozessen. Bisher wurde nur die Remobilisierung der Stärke beschrieben (Weschke et al., 2000), über Proteine ist hingegen nichts bekannt. Somit kann nur vermutet werden, dass HvAAP1 als Aminosäuretransporter eine Funktion während der Nährstoffremobilisierung im Perikarp

übernimmt. Beim Präparieren der Gewebe bleibt die Narbe Bestandteil der Perikarp-Fraktion, somit kann durch die Northern Analyse nicht festgestellt werden, ob *HvAAP1* in der Narbe oder im Perikarp exprimiert wird. *In situ* Hybridisierungen könnten hierüber genaueren Aufschluss geben.

Weiterhin konnten hohe *HvAAP1*-Transkriptmengen in den ährennahen Organen wie Deck- und Hüllspelze sowie im Knoten nachgewiesen werden. Dabei war die Expression jeweils am 12. DAF deutlich höher als am 4. DAF. 12 DAF befinden sich Gerste-Karyopsen bereits in der Speicherphase, d. h. Speicherprodukte wie Stärke und Proteine werden synthetisiert und im Endosperm abgelagert. Für die Synthese von Samenspeicherstoffen werden verschiedene Assimilate aus den transienten Speichermolekülen in vegetativen Geweben aktiv remobilisiert und in die sich entwickelnden Körner transportiert. Verschiedene Gewebe, wie z. B. Fahnenblatt, Spelzen und Stängel mit Knoten unterliegen Remobilisierungsprozessen. In den genannten Organen findet Seneszenz statt. Die Spelzen und der erste Knoten unterhalb der Ähre sind die der Ähre am nächsten gelegenen Organe, aus denen Reservestoffe remobilisiert werden können. Im Vergleich zum Fahnenblatt tragen diese Gewebe dabei sicherlich einen geringeren aber durchaus wichtigen Teil bei. Seneszenzvorgänge im Fahnenblatt, Stängel und in den Spelzen setzen erst ein, wenn die Samenentwicklung in den Ähren begonnen hat, während die älteren Blätter bereits viel früher der Seneszenz unterliegen (Wiedemuth et al., 2005). Das Expressionsmuster gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass *HvAAP1* an mit Seneszenz-gekoppelten Transportvorgängen beteiligt sein könnte. Die Arbeit von Van der Graaff et al. (2006) zeigt, dass verschiedene Gene von Aminosäure- und Peptidtransportern während der Blattseneszenz in *Arabidopsis* verstärkt exprimiert werden, vor allem solche, für die eine Lokalisierung in der Plasmamembran vorhergesagt wird. Die vermehrte Expression dieser N-Transporter korreliert mit der während der Seneszenz massiv stattfindenden Proteindegradation. Die daraus resultierenden Abbauprodukte müssen exportiert und zu den *sink*-Geweben, zu denen vor allem sich entwickelnde Samen gehören, transportiert werden (Himmelblau and Amasino, 2001; Soudry et al., 2005). Dafür werden Aminosäure- und auch Peptidtransporter benötigt (Hörtensteiner and Feller, 2002). Die Hypothese, *HvAAP1* könnte an Seneszenzvorgängen beteiligt sein, wird durch das Expressionsmuster einer Seneszenz-spezifischen Cysteinproteinase aus Gerste unterstützt (vgl. Abb. 3.43 C). Während der Seneszenz werden die zellulären Proteine verstärkt abgebaut und dieser Vorgang korreliert mit einer verstärkten Expression von Protease-Genen, speziell von Cysteinproteinasen (Martinez et al., 2007). Die Expression der Cysteinproteinase korreliert mit der von *HvAAP1* vorwiegend in den Spelzen und im Knoten. Ein ähnliches Expressionsverhalten zeigt sich aber auch in Antheren und Gynoecium sowie im frühen Perikarp.



*HvAAP1*-Transkripte wurden auch während der späten Samenentwicklung im Endosperm vom 16. DAF und in Karyopsen vom 20. DAF nachgewiesen. Über eine zusätzliche Funktion von *HvAAP1* bei der Samenbeladung kann nur spekuliert werden. Möglicherweise trägt *HvAAP1* dazu bei, Aminosäuren in das Endosperm aufzunehmen, wo diese dann für die Speicherproteinsynthese verwendet werden können. Um hierüber genaue Aussagen zu treffen, müssten beispielsweise *in situ* Hybridisierungen zur Lokalisierung des Genproduktes gemacht werden.

*HvAAP2*-mRNA wurde vor allem im Knoten am 12. DAF nachgewiesen und zusätzlich in Wurzeln (vgl. Abb. 3.43 B). In allen anderen untersuchten Geweben waren *HvAAP2*-Transkripte kaum nachweisbar. Bei diesem Transporter ist ein Zusammenhang mit Seneszenzvorgängen weniger wahrscheinlich, allein die Expression im Knoten spricht dafür. In anderen Geweben, die am 12. DAF Seneszenz unterliegen, konnte keine Übereinstimmung zwischen der Expression von *HvAAP2* und der Cysteinproteinase nachgewiesen werden. *HvAAP2* wird in diesen Geweben kaum exprimiert. Das Expressionsmuster in Wurzeln müsste durch *in situ* Hybridisierungen weiter analysiert werden, um auf die genaue Funktion von *HvAAP2* zu schließen. Möglicherweise besitzt *HvAAP2* eine Funktion bei der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Boden und deren anschließender Verteilung.

Vergleicht man die Expressionsmuster von *HvAAP1* und *HvAAP2* mit denen der Arabidopsis-Transporter *AtAAP2-4*, zu denen die Gersten-AAPs auf Aminosäureebene die größten Ähnlichkeiten aufweisen, findet man nur teilweise Korrelationen. *AtAAP3* wird ausschließlich im Phloem von Wurzeln exprimiert, was auf eine Rolle bei der Aufnahme und Verteilung von Aminosäuren hindeutet (Okumoto et al., 2004). *AtAAP2*-, *AtAAP4*- und *AtAAP5*-Transkripte wurden im Stängel nachgewiesen, wo sie an der Speicherung, an der Rückgewinnung entlang des Transportweges oder am Austausch von Aminosäuren zwischen Xylem und Phloem beteiligt sein könnten (Fischer et al., 1995). *AtAAP4* und *AtAAP5* werden auch in voll entwickelten Blättern exprimiert, wo sie eine Rolle bei der Beladung des Phloems mit Aminosäuren spielen könnten. Für *AtAAP1* und *AtAAP2* wird außerdem eine Expression in sich entwickelnden Schoten und keimenden Samen beschrieben. Ersteres lässt auf eine Funktion bei der Bereitstellung von organischem Stickstoff für die sich entwickelnden Samen, letzteres auf eine Rolle bei der Remobilisierung von gespeichertem Stickstoff aus keimenden Samen schließen (Kwart et al., 1993).

### 4.2.3 Identifizierung einer putativen GABA-Permease

Neben den beiden Aminosäurepermeasen HvAAP1 und HvAAP2 konnte aus der Gersten-EST-Kollektion eine putative GABA-Permease identifiziert werden, die als HvGAP1 bezeichnet wurde. GABA-Permeasen (GAP) gehören der übergeordneten APC-Familie an (vgl. Abb. 3.48), und für HvGAP1 wurde eine für diese Transporter typische Struktur mit 12 Transmembrandomänen vorhergesagt. Bisher wurde nur ein GABA-Transporter aus Pflanzen funktionell beschrieben, AtGAT1 aus Arabidopsis (Meyer et al., 2006), der zur übergeordneten ATF-Familie gehört. AtGAT1 ist ein protonenabhängiger hochaffiner GABA-Transporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist. Er unterscheidet sich von den bekannten GABA-Transportern aus Säugern, Bakterien und Hefe. AtGAT1 wird am stärksten in Blüten exprimiert und die Expression kann durch erhöhte GABA-Level, die bei Verwundung oder Seneszenz entstehen, induziert werden (Meyer et al., 2006). Aus der GAP-Familie hingegen ist noch kein Mitglied in Pflanzen charakterisiert worden. Zu HvGAP1 gibt es acht orthologe Sequenzen im Reisgenom und eine in Arabidopsis. Diese putativen Aminosäuretransporter grenzen sich phylogenetisch deutlich von Mitgliedern der ATF-Familie ab (vgl. Abb. 3.48).

*HvGAP1* wird stark in Keimlingen exprimiert, dabei weisen Keimlingswurzeln, die auf feuchtem Filterpapier gewachsen sind, die höchsten Transkriptmengen im Vergleich zur Anzucht auf Erde oder Agar auf. Möglicherweise trägt Nährstoffmangel, der als Stressfaktor wirkt, zu dieser starken Expression bei und induziert *HvGAP1*. Weiterhin wird *HvGAP1* in Antheren, Granne sowie Deck- und Hüllspelzen am 12. DAF exprimiert. Dieses Muster ähnelt dem der Aminosäurepermease HvAAP1, die ebenfalls in den Spelzen exprimiert wird. Es kann vermutet werden, dass *HvGAP1* eventuell auch eine Funktion während der Remobilisierungsphase und Seneszenz übernimmt. Die Expression von *HvGAP1* ist außerdem stark lichtreguliert, wie in dem Versuch mit zu verschiedenen Tageszeiten geernteten Keimlingen gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.51). Durch *in situ* Hybridisierungen an Gersten-Karyopsen wurde *HvGAP1*-mRNA in den inneren Zellreihen des Nucellus am Tag der Blüte sowie in der nucellaren Projektion am 10. DAF nachgewiesen. Über die Funktion des putativen Transporters in diesen Geweben kann derzeit nur spekuliert werden: Die nucellare Projektion stellt eine Verbindung zwischen maternalem und filialem Gewebe dar und entlässt Assimilate aus den maternalen Samenteilern in die Endosperm-Kaverne. Dabei werden Teile des Gewebes nach und nach abgebaut und die Inhaltsstoffe der absterbenden Zellen für die Ernährung des Embryos bzw. des Endosperms verwendet (Greenwood et al., 2005; Radchuk et al., 2006; Smart, 1994; Wu and Cheung, 2000).

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen zur Überprüfung der Funktionalität des Transporters und dessen intrazellulärer Lokalisierung kann geschlossen werden, dass HvGAP1 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist. Ein Hinweis darauf ist die fehlende Transportaktivität von HvGAP1 im für die funktionelle Komplementation verwendeten Hefestamm 22574d. In *S. cerevisiae* gibt es drei Systeme für GABA-Transport, die generelle Aminosäurepermease GAP1, die Prolinpermease PUT4 und die GABA-spezifische Permease UGA4 (Grenson et al., 1987). Im Stamm 22574d (Jauniaux et al., 1987) sind alle drei o. g. Transporter mutiert, demzufolge können die Hefezellen nicht auf Medium wachsen, welches Prolin, Citrullin oder GABA als einzige Stickstoffquelle enthält. HvGAP1 konnte diese Mutationen nicht komplementieren. Zum anderen konnte bei den Versuchen, HvGAP1 über eine translationale Fusion mit GFP intrazellulär zu lokalisieren, keine eindeutige Aussage erhalten werden. Die Verteilung der GFP-Signale in transient transformierten Gerste-Protoplasten aus demselben Transformationsansatz war sehr unterschiedlich. Am häufigsten wurden Markierungen entlang der Vakuolenmembran, der Kernmembran und fleckenartig im Zellinneren detektiert. In einigen Protoplasten war auch die Plasmamembran markiert, aber immer nur zusätzlich zu anderen intrazellulären Membranen. GABA wird im Zytosol der pflanzlichen Zelle synthetisiert, kommt aber auch in Chloroplasten, der Vakuole und im Apoplast vor (Tilsner et al., 2005). Außerdem wird davon ausgegangen, dass GABA in die Mitochondrien transportiert wird, wo es anschließend über den *GABA-shunt* abgebaut wird. Folglich werden GABA-Transporter an vielen unterschiedlichen Membranen benötigt. Nachdem eine reine Plasmamembranlokalisierung unwahrscheinlich war, die GFP-Signale des HvGAP1GFP-Fusionsproteins in einigen Protoplasten aber Hinweise auf eine Lokalisierung des Transporters in Mitochondrien gaben, wurde überprüft, ob HvGAP1 eine Rolle beim Eintransport von GABA in die Mitochondrien, in denen der *GABA-shunt* abläuft, spielen könnte.

Da der *GABA-shunt* in ähnlicher Weise auch in Hefen abläuft, wurde dieser Test an isolierten Mitochondrien aus *HvGAP1* exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt. Für diesen Versuch wurde ebenfalls der *S. cerevisiae* Stamm 22574d verwendet. Jedoch ergab die Bestimmung der Atmungsraten in der isolierten Mitochondriensuspension keine Hinweise auf eine funktionelle Aktivität von HvGAP1 beim Eintransport von GABA in die Mitochondrien. In Mitochondrien aus mit *HvGAP1* transformierten Hefezellen wurde nach Zugabe von GABA kein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, der ein Maß für die Atmung darstellt, gemessen. Nur bei Zugabe von Succinat als direktes Substrat für die Zellatmung (Positivkontrolle) wurde von den Mitochondrien Sauerstoff verbraucht. Daraus kann geschlossen werden, dass GABA anscheinend nicht als Substrat verwertet wurde. Eine Lokalisierung von HvGAP1 in der Mitochondrienmembran ist unwahrscheinlich.

Unter den drei GABA-Transportern in *S. cerevisiae* codiert *uga4* für eine GABA-spezifische Permease, deren Expression stark durch GABA induziert wird (André et al., 1993). UGA4 hat auf Proteinebene mit 30 % identischen Aminosäuren die höchsten Identitäten aller Hefe-GABA-Transporter zu HvGAP1. Uemura et al. (2004) konnten zeigen, dass UGA4 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist und GABA-Transport katalysiert. Transporter in der Vakuolenmembran übernehmen eine wichtige Funktion bei der Konzentrationserhaltung verschiedener Substanzen wie Polyamine im Zellplasma von Hefezellen, indem diese in die oder aus der Vakuole transportiert werden. Da UGA4 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist, muss GABA mittels anderer Transporter über die Plasmamembran in die Hefezelle aufgenommen werden. Dies geschieht möglicherweise über die generelle Aminosäurepermease GAP1 oder die Prolinpermease PUT4. Analog zu UGA4 könnte versucht werden, HvGAP1 auf dieselbe Weise in der Vakuolenmembran zu lokalisieren, indem man den Transporter heterolog in den von Uemura et al. (2004) verwendeten Hefestämmen exprimiert. Die Frage über eine mögliche vakuoläre Lokalisierung des HvGAP1 Proteins bleibt zunächst offen.

### 4.3 Weiterführende Arbeiten

#### 4.3.1 Leguminosen-Transporter

Einige Ansätze für weiterführende Experimente sind in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt worden. Die Arbeiten sollten sich dabei zum einen auf die Expression und Lokalisierung von VfPTR1 konzentrieren, und zum anderen auf die transgenen Pflanzen, die weiteren Analysen unterzogen werden sollen.

So könnten beispielsweise die Zelltypen, in denen *VfPTR1* exprimiert wird, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie genauer bestimmt werden. Dies wäre vor allem für Leitgewebe wichtig, um zu klären, ob *VfPTR1* im Phloem exprimiert wird. Die Analysen könnten sowohl an Keimlingen als auch an sich entwickelnden Samen durchgeführt werden. Keimlinge eignen sich gut, da mit Ausnahme wachsender Samen in einfacher Weise alle Zelltypen und Organe analysiert werden können, einschließlich seneszierender und remobilisierender Gewebe (Kotyledonen). Weitere *in situ* Hybridisierungen wären eine sinnvolle Ergänzung, um die ersten Ergebnisse zu verifizieren. Die Lokalisierung von VfPTR1 an der Plasmamembran müsste bestätigt werden. Ein neuer Versuch, transgene Erbsenpflanzen zu erzeugen, die *VfPTR1 antisense* unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren, würde Aufschluss über die mögliche ratenlimitierende Rolle von VfPTR1 *in vivo* geben.

Für die transgenen Erbsenpflanzen, die *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors exprimieren, bieten sich weiterführende Analysemöglichkeiten an. Beispielsweise

könnte bestimmt werden, ob die N-Metabolitkonzentrationen (Aminosäuren, Gesamtstickstoff) in den transgenen Pflanzen verändert ist. Dazu kann aus Stängeln der Phloemsaft gewonnen und entsprechend analysiert werden. Weiterhin angedacht sind [<sup>15</sup>N]-Markierungsexperimente. [<sup>15</sup>N] markierte Aminosäuren und Dipeptide könnten dazu direkt in Stängel, Wurzel, Blätter oder Kotyledonen appliziert werden und deren Dynamik und Verlagerung innerhalb der Pflanze dann mittels Emissionsspektroskopie untersucht werden. Generell sollen die transgenen Pflanzen bezüglich der Samenentwicklung einer genaueren Metabolitanalyse (z. B. Zucker, Aminosäuren) unterzogen werden. Außerdem könnten Freilandversuche dazu beitragen, die erhaltenen Ergebnisse unter verschiedenen Umweltbedingungen zu verifizieren.

Die Transformation und Regeneration von Erbse und die anschließende Etablierung homozygoter Linien dauert im Vergleich zu Arabidopsis deutlich länger, weshalb Analysen der transgenen Pflanzen erst zum Ende dieser Arbeit möglich waren. Um die Ergebnisse der Analysen der transgenen und gekreuzten Pflanzen in naher Zukunft publizieren zu können, sind die bereits beschriebenen genaueren Untersuchungen der Stoffwechselfvorgänge notwendig, die mehr Aufschluss über Veränderungen des Metabolismus dieser Pflanzen geben. Die detaillierte Analyse der transgenen Pflanzen soll dazu beitragen, die Veränderungen in bestimmten Stoffwechselwegen zu verstehen, die durch die Überexpression des Aminosäure- bzw. Peptidtransporters hervorgerufen wurden. Es können dadurch transgene Modelle geschaffen werden, die mit anderen, in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen, transgenen Leguminosen-Modellen verglichen werden können.

#### 4.3.2 Gerste-Transporter

Für eine umfassende Charakterisierung der AAP-Familie aus Gerste sollte das Expressionsmuster der sechs übrigen Mitglieder bestimmt werden, um Kandidaten mit einer samenspezifischen Expression zu identifizieren. Nach der Isolation von vollständigen Klonen müsste analog zu HvAAP1 und HvAAP2 die funktionelle Charakterisierung in Hefen durchgeführt werden. Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren könnten in Hefemutanten Aufschluss über das bevorzugte Substratspektrum der funktionellen Transporter HvAAP1 und HvAAP2 liefern. Weitere Northern und *in situ* Hybridisierungen würden helfen, ein genaueres Bild über die Expression dieser Transporter zu erhalten. Außerdem könnten somit zusätzliche Assoziationen zur Seneszenz und Samenfüllung hergestellt werden. Eine für die nähere Zukunft geplante Publikation könnte sich mit der Charakterisierung der AAP-Familie aus Gerste befassen, mit Schwerpunkt auf den beiden bisher funktionell charakterisierten Transportern HvAAP1 und HvAAP2. Die funktionelle Testung im heterologen Hefesystem, die intrazelluläre Lokalisierung von HvAAP1 und erste

Expressionsanalysen mittels Northern Blot wurden bereits durchgeführt. Ergänzende Experimente sind jedoch noch notwendig. Mit der Bestimmung des Aminosäuresubstratspektrums und vor allem mit weiteren Expressionsanalysen könnte ein genaueres Bild über die mögliche Funktion dieser Transporter *in planta* entstehen. *In situ* Hybridisierungen sollten Auskunft über die Zell-Spezifität der Expression geben. Im Vergleich zur Expression der Cysteinproteinase könnte der Bezug zur Seneszenz weiter vertieft werden. Die resultierenden Daten würden die geplante Publikation vervollständigen. Um Aussagen über die spezifischen Funktionen innerhalb der Pflanze zu bekommen, wären ebenfalls transgene Ansätze notwendig, in denen die Transporter überexprimiert oder reprimiert werden. Dafür wird eine längere Zeit benötigt und Erkenntnisse aus diesen Versuchen könnten die Basis für eine zweite Publikation darstellen. In Bezug auf die putative GABA-Permease HvGAP1 ist es wichtig, den Transporter funktionell zu charakterisieren. Außerdem wird eine Lokalisierung mittels eines spezifischen Antikörpers (bereits vorhanden) angestrebt. Weiterführende Expressionsanalysen könnten die vermutete Rolle von HvGAP1 bei der Seneszenz und Stressantwort unterstützen und würden Teil einer weiteren Publikation sein.

Bisher dienen die Ergebnisse der Vorbereitung eines Projektantrages innerhalb einer DFG-Forscherguppe zum Thema Seneszenz, Remobilisierung und Samenenfüllung bei Kulturpflanzen.