

5 Zusammenfassung

Der Samenproteingehalt ist ein wichtiges Ertrags- und Qualitätsmerkmal von Kulturpflanzen, und er ist abhängig vom verfügbaren Stickstoff in den Pflanzen. Aminosäuren stellen dabei die wahrscheinliche Langstreckentransportform für organischen Stickstoff dar. Ihre Verteilung innerhalb der Pflanze erfolgt über das Phloem. Kleine Peptide entstehen vor allem in Geweben und zu Zeitpunkten rascher Proteolyse, z. B. während Seneszenz oder Keimung, und werden von Peptidtransportern transportiert. Die Samenentwicklung von Leguminosen und Gerste ist das Hauptuntersuchungsgebiet der Arbeitsgruppe Genwirkung am IPK. Die Charakterisierung von N-Transportern in den beiden Kulturpflanzen soll helfen, diese Transportprozesse besser zu verstehen. Des Weiteren soll der Transfer von organischem Stickstoff in sich entwickelnde Samen und dessen Regulation analysiert werden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand zum einen die funktionelle Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1 und der Aminosäurepermease VfAAP1 in Leguminosen in Relation zur Proteinakkumulation im Samen. Weiterhin sollten Aminosäuretransporter aus Gerste identifiziert sowie molekular und funktionell charakterisiert werden.

5.1 Leguminosen-Transporter

- Ausgehend von der Sequenz der *VfPTR1* cDNA konnte mittels *genome walking* der *PTR1*-Promotor isoliert werden. Eine Promotoraktivität konnte für das 1,8 kb große DNA-Fragment in mit pPTR1GUS transient transformierten *V. faba* Protoplasten gezeigt werden.
- In transgenen Pflanzen, die mit pPTR1GUS bzw. pPTR1GFP transformiert wurden, konnte eine Expression der entsprechenden Reportergene in den Leitgeweben, Epidermis- und Parenchymzellen von Wurzeln sowie in Wurzelhaaren nachgewiesen werden. Bei GUS-Färbungen zeigte sich Aktivität des *PTR1*-Promotors zusätzlich in den Parenchymzellen des Stängels. Während der Samenentwicklung in mit pPTR1GFP transformierten Erbsen konnte eine GFP-Fluoreszenz in der Epidermis sowie den Parenchymzellen der Kotyledonen detektiert werden. Zusätzlich konnte mittels Northern Blot Analysen an *V. faba* Keimlingen gezeigt werden, dass *VfPTR1* stark in Wurzelspitzen, im Hypokotyl und den Kotyledonen exprimiert wird.
- Die Experimente zur intrazellulären Lokalisierung des VfPTR1-Proteins gaben zunächst Hinweise auf eine Lokalisierung in der Vakuolenmembran. Dies wurde anhand eines GFP-Fusionskonstruktes in Protoplasten demonstriert. Da das VfPTR1/GFP Fusionsprotein in entsprechend transformierten *S. cerevisiae* Zellen

nicht mehr funktionell war, bestehen Zweifel an dieser Lokalisierung. Mit einem spezifisch gegen den N- und C-Terminus von VfPTR1 gerichteten Peptidantikörper konnte mittels Immunogoldmarkierung elektronenmikroskopisch eine spezifische Markierung der Plasmamembran gezeigt werden.

- Eine Expression von *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors in Erbse führt zu einer moderaten Erhöhung des Speicherproteingehaltes in reifen Samen, der nur die Globulinfraktion betrifft. Eine Erhöhung des Gesamt-N war nicht signifikant.
- Durch die Kreuzung von *sucAAP* Erbsen mit einer *LeB4AAP* Erbsenlinie konnten doppelt homozygote Pflanzen für *VfAAP1* erzeugt werden, die die Aminosäurepermease sowohl phloem- als auch samenspezifisch exprimieren. Die Kreuzungspflanzen zeigten eine Erhöhung des N- und Proteingehaltes in reifen Samen im Vergleich zum Wildtyp und der Elternlinie 5/8. Eine N- und Proteinerhöhung im Vergleich zu beiden Elternpflanzen (5/8 und 14/10) konnte nur in Samen von in Phytokammern gewachsenen Pflanzen gezeigt werden.

5.2 Gerste-Transporter

- Ausgehend von bekannten Sequenzen für Aminosäuretransporter aus Arabidopsis konnten über Sequenzvergleiche acht putative Aminosäuretransporter aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert werden, die der AAP-Familie angehören. Darunter befanden sich die vollständigen cDNAs von *HvAAP1* und *HvAAP2*, die typische Merkmale dieser Transporter aufwiesen.
- Northern Blot Analysen haben gezeigt, dass *HvAAP1* am stärksten in den frühen maternalen Samentteilen sowie in ährennahen Organen (Spelzen, Knoten) zum Zeitpunkt der Samenfüllung exprimiert wird. Das Expressionsmuster korreliert weitgehend mit dem einer Cysteinproteinase aus Gerste, die einen Seneszenzmarker darstellt. Im Gegensatz zu *HvAAP1* konnte *HvAAP2*-mRNA nur im Knoten (12. DAF) und in Wurzeln nachgewiesen werden.
- Die Funktionalität von *HvAAP1* und *HvAAP2* wurde durch die Komplementation verschiedener *S. cerevisiae* Aminosäuretransport-Mutanten gezeigt. Eine intrazelluläre Lokalisierung mittels Fusion der Proteine an GFP gelang nur für *HvAAP1*, das Fusionsprotein wurde in Protoplasten aus stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert.

- Neben den Aminosäuretransportern der AAP-Familie wurde zusätzlich eine putative GABA-Permease (APC-Familie) aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert. *HvGAP1* wird am stärksten in Keimlingswurzeln exprimiert, Transkripte wurden aber auch in Antheren und Gynoecium sowie der Granne und den Spelzen (12. DAF) gefunden. Auch hier korreliert die Expression mit der der Cysteinproteinase. Die *HvGAP1*-Expression scheint außerdem stark lichtreguliert zu sein. Bisherige Versuche zur funktionellen Testung verliefen nicht erfolgreich und auch die intrazelluläre Lokalisierung konnte nicht abschließend geklärt werden.
- Die Arbeiten an den Gerste-Transportern waren vorbereitend für einen Projektantrag zur Analyse der Wechselwirkung zwischen Seneszenz und Samenfüllung.