

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologe Markus Schirmer  
aus Heidelberg**

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2004

**Klonierung, Charakterisierung und Überexpression  
von Pyrophosphatasen aus *Beta vulgaris* L.**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch  
Prof. Dr. Rüdiger Hell

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch für die Überlassung des spannenden Themas und die vertrauensvolle Zusammenarbeit. Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hell danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Den Verantwortlichen der Südzucker AG möchte ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts und die fruchtbaren Diskussionen danken, insbesondere Herrn Prof. Dr. Markwart Kunz, Herrn Dr. Mohammad Munir und Herrn Dr. Karsten Harms. Für die Bereitstellung von Pflanzen- und Genmaterial danke ich den beteiligten Mitarbeitern der KWS Saat AG; stellvertretend sei Herr Dr. Hinrich Harling genannt.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Rafael Ratajczak, dessen Hilfsbereitschaft mir ein stetes Vorbild sein wird. Für die technische Unterstützung bei der Säulenchromatographie danke ich Frau Dr. Angelika Irmeler (Interdisziplinäres Forschungszentrum für Umweltsicherung der Universität Gießen) sowie Frau Irene König (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg).

Herzlich danken möchte ich allen Kollegen vom Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, die mich während meiner Promotion unterstützt haben, insbesondere: Andreas, mit seinen leuchtenden Reportern stets ein leuchtendes Vorbild · Danièle für die einmalige Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors · Heike für die ersten Blaufärbungen im PPase-Assay · Jan für die würdige Nachfolge als „Rübentyp“ · Jochen für die Hilfe bei der Proteinüberexpression und besondere Betzenberg-Besuche („Vonne nei!“) · Maja für wertvolle Labortipps und unvergessliche Handball-Anekdoten · Markus für das Teilen des Schreibtischs und Mitteilen wertvoller Computertricks · Sebo für nächtliche Diskussionen von Sartre bis S-PPase · Stefan für die Unterstützung zum Schluss · Steffen für den Durchblick im Datenschwungel und unerreichte Mensaspisen-Poesie · Stina für die Röllchen und besonders kritisches Lesen.

Schließlich gilt besonderer Dank meinen Eltern für Ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen sowie meinen Freunden und Brüdern dafür, dass sie mich während der letzten Jahre ertragen haben. Und natürlich Ute: Danke für alles.

# Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BSP	<i>Beta Soluble Pyrophosphatase</i> , lösliche Pyrophosphatase aus <i>Beta vulgaris</i> L.
BTP	Bis-Tris-Propan
BVP	<i>Beta Vacuolar Pyrophosphatase</i> , vakuoläre Pyrophosphatase aus <i>Beta vulgaris</i> L.
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CWI	Zellwandinvertase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat), Ellmansches Reagenz
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $1 \times g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GABI	Genomanalyse im Biologischen System Pflanze
$\gamma$ -ECS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$\lambda$	Strahlungswellenlänge
LB	Luria-Bertani (Bakteriennährlösung)
M	mol pro Liter
MES	Morpholinethansulfonat
MOPS	Morpholinpropansulfonat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Murashige & Skoog (Pflanzenmedium)
NEM	N-Ethylmaleinimid
OCS	Octopinsynthase
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offenes Leseraster
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 25:24:1 (v:v:v)

PCR	Polymerasekettenreaktion
PFK	Phosphofruktokinase
PPF	Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-Phosphotransferase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
Pi	anorganisches Phosphat
PMF	<i>Proton Motive Force</i> , Protonen-motorische Kraft
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPase	Pyrophosphatase
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
S-PPase	<i>soluble inorganic pyrophosphatase</i> , lösliche Pyrophosphatase
SPP	Saccharosephosphat-Phosphatase
SPS	Saccharosephosphat-Synthase
SuSy	<i>Sucrose Synthase</i> , Saccharose-Synthase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	units (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
V-PPase	vakuoläre H <sup>+</sup> -Pyrophosphatase
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Biologie der Zuckerrübe .....	3
2.2	Der Saccharose-Metabolismus.....	4
2.2.1	Synthese.....	4
2.2.2	Transport.....	4
2.2.3	Speicherung .....	6
2.3	Anorganisches Pyrophosphat in der Pflanzenzelle .....	6
2.3.1	Entstehung .....	6
2.3.2	Lösliche Pyrophosphatasen.....	7
2.3.3	PPi-verbrauchende Reaktionen in Pflanzen.....	8
2.3.4	Auswirkungen von Wachstum und Stress auf den Primärstoffwechsel und die Expression PPi-verbrauchender Enzyme .....	10
2.4	Transgene Pflanzen mit erniedrigtem Pyrophosphat Spiegel oder veränderter Expression Pyrophosphat-abhängiger Enzyme .....	15
2.4.1	Analyse von Transformanten mit ektopischer Überexpression einer Pyrophosphatase aus <i>E. coli</i> .....	15
2.4.2	Analyse von Kartoffelpflanzen mit verringerter Expression von SuSy, UGPase und PFP.....	16
2.4.3	Organismen mit veränderter Expression der V-PPase.....	17
2.5	Fragestellung.....	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
3.1	Vakuoläre H <sup>+</sup> -Pyrophosphatasen in <i>Beta vulgaris</i> .....	20
3.1.1	Klonierung der Vollängen-cDNA-Sequenz von <i>BVPI</i> .....	20
3.1.2	Studien zur Expression vakuolärer Pyrophosphatasen in <i>B. vulgaris</i> .....	23
3.1.3	Sauerstoffkonzentration und Transkriptspiegel der tonoplastidären Protonenpumpen in verschiedenen Zonen der Rübe.....	24
3.1.4	Promotoraktivitäten vakuolärer Pyrophosphatasen in <i>B. vulgaris</i> -Suspensionskultur unter besonderer Berücksichtigung von Phosphatmangel .....	27
3.2	Lösliche Pyrophosphatasen in <i>B. vulgaris</i> .....	29
3.2.1	Klonierung der ersten löslichen Pyrophosphatase aus <i>B. vulgaris</i> (BSP1).....	29
3.2.2	Identifizierung weiterer Gene für S-PPasen im Zuckerrüben Genom .....	29
3.2.3	Klonierung von drei weiteren Vollängen-cDNAs löslicher Pyrophosphatasen aus <i>B. vulgaris</i> .....	31
3.2.4	Analyse und Vergleich der Primärstruktur der vier S-PPasen aus <i>B. vulgaris</i> .....	34
3.2.5	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung.....	35
3.2.6	Studien zur Expression von BSP1 .....	37
3.2.7	BSP1 und BSP2: Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen.....	39
3.2.8	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine BSP1 und BSP2.....	42
3.3	Transgene Pflanzen mit Überexpression von vakuolärer und löslicher Pyrophosphatase aus <i>B. vulgaris</i> .....	50
3.3.1	Herstellung der Konstrukte.....	50
3.3.2	Pflanzentransformation und Selektion positiver Transformanten .....	51

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1	In der Zuckerrübe herrschen hypoxische Verhältnisse .....	54
4.2	Vakuoläre H <sup>+</sup> -Pyrophosphatasen in <i>Beta vulgaris</i> .....	55
4.2.1	Die Expression der V-PPase erfolgt in Abhängigkeit von Gewebe und Entwicklungsstadium.....	55
4.2.2	Die Expression von V-PPase und V-ATPase in der Speicherwurzel ist unabhängig von der Sauerstoffkonzentration überall gleich hoch .....	56
4.2.3	V-PPase und V-ATPase sind in der Speicherwurzel am Tonoplasten aktiv.....	57
4.3	Lösliche PPasen in <i>Beta vulgaris</i> .....	59
4.3.1	Das Genom von <i>Beta vulgaris</i> besitzt mindestens 4 verschiedene Gene für S-PPasen....	60
4.3.2	Die cytosolischen S-PPasen der Pflanzen gleichen den prokaryontischen, die plastidären hingegen den S-PPase der Pilze und Tiere .....	60
4.3.3	Die Lokalisierung von BSP1-BSP3 ist cytosolisch, die von BSP4 hingegen plastidär ...	65
4.3.4	BSP1 wird vor allem in jungen und heterotrophen Geweben exprimiert .....	66
4.3.5	Erste biochemische Charakterisierung rekombinanter S-PPasen aus Pflanzen .....	68
4.3.6	Bedeutung der S-PPasen für die Regulation des cytosolischen PPI-Spiegels.....	74
4.4	Transgene Pflanzen mit Überexpression von vakuolärer und/oder löslicher Pyrophosphatase aus <i>B. vulgaris</i> .....	76
4.4.1	Überexpression der homologen V-PPase AVP1 führt zu erhöhter Salztoleranz und Meristemaktivität in <i>A. thaliana</i> .....	78
4.4.2	Aktueller Stand der Experimente zur Pflanzentransformation .....	79
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>81</b>
5.1	Pflanzenmaterial .....	81
5.1.1	Zuckerrüben.....	81
5.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
5.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> .....	82
5.2.1	Stämme .....	82
5.2.2	Anzucht und Bestimmung der Zelldichte .....	82
5.2.3	Glyzerolstocks .....	83
5.2.4	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	83
5.2.5	Transformation von Bakterien.....	83
5.3	DNA-Techniken.....	84
5.3.1	cDNA-Synthese .....	84
5.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	84
5.3.3	Plasmide.....	86
5.3.4	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen.....	87
5.3.5	DNA-Gelelektrophorese .....	88
5.3.6	DNA-Ligation.....	88
5.3.7	Isolierung hochmolekularer genomischer DNA .....	89
5.3.8	Southernblot.....	90
5.4	RNA-Techniken.....	91
5.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	91
5.4.2	Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen.....	92
5.4.3	Fällung von RNA.....	92
5.4.4	Northernblot.....	93
5.5	Protein-Techniken.....	95
5.5.1	Proteinisolierung.....	95
5.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	96
5.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	97
5.5.4	Coomassiefärbung und Konservierung von PAA-Gelen .....	97
5.5.5	Westernblot-Analyse .....	98

5.5.6	Aktivitätsassays .....	99
5.5.7	FPLC-Analyse .....	100
5.6	Messung der Sauerstoffkonzentration im Rübengewebe .....	100
5.7	Ballistische Transformation .....	100
5.7.1	Funktionsprinzip der Partikelkanone .....	101
5.7.2	Vorbereitung des Zellmaterials .....	102
5.7.3	Partikelpräparation .....	102
5.7.4	Beschüsse mit GFP/RFP-Konstrukten zur Lokalisierung von BSP1 .....	102
5.7.5	Beschüsse mit Promotor-Reportergenkonstrukten .....	104
5.8	Überexpression von BSP1 und BSP2 in <i>E. coli</i> .....	107
5.8.1	Klonierung der Konstrukte .....	107
5.8.2	Induktion und Aufreinigung .....	107
5.9	Herstellung stabil transformierter Pflanzen .....	107
5.9.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelter Gentransfer .....	108
5.9.2	Der Pflanzentransformationsvektor pBinAR .....	108
5.9.3	Herstellung der Konstrukte .....	109
5.9.4	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>floral dip</i> .....	110
5.10	Computergestützte Sequenzanalysen .....	113
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>114</b>



# 1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden membranständige vakuoläre  $H^+$ -Pyrophosphatasen (V-PPasen) und lösliche Pyrophosphatasen (S-PPasen) der Zuckerrübe untersucht. Nach der vorherrschenden Meinung erfolgt die Akkumulation von Saccharose in den Vakuolen des Speicherparenchyms durch einen Saccharose/ $H^+$ -Antiporter unter Energetisierung des Tonoplasten durch die vakuoläre V-ATPase und/oder V-PPase. Letztere zählt neben der Pyrophosphat-abhängigen Phosphofruktokinase und der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase zu den speziellen pflanzlichen Enzymen, die Pyrophosphat (PPi) als alternative Energiequelle zu ATP verwenden können. Es wird vermutet, dass diese Enzyme vor allem unter hypoxischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielen, indem sie ATP-unabhängige Stoffwechselwege ermöglichen. Hier wurde gezeigt, dass in der Zuckerrübe hypoxische Bedingungen herrschen: Die  $O_2$ -Konzentration fiel von 12,7% (v/v) im Bereich der Rinde auf 3,4% in 2,5 cm Tiefe ab. In Northernblot-Analysen wurde aber keine Korrelation zwischen der  $O_2$ -Konzentration und der Expression von V-ATPase und V-PPase gefunden.

Das Vorkommen PPi-utilisierender Enzyme im Cytosol pflanzlicher Zellen hatte andere Autoren zu der Hypothese geführt, dass lösliche Pyrophosphatasen (S-PPasen) auf die Plastiden beschränkt seien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier vollständige cDNA-Sequenzen von S-PPasen aus *Beta vulgaris* (BSP1-BSP4) kloniert. Reporterprotein-Studien, die mit der BSP1-Sequenz durchgeführt wurden, bestätigten die Vorhersage der *in silico*-Analyse, nach der es sich bei BSP1 um ein cytosolisches Protein handelt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität ist diese Lokalisierung auch für BSP2 und BSP3 anzunehmen. Die Hypothese einer rein plastidären Lokalisierung pflanzlicher S-PPasen kann demnach nicht aufrechterhalten werden. Die abgeleitete Proteinsequenz von BSP4 weist hingegen ein plastidäres Transitpeptid auf und hat nur geringe Ähnlichkeit zu den drei cytosolischen Isoformen. Durch Vergleiche mit S-PPasen anderer Species wurden typische Sequenzmotive identifiziert, die die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung von S-PPasen allein aufgrund der Primärstruktur ermöglichen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die cytosolischen Isoformen der Pflanzen prokaryontischen S-PPasen gleichen, während die plastidären Isoformen näher mit den S-PPasen der Pilze und Tiere verwandt sind.

Die Proteine BSP1 und BSP2 wurden in *E. coli* überexprimiert und anschließend unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Nachdem der Funktionsnachweis erbracht worden war, erfolgte eine umfangreiche biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine, die nur in Gegenwart bestimmter zweiwertiger Kationen - präferentiell  $Mg^{2+}$  - Aktivität zeigten.  $Ca^{2+}$ -Ionen hatten einen inhibitorischen Effekt. Für BSP1 und BSP2 wurden pH-Optima von 7,5 und 8,0 sowie Temperaturoptima von 53 °C bzw. 58 °C bestimmt. Die  $K_m$ -Werte der beiden S-PPasen sind mit 51 und 53  $\mu M$  PPI 10-20mal höher als die für V-PPasen bekannten Werte.

Die Expression sowohl von löslichen als auch vakuolären Pyrophosphatasen in *B. vulgaris* unterliegt einer gewebe- und entwicklungsabhängigen Regulation. Die höchsten Transkriptspiegel fanden sich in Suspensionskulturzellen, jungen Blättern und Wurzeln sowie bei Rüben in der Präspeicherphase. In *Source*-Blättern und reifen Rüben war die Expression der V-PPase dagegen reduziert und die der S-PPase kaum nachweisbar. Diese Verteilung deutet auf eine besondere Bedeutung der Pyrophosphatasen für Wachstumsprozesse hin. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen  $K_m$ -Werte könnte die physiologische Bedeutung der cytosolischen S-PPasen demnach darin bestehen, in metabolisch aktiven Zellen den PPI-Spiegel im Sinne eines Kompromisses auf ein Niveau zu senken, bei dem einerseits Biosyntheseprozesse ungehemmt ablaufen und andererseits Enzyme mit hoher Affinität zu PPI dieses Substrat als alternative Energiequelle zu ATP nutzen können.

In einem transgenen Ansatz wurden *B. vulgaris* (Nutzpflanze) und *A. thaliana* (Modellpflanze) mit dem Ziel einer Erhöhung der *proton motive force* am Tonoplasten mit dem Gen für eine vakuoläre  $H^+$ -Pyrophosphatase (*BVPI*) transformiert. Die Hypothese, dass dies zu einer verbesserten Transportleistung vakuolärer Antiportsysteme führt und sich somit Salztoleranz (bei *A. thaliana*) oder ein gesteigerter Saccharosegehalt (bei *B. vulgaris*) vermitteln lassen, kann nun experimentell geprüft werden. Um unterscheiden zu können, ob die möglicherweise veränderten Wachstumseigenschaften der Transformanten einer erhöhten Energetisierung des Tonoplasten oder aber der gesteigerten Hydrolyse von Pyrophosphat zuzuschreiben sind, wurden außerdem erstmals Transformanten hergestellt, die das Gen einer pflanzlichen S-PPase überexprimieren. Schließlich wurde ein Doppelkonstrukt kloniert, mit dem beide PPase-Typen gleichzeitig zur Überexpression gebracht werden konnten.

## Summary

### Cloning, characterization, and overexpression of pyrophosphatases from *Beta vulgaris* L.

Membrane-bound H<sup>+</sup>-pyrophosphatases (V-PPases) and soluble pyrophosphatases (S-PPases) of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) were investigated. According to the prevailing opinion, the accumulation of sucrose takes place in the vacuoles of the taproot parenchyma cells via a sucrose/H<sup>+</sup> antiporter that is driven by V-ATPase and/or V-PPase. The latter ranks - beside PPI-dependent phosphofructokinase (PFP) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) - among the special plant enzymes that can use cytosolic PPI as an energy source alternative to ATP. It is assumed that these enzymes play an important role particularly under hypoxic conditions by activating ATP-independent metabolic pathways. Here it was shown that hypoxic conditions prevail within the taproot: the measured O<sub>2</sub> concentration fell from 12.7% (v/v) under the surface to 3,4% in the layer 2,5 cm beneath. However, in Northern blot analyses no correlation between the O<sub>2</sub> concentration and the expression of V-ATPase and V-PPase was found.

The occurrence of PPI-utilizing enzymes in the cytosol of plant cells has led other authors to the hypothesis that soluble pyrophosphatases (S-PPases) are restricted to the plastids. In the context of this work, four full-length cDNAs of S-PPases from *Beta vulgaris* (*BSP1-BSP4*) were cloned. Using reporter gene constructs of the *BSP1* sequence, the result of an *in silico* analysis identifying *BSP1* as a cytosolic protein was confirmed. Due to the high sequence identity, a cytosolic localization is also likely for *BSP2* and *BSP3*. The hypothesis of a strict limitation of soluble S-PPases to the plastids can therefore not be maintained. The derived protein sequence of *BSP4* contains a transit peptide for plastids and shares only little sequence identity with the three cytosolic isoforms. By comparison with protein sequences from other species, typical sequence motifs of plant S-PPases were identified that allow the identification of the subcellular localization due to the primary structure. Remarkably, the cytosolic isoforms of plants were found to resemble prokaryotic S-PPases while the plastidic isoforms are related more closely to S-PPases of fungi and animals.

The proteins *BSP1* and *BSP2* were overexpressed in *E. coli* and then isolated under native conditions. Proof of function was followed by extensive biochemical characterization of the recombinant enzymes which are active only in the presence of specific divalent cations, preferentially Mg<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> showed an inhibitory effect.

For BSP1 and BSP2 pH optima of 7.5 and 8.0 as well as temperature optima of 53 °C and 58 °C were determined. The  $K_m$  values for PPi are 51 and 53  $\mu\text{M}$ , being 10-20fold higher than those reported for plant V-PPases.

The expression both of soluble and vacuolar pyrophosphatases in *B. vulgaris* was found to be dependent on the tissue type and its developmental stage. Transcript levels were high in suspension culture cells, sink leaves, and young (tap) roots. In source leaves and mature storage roots the expression of V-PPase was reduced and S-PPase transcripts hardly detectable. This expression pattern points to a special role of pyrophosphatases for growth processes. Considering the different  $K_m$  values, the physiological significance of cytosolic S-PPases could consist in lowering the PPi concentration in metabolically active cells to a level that allows biosynthetic processes to occur unrestrainedly on the one hand and that enables enzymes with high affinity for PPi to use this substrate as an alternative energy source to ATP on the other hand.

In a transgenic approach *Beta vulgaris* (crop plant) and *Arabidopsis thaliana* (model plant) were transformed with the gene for an  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase (*BVPI*) with the aim of an increased proton motive force at the tonoplast. The hypothesis that this transgene accelerates transport processes catalyzed by tonoplast antiporters leading to an increased salt tolerance (*A. thaliana*) or sucrose content (*B. vulgaris*) can now be tested experimentally. In addition, plants overexpressing a soluble pyrophosphatase gene (*BSP1*) were generated in order to distinguish if the possibly changed growth characteristics of the transformants are a consequence of an increased tonoplast energization or an accelerated hydrolysis of pyrophosphate. Finally, a double construct was cloned in order to overexpress both types of pyrophosphatases simultaneously.

## 2 Einleitung

Die Zuckerrübe ist die einzige Saccharose liefernde Nutzpflanze der gemäßigten Breiten und daher von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Rübenzucker macht heute etwa 38% der Weltzuckerproduktion aus. Allein in Deutschland wurden 1999/2000 auf etwa 490.000 ha Zuckerrüben angebaut und daraus fast 4,4 Millionen Tonnen Zucker erzeugt. Der Großteil des gewonnenen Zuckers wird für die menschliche Ernährung verwendet, doch als nachwachsender Rohstoff gewinnt er für die chemische Industrie an Bedeutung, beispielsweise für die Erzeugung von Ethanol als Treibstoff. Die Untersuchungen hinsichtlich der Frage, welche molekularen Mechanismen der Saccharosesynthese und -speicherung in der Zuckerrübe zugrunde liegen, stehen noch am Anfang. Dagegen sind die Verhältnisse bei der Stärke speichernden Kartoffel gut untersucht. Anhand von umfangreichen physiologischen Studien und transgenen Ansätzen konnte hier ein enger Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Pyrophosphatstoffwechsel festgestellt werden.

### 2.1 Biologie der Zuckerrübe

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* DÖLL) ist eine Varietät der Chenopodiaceen-Art *Beta vulgaris* L., zu der außerdem die landwirtschaftlich ebenfalls bedeutsamen Kulturformen Rote Rübe, Runkelrübe und Mangold gehören (Franke, 1997). Als Stammform gilt die an Mittelmeer- und Nordseeküste beheimatete *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) THELL. Die Zuckerrübe ist ein zweijähriges Gewächs, das im ersten Jahr an gestauchter Achse eine Blattrosette sowie eine fleischige Rübe ausbildet. Letztere besteht zum größten Teil aus der Hauptwurzel und zu einem geringeren Teil aus dem Hypokotyl. Die Rübe zeichnet sich weiterhin durch ein atypisches Dickenwachstum aus, bei dem von innen nach außen immer wieder neue Kambien angelegt werden, die sekundäres Xylem, Phloem und Parenchymzellen bilden. Auf diese Weise entstehen konzentrische Xylemringe, die jeweils voneinander durch eine breite Schicht Phloemparenchymzellen getrennt sind. Die Zellen, die von den innersten 6 der 12-15 Meristemringe gebildet werden, werden dabei besonders groß und machen 75% des reifen Rübenkörpers aus (Schneider et al., 1999). Das Parenchym dient der Speicherung von Saccharose, deren Gehalt heute als Ergebnis von fast 200 Jahren Züchtung bis zu 21% (w/w), bezogen auf das Frischgewicht, betragen kann. Die Bildung der bis zu 2 m hohen verzweigten Infloreszenz erfolgt – eine frostfreie Überwinterung vorausgesetzt - im zweiten Jahr. Jeder Teilblütenstand bildet 2-4 einsamige

Nüsschen aus, die an der Basis miteinander verwachsen und daher bei der Herstellung von Monogerm Saatgut mechanisch voneinander getrennt werden müssen. Zur Gewinnung der Saccharose werden die Rüben am Ende der Vegetationsperiode des ersten Jahres geerntet. Bei der heute üblichen maschinellen Ernte werden die Rüben geköpft (dekapitiert), um den Blattanteil zu entfernen, und gleichzeitig gerodet. Die Extraktion der Saccharose muss so schnell wie möglich erfolgen, da bei der Lagerung erhebliche stoffwechselbedingte Verluste entstehen.

## **2.2 Der Saccharose-Metabolismus**

### **2.2.1 Synthese**

Die Saccharosesynthese findet im Cytosol der Blattmesophyllzellen statt. Ein Teil der Triosephosphate, die im Stroma der Chloroplasten im Calvinzyklus gebildet werden, wird über einen Phosphat-Translokator exportiert (Flügge und Heldt, 1991). Damit nicht mehr Triosephosphat aus dem Calvinzyklus entnommen wird, als für die Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors und den Aufbau von Stärke nötig ist, unterliegen einige der an der Saccharosesynthese beteiligten Enzyme einer strengen Regulation. Dazu gehört die Fructose-1,6-Bisphosphatase (EC 3.1.3.24), die - nach der Bildung von Fructose-1,6-Bisphosphat aus 2 Triosephosphaten - die Umwandlung in Fructose-6-Phosphat unter Abspaltung von anorganischem Phosphat katalysiert. Das Enzym wird u. a. durch den Metaboliten Fructose-2,6-Bisphosphat allosterisch inhibiert, dessen Bildung wiederum durch hohe Triosephosphatspiegel gehemmt wird. Auch die Saccharosephosphat-Synthase (SPS; EC 2.4.1.14) unterliegt einer strikten Kontrolle durch Metabolite (Aktivierung durch Glucose-6-Phosphat, Inaktivierung durch Phosphat) und Phosphorylierung, die in Abwesenheit von Licht geschieht und zur Inaktivierung führt. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Fructose-6-Phosphat und UDP-Glucose zu UDP und Saccharose-6-Phosphat, die durch die anschließende Dephosphorylierung von Saccharose-6-Phosphat zu Saccharose durch die Saccharosephosphat-Phosphatase (SPP; EC 3.1.3.24) thermodynamisch irreversibel wird.

### **2.2.2 Transport**

Der Transport der Saccharose aus den Blättern (*Source*) hin zu den Verbrauchs- und Speicherorten (*Sink*) über das Phloem erfolgt nach der Druckstromtheorie im Massenstrom (Münch, 1930). Ob die Be- und Entladung des Phloems bei der Zuckerrübe auf symplastischem oder apoplastischem Wege erfolgt, ist noch nicht geklärt. Bei der Kartoffel

sind im Hinblick auf die Entladung umfangreiche Studien unternommen worden. Mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie, Autoradiographie und biochemischen Analysen wurde nachgewiesen, dass es in der sehr frühen Phase der Knollenbildung zu einer Umstellung bei der Entladung kommt (Viola et al., 2001): Während die unterirdischen Sprosse (Stolonen) unter Ausbildung langer Internodien wachsen, ist die Phloementladung apoplastisch. Im Einklang damit steht die hohe Aktivität der Zellwand-Invertase (CWI), die zur Hydrolyse der Saccharose in Glucose und Fructose führt. Die Aufnahme der Hexosen ins Cytosol erfolgt über spezifische Transporter. Zeitgleich mit dem Einsetzen der Knollenbildung in der subapicalen Zone der Stolonen und der Synthese von Stärke kommt es dann zu einem Wechsel zu symplastischer Entladung. Damit verbunden ist ein drastischer Abfall der CWI-Aktivität und eine erhöhte Aktivität der Saccharose-Synthase (SuSy). Dieses Enzym ist im Cytosol lokalisiert und katalysiert die Reaktion von Saccharose und UDP zu Fructose und UDP-Glucose (Appeldoorn et al., 1997). UDP-Glucose wird von der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) mit Hilfe von Pyrophosphat in Glucose-6-Phosphat und UTP umgewandelt.

Die Umstellung vom Invertase- zum SuSy-abhängigen Abbau der Saccharose hat vermutlich mehrere Gründe. Zum einen dienen Zucker in *Sink*-Gewebe nicht nur als Energielieferanten, sondern auch als Signalmoleküle, wie Studien vor allem an wachsenden Samen gezeigt haben (Wobus und Weber, 1999). Ein hohes Verhältnis von Hexosen zu Saccharose fördert die Zellteilung, während im umgekehrten Fall die Differenzierung in Speicherparenchymzellen erfolgt. Während der Zellteilungsphase werden die Hexosen aus der über das Phloem angelieferten Saccharose durch Zellwand-Invertasen produziert, deren Aktivität während der Speicherphase dann stark absinkt. Ein anderer Grund ist wahrscheinlich der unterschiedliche ATP- und O<sub>2</sub>-Bedarf der alternativen Saccharoseabbauwege in den immer kompakter werdenden Speichergewebe (vgl. Abb. 2-2 und Abschnitt 2.3.4.3).

Vor diesem Hintergrund ist bemerkenswert, dass bei der Zuckerrübe die Transkriptspiegel zweier CWI-Isoformen nur während der frühen Phase der Rübenbildung (bis 6 Wochen nach Aussaat) hoch sind. Bereits zwei Wochen später ist in diesem Gewebe kein Transkript mehr nachweisbar, woran sich bis zum Ende der Vegetationsperiode nichts ändert (Rosenkranz, unveröffentlichte Ergebnisse). Des Weiteren konnte an 3-4 Monate alten *B. vulgaris*-Pflanzen gezeigt werden, dass die Expression der Saccharose-Synthase (SuSy) in der Rübe hoch ist, während weder in Blättern noch in Wurzeln SuSy-Transkript nachweisbar war (Hesse und

Willmitzer, 1996). Allerdings impliziert dies noch keine symplastische Entladung, da auch eine apoplastische Entladung der Saccharose mit anschließendem Transport in das Cytosol möglich wäre. Ein Saccharose/H<sup>+</sup>-Symporter wurde bereits kloniert (*BvSUT1*) und ein Ortholog aus Kartoffel (*StSUT1*) durch Expression in *Xenopus*-Oocyten charakterisiert (Boorer et al., 1996).

### 2.2.3 Speicherung

Nach dem Modell von (Fieuw und Willenbrink, 1990) wird die Saccharose aus dem Phloem im Rübenparenchym durch Invertase und/oder SuSy gespalten, um einerseits einen steilen Gradienten zwischen *Source*- und *Sink*-Gewebe aufrechtzuerhalten und andererseits den Energiebedarf der Zellen zu decken. Da ein Großteil der gemessenen SPS-Aktivität (vgl. 2.2.1) mit der Tonoplastenfraktion assoziiert war, gehen die Autoren davon aus, dass es an der Vakuolenmembran zur Re-Synthese von Saccharose kommt, die dann mit Hilfe eines Saccharose/H<sup>+</sup>-Antiport-Mechanismus in die Vakuole transportiert wird (Willenbrink et al., 1984; Briskin et al., 1985; Echeverria und Gonzalez, 2000). Voraussetzung dafür ist die Errichtung einer *proton motive force* (PMF) am Tonoplasten (s. Abb. 2-2) durch die H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase (V-PPase) und die H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase). Der Anteil, den dabei jede der beiden Protonenpumpen trägt, ist offenbar variabel (vgl. 2.3.4.5).

Sowohl für die Aktivität der V-PPase als auch den Saccharoseabbau über SuSy und UGPase wird anorganisches Pyrophosphat (PPi) als Substrat benötigt. In den nächsten Abschnitten wird daher der einzigartige PPi-Stoffwechsel der Pflanzen vorgestellt.

## 2.3 Anorganisches Pyrophosphat in der Pflanzenzelle

### 2.3.1 Entstehung

Anorganisches Pyrophosphat (PPi) entsteht ubiquitär als Nebenprodukt zahlreicher Biosyntheseprozesse, in denen energiereiche Nucleosidtriphosphate bei Aktivierungs- oder Polymerisationsschritten hydrolysiert werden (Abb. 2-1). Zu diesen Prozessen zählen unter anderem die Synthese von Nucleinsäuren, die für die Proteinsynthese notwendige Beladung von tRNAs mit Aminosäuren sowie die Fettsäure- und Isoprenoid-Synthese. Speziell in der pflanzlichen Zelle existiert eine Reihe zusätzlicher Biosyntheseprozesse, bei denen PPi entsteht. Dazu zählen die in den Plastiden stattfindende Stärkesynthese, die an der



Plasmamembran ablaufende Bildung von Cellulose sowie die Saccharosesynthese im Cytosol von photosynthetisch aktiven Zellen (Stitt, 1998). Auch bei der Assimilation von Nährstoffen kommt es zur Bildung von PPi, so z.B. bei der im Cytosol stattfindenden Umwandlung von Sulfat zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS), womit PPi eine wichtige Stellung bei der Schwefel-Assimilation einnimmt (du Jardin et al., 1995).

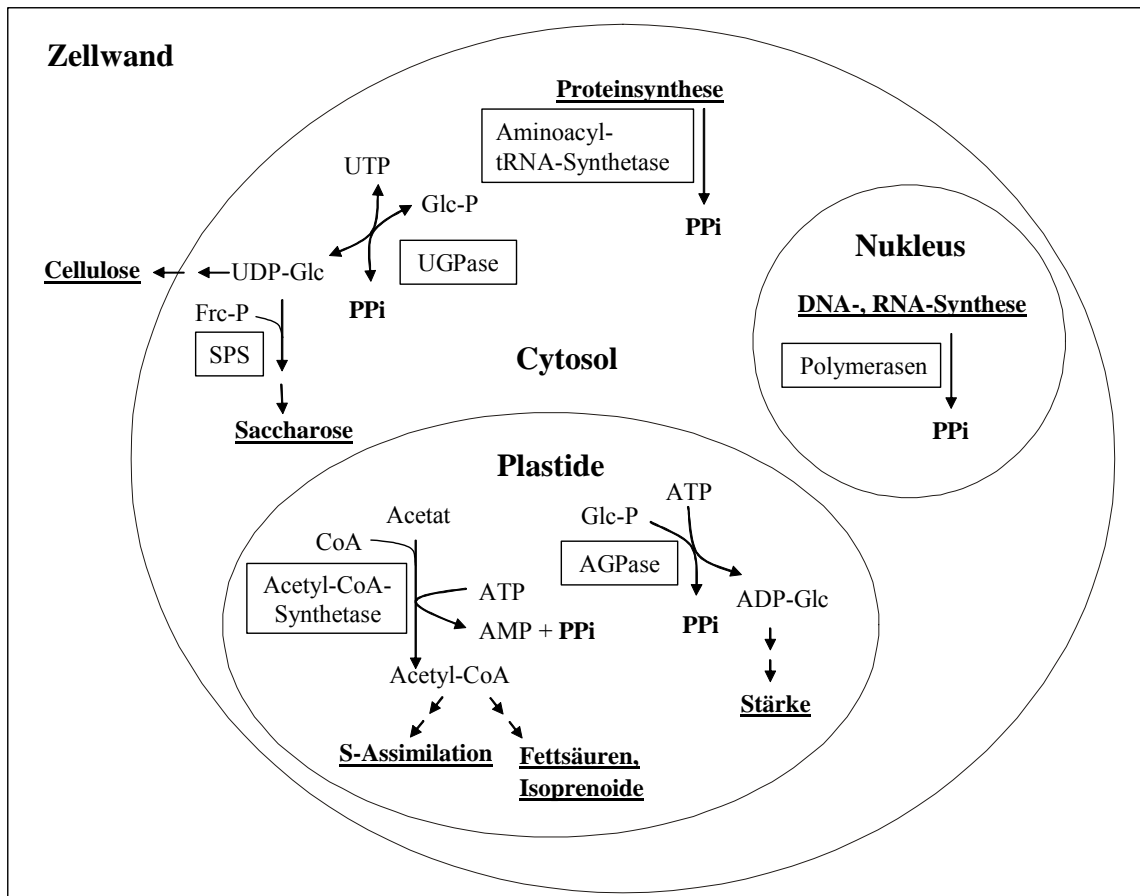


Abb. 2-1 Bildung von Pyrophosphat (PPi) im pflanzlichen Metabolismus.

### 2.3.2 Lösliche Pyrophosphatasen

Die unter 2.3.1 genannten Prozesse werden durch die Spaltung der Phosphoanhydridbindung des PPi in zwei Moleküle Orthophosphat (Pi) thermodynamisch begünstigt bzw. überhaupt erst ermöglicht (Kornberg, 1962). Die PPi-Hydrolyse wird durch lösliche (englisch: *soluble*) Pyrophosphatasen (S-PPasen; EC 3.6.1.1) katalysiert, die in allen Lebewesen vorhanden sind. Vor allem die Enzyme aus *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden intensiv untersucht und sind inzwischen gut charakterisiert.

In pflanzlichen Zellen ist die Situation komplex. So wurde die Aktivität von S-PPasen vor allem in Plastiden nachgewiesen (Gross und ap Rees, 1986; Weiner et al., 1987). Im Cytosol von Spinatblättern fand man dagegen kaum S-PPase-Aktivität, dafür aber vergleichsweise hohe PPI-Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  (Weiner et al., 1987). Auch für die Alge *Chara corallina* sind große Unterschiede zwischen der PPI-Konzentration des Cytosols (193  $\mu\text{M}$ ) und des Stromas ( $<1 \mu\text{M}$ ) beschrieben (Takehige und Tazawa, 1989). Während biochemische Untersuchungen also auf eine rein plastidäre Lokalisierung der S-PPasen hindeuten, konnte durch immunocytologische Untersuchungen an Kartoffelblattstielen die Lokalisierung von S-PPasen im Cytosol nachgewiesen werden (Rojas-Beltran et al., 1999).

### 2.3.3 PPI-verbrauchende Reaktionen in Pflanzen

Im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen gibt es in Pflanzen drei Enzyme, die cytosolisches PPI als Co-Substrat nutzen können, wodurch ein Teil der bei der Spaltung der Anhydridbindung freiwerdenden Energie in Form von phosphorylierten Metaboliten oder einem transmembralen Protonengradienten gespeichert wird. Damit stellt PPI in Pflanzen eine alternative Energiequelle zu ATP dar (Stitt, 1998). Zu den Prozessen, bei denen PPI als Energie- bzw. Phosphatdonor dient, zählen erstens die Energetisierung von Membranen durch die protonentranslozierende V-PPase (EC 3.6.1.1<sup>1</sup>), zweitens die Einleitung der Glykolyse durch die Pyrophosphat-Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase (PF6P; EC 2.7.1.90) und drittens der Abbau von Saccharose durch die Enzyme Saccharose-Synthase (SuSy; EC 2.4.1.13) und UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase; EC 2.7.7.9) (s. Abb. 2-2).

Die Ermittlung der tatsächlichen Bedeutung dieser PPI-abhängigen Reaktionen *in vivo* wird unter anderem dadurch erschwert, dass parallel zu jedem PPI-abhängigen Enzym ein entsprechendes ATP-abhängiges Enzym agiert, oft im gleichen Gewebe und zur gleichen Zeit. So kann die Energetisierung des Tonoplasten und anderer Membranen auch durch V-ATPasen erfolgen, die Glykolyse durch eine konventionelle ATP-abhängige Phosphofruktokinase (PFK) eingeleitet werden und die Saccharosespaltung durch Invertase mit anschließender Phosphorylierung durch Hexokinase und Fructokinase mittels ATP erfolgen.

---

<sup>1</sup> Bedauerlicherweise haben die strukturell und funktionell völlig verschiedenen V- und S-PPasen eine gemeinsame EC-Nummer erhalten, was immer wieder zu Verwechslungen führt.

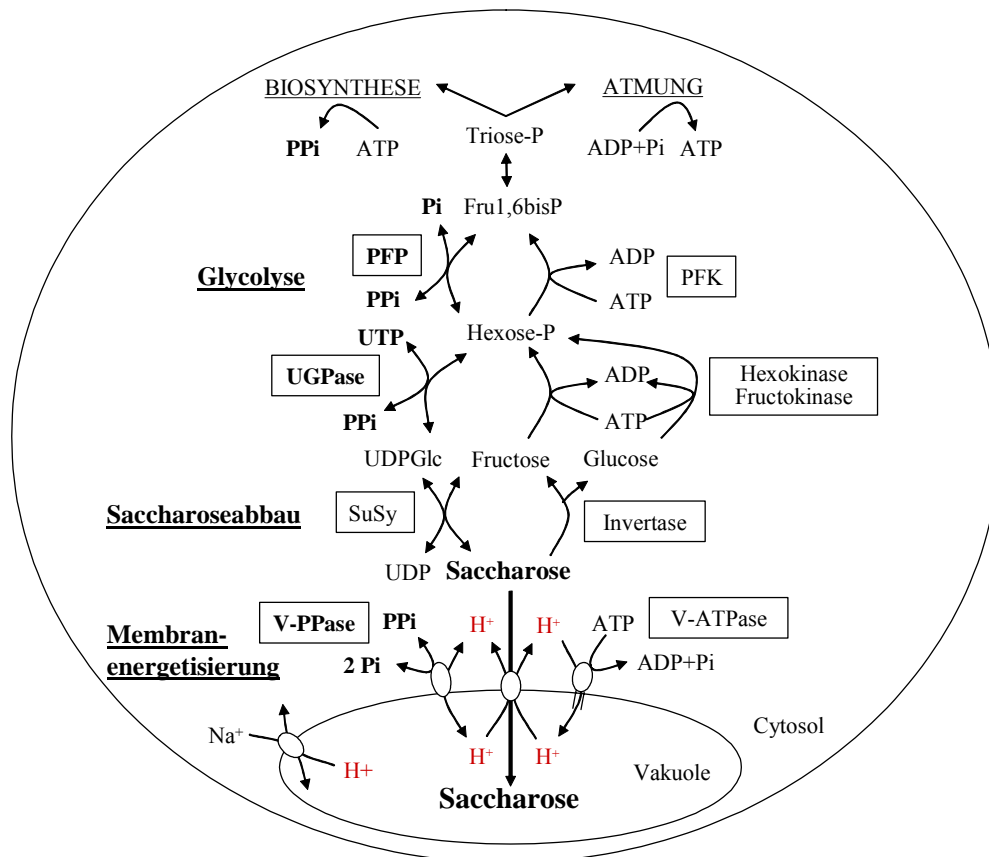


Abb. 2-2 PPI- und ATP-abhängige Reaktionen im Speicherparenchym der Zuckerrübe. Die PPI-abhängigen Reaktionen sind auf der linken Seite dargestellt und mittels Fettdruck hervorgehoben; die entsprechenden ATP-verbrauchenden Reaktionen stehen rechts. Die genaue subzelluläre Lokalisierung der Invertase sowie die möglicherweise erfolgende Re-Synthese von Saccharose durch SPS und SPP (vgl. 2.2.3) wurde bei dieser schematischen Darstellung nicht berücksichtigt. Graphik nach Stitt (1998).

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die genannten Reaktionen mit Beteiligung von PPI *in vivo* nahe am Gleichgewicht sind. Daher ist eine genaue Kenntnis von Konzentration und Kompartimentierung der beteiligten Metabolite vonnöten um bestimmen zu können, ob die Reaktion in Richtung der entsprechenden ATP-abhängigen Reaktion oder umgekehrt abläuft (Stitt, 1998). So wurde lange darüber spekuliert, ob die V-PPase wirklich PPI hydrolysiert oder vielmehr PPI unter Ausnutzung eines V-ATPase-abhängigen Protonengradienten synthetisiert. Tatsächlich konnte erst kürzlich zum ersten Mal direkt durch Komplementierung einer Hefe-Mutante gezeigt werden, dass die V-PPase *in vivo* die Hydrolyse von PPI katalysiert (Perez-Castineira et al., 2002): Beim Stamm YPC-1 steht das Gen für die S-PPase unter der Kontrolle eines Galaktose-abhängigen Promotors. Auf Glucosenährboden wird das essentielle Genprodukt daher nicht gebildet, was wegen des Anstauens von PPI letale Auswirkungen hat. Durch die Transformation der YPC-1-Mutante mit dem Gen für die V-PPase aus *Arabidopsis thaliana* (AVP1) konnte die Fähigkeit, auf Glucose zu wachsen, wieder hergestellt werden.

### 2.3.4 Auswirkungen von Wachstum und Stress auf den Primärstoffwechsel und die Expression PPI-verbrauchender Enzyme

Um die Funktion der PPI-verbrauchenden Enzyme zu klären, wurden zahlreiche Untersuchungen zu ihrer Expression und Aktivität durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Pflanzengewebe zu bestimmten Entwicklungsstadien oder unter verschiedenen Stressbedingungen analysiert (Stitt, 1998). Es stellte sich heraus, dass die Induktion PPI-abhängiger Stoffwechselwege anstelle von ATP-verbrauchenden Reaktionen generell bei erniedrigter zellulärer Energieladung (*energy charge*) erfolgt.

#### 2.3.4.1 Wachstum

Junge wachsende Gewebe weisen im Allgemeinen eine hohe Aktivität von V-PPase, PFP, SuSy und UGPase auf (Stitt, 1998). Der Grund dafür liegt vor allem in der Verfügbarkeit des Substrats PPI begründet: In schnell wachsenden Zellen laufen zahlreiche Biosyntheseprozesse mit großer Geschwindigkeit ab, so dass PPI in großer Menge gebildet wird. Dieses muss schnell hydrolysiert werden, um einerseits die Syntheseprozesse voranzutreiben und andererseits genügend Pi für die oxidative Phosphorylierung von ADP in den Mitochondrien bereitzustellen, welche den hohen Bedarf an ATP decken. Durch die Aktivität von SuSy, UGPase und PFP werden Triosephosphate gebildet, deren weiterer Abbau in Glykolyse und Citratzyklus die für die oxidative Phosphorylierung notwendigen Reduktionsäquivalente liefert.

Der Einfluss von Wachstum auf die Expression der V-PPase ist besonders gut am Hypokotyl etiolierter Keimlinge von Zuckerrübe (Schirmer, 1998), Mais (Viereck et al., 1996) und Mungobohne (Nakanishi und Maeshima, 1998) untersucht worden. Diese Keimlinge weisen im obersten Bereich (3-5 mm unterhalb der Sprossspitze) eine besonders starke Zellstreckung auf, die mit hohen Transkriptspiegeln der V-PPase korreliert. In den langgestreckten reifen Zellen der Hypokotylbasis ist die Expression der V-PPase hingegen stark vermindert. Die hohe Expression der V-PPase in den jungen Zellen im Spitzenbereich ist aus physiologischer Sicht doppelt vorteilhaft: zum einen für die Syntheseprozesse durch die Beseitigung des PPI und zum anderen für das Streckungswachstum, welches ist in Pflanzenzellen – neben Modifikationen der Zellwand – von der Akkumulation osmotisch wirksamer Substanzen in der Vakuole mittels sekundär-aktiver Transportmechanismen abhängig. Der von der V-PPase am Tonoplasten etablierte  $H^+$ -Gradient ist die treibende Kraft für diese Transportprozesse. In

ausdifferenzierten Zellen sinkt die metabolische Aktivität und als ökonomische Anpassung daran auch die V-PPase-Aktivität (Nakanishi und Maeshima, 1998).

#### 2.3.4.2 Phosphatmangel

Stress durch Phosphatmangel ist primär auf die oft niedrige Phosphatkonzentration im Boden zurückzuführen, kann aber sekundär auch durch Stressfaktoren wie Anaerobiose oder Kälte verursacht werden, da diese die Phosphataufnahme durch Wurzelzellen reduzieren (Carystinos et al., 1995). Phosphatmangel führt zu einer Verminderung von cytosolischem Pi und als Folge zu einem bis zu 80% erniedrigten ATP-Gehalt, was sich in einer drastischen Drosselung ATP-abhängiger Stoffwechselwege niederschlägt. Expressionsstudien an verschiedenen Pflanzenarten haben gezeigt, dass unter Pi-Mangelbedingungen P<sub>Pi</sub>-abhängige Enzyme koordiniert hochreguliert werden, um die entsprechenden ATP-abhängigen Enzyme zu ersetzen. So ist in *Brassica nigra*-Suspensionskulturen die Aktivität der PFP und deren Empfindlichkeit gegenüber dem Aktivator Fructose-2,6-Bisphosphat erhöht. Außerdem verändert sich das stöchiometrische Verhältnis der PFP-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zugunsten der  $\alpha$ -Untereinheit (Theodorou et al., 1992). Untersuchungen an den gleichen Zellen haben gezeigt, dass auch die V-PPase bei Pi-Mangel hochreguliert wird: Proteinmenge, Hydrolyse- und Protonenpumpaktivität waren mehr als doppelt so hoch wie bei der Kontrolle.

Auch in *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen wurde ein Anstieg der V-PPase-Proteinmenge bei Pi-Mangel beobachtet. Auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass nur die Transkriptspiegel der Isoform 2 (L32791) erhöht waren, während die der Isoform 1 (L32792) gleich blieben. Möglicherweise befinden sich im Promotor der Isoform 2 spezielle *cis*-Elemente, durch die die Transkription bei schlechter Pi-Versorgung verstärkt wird (Wang, unveröffentlichte Ergebnisse).

#### 2.3.4.3 Sauerstoffmangel

Bei Anoxie kann die oxidative Phosphorylierung nicht ablaufen. Die ATP-Bildung erfolgt über Gärung, jedoch mit viel geringerer Effizienz: Statt bis zu 39 werden nur 3 Moleküle ATP aus einem Hexosephosphatäquivalent gewonnen. Außerdem kommt es zum Absinken des cytosolischen pH und zur Akkumulation von Lactat und Ethanol (Drew, 1997). Während Tiere spezielle Atmungsorgane, Kreislaufsysteme und Sauerstoff-transportierende Pigmente entwickelt haben, um O<sub>2</sub> schnell zu metabolisch aktiven Geweben zu transportieren und die O<sub>2</sub>-Konzentration konstant zu halten, fehlt ein solches Versorgungssystem bei Pflanzen. Das

hat zur Folge, dass Sauerstoffmangel Pflanzen in zweierlei Hinsicht betreffen kann. Zum einen tritt er als abiotischer Stressfaktor auf: Staunässe, Überflutung oder hohe mikrobielle Aktivität im Boden führen zu einer erniedrigten Sauerstoffversorgung der Wurzeln, die das Wachstum und die Ausbreitung von Pflanzen begrenzt. Zum anderen kann Sauerstoffmangel in Pflanzen vorkommen, selbst wenn sie sich in einer Umgebung mit optimaler externer O<sub>2</sub>-Versorgung (21%) befinden: In Geweben mit hoher metabolischer Aktivität, kleinen Interzellularräumen, wenigen Vakuolen und großer Entfernung zu den Eintrittsorten des Sauerstoffs in die Pflanze ist die Diffusionsgeschwindigkeit oft nicht hoch genug, um mit dem Sauerstoffbedarf Schritt zu halten (Geigenberger, 2003).

O<sub>2</sub>-Messungen haben ergeben, dass die Konzentration in Wurzelmeristemen 4-10% (Ober und Sharp, 1996) und im Phloem 5-6% (van Dongen et al., 2003) beträgt. Niedrige O<sub>2</sub>-Partialdrücke wurden auch in den Samen der Leguminosen *Vicia faba* und *Pisum sativum* gemessen. Direkt unter der Samenhülle von *V. faba* betrug die Sauerstoffkonzentration weniger als 1%, was vermutlich eine Folge der diffusionshemmenden Kutinablagerungen auf den äußersten Zellschichten ist (Rolletscheck et al., 2002). Auch Früchte oder Speicherorgane wie die Kartoffelknolle stellen sehr kompakte Gewebe dar. Dementsprechend wurden in Avokados (Ke et al., 1995), Bananen (Banks, 1983), Äpfeln (Magness, 1920) und wachsenden Kartoffeln (Geigenberger et al., 2000) niedrige Sauerstoffpartialdrücke gemessen. In der Kartoffelknolle waren die Konzentrationen in der Peripherie mit 8-12% höher als im Zentrum mit 2-5% (Geigenberger, 2003).

Als Folge fallender O<sub>2</sub>-Konzentrationen in pflanzlichen Geweben wurde eine sinkende metabolische Aktivität beobachtet (Geigenberger et al., 2000; van Dongen et al., 2003). Aufgrund verringerter Atmung und Glykolyse war die zelluläre Energieladung in Scheibchen der Kartoffelknolle nach 2 h unter hypoxischen Bedingungen (12% O<sub>2</sub> in der Inkubationslösung) signifikant erniedrigt. Dadurch sanken die Biosyntheseraten von Saccharose, Aminosäuren, Proteinen und Lipiden z.T. auf weniger als ein Zehntel im Vergleich zur Kontrolle mit 21% O<sub>2</sub>. Der Pasteur-Effekt mit steigenden Lactatwerten als Folge erhöhter Glykolyse trat erst bei Anoxie, d.h. Sauerstoffkonzentrationen unter 1% ein (Geigenberger, 2003).

Eine dauerhafte Anpassung an niedrige O<sub>2</sub>-Spiegel ist die Umstellung von ATP-verbrauchenden auf P<sub>Pi</sub>-abhängige Stoffwechselwege. Wie Abb. 2-2 verdeutlicht, ermöglicht

der einzigartige Metabolismus von Pflanzen, Protonen mit Hilfe der V-PPase zu pumpen oder Saccharose über SuSy, UGPase und PFP abzubauen, den ATP- und O<sub>2</sub>-Verbrauch<sup>2</sup> in Geweben mit limitierter Sauerstoffversorgung drastisch zu senken. So wird z.B. für die Spaltung von einem Molekül Saccharose in 2 Hexosephosphate durch SuSy und UGPase nur 1 PPi benötigt, während die Hydrolyse und Phosphorylierung durch Invertase und Hexokinase/Fruktokinase zwei Moleküle ATP verbraucht. Durch Inkubation von Kartoffelscheiben in Lösungen mit unterschiedlicher O<sub>2</sub>-Konzentration konnte gezeigt werden, dass die PPi-Spiegel bei sinkender O<sub>2</sub>-Konzentration konstant blieben oder sogar leicht anstiegen, während die Konzentrationen von ATP und UTP drastisch abfielen und die zelluläre Energieladung sank (Geigenberger et al., 2000).

Die PPi-Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass Expression und Aktivität der PPi-verbrauchenden Enzyme unter hypoxischen Bedingungen hoch sind bzw. durch sinkende Sauerstoffpartialdrücke induziert werden. So wurde als Folge von Anaerobiose in Reiskeimlingen die Induktion der V-PPase auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene beobachtet (Carystinos et al., 1995). In Einklang damit stehen die Befunde von Brauer et al. (1997), die Wurzelhaarzellen aus Mais in Gegenwart und Abwesenheit von Sauerstoff mit dem spezifischen V-ATPase-Inhibitor Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelten: Unter anaeroben Bedingungen blieb der tonoplastidäre Protonengradient unverändert, während er bei Aerobiose verschwand. Dies gilt als weiteres Indiz dafür, dass unter anaeroben Bedingungen die V-PPase die Ansäuerung der Vakuole gewährleistet.

Auch die Aktivität der PFP ist unter Anaerobiose erhöht, wie an Reiskeimlingen (Mertens et al., 1990) und Suspensionskulturzellen von Sojabohne und Reis (Mohanty et al., 1993) gezeigt werden konnte. Des Weiteren wurde beobachtet, dass in Mais und Kartoffel die Expression der SuSy-Gene infolge niedriger externer Sauerstoffspiegel stark ansteigt, während die der Invertase-Gene reduziert wird (Zeng et al., 1998, 1999). Dass dieses gegenläufige Expressionsmuster auch während des Wachstums von Kartoffelknollen und Speicherwurzeln der Zuckerrübe zu beobachten ist, wurde bereits ausgeführt (2.2.2). Der entwicklungsbedingte Wechsel von Invertase zu SuSy als Folge der Größenzunahme wurde

---

<sup>2</sup> Bologna et al. (2003) betonen in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit für kompakte Gewebe, die hypoxischen Bedingungen durch eigene metabolische Aktivität nicht zu anaeroben werden zu lassen, um die Akkumulation giftiger Gärungsprodukte und das Absinken des cytosolischen pH zu verhindern. So führte die experimentelle ektopische Expression einer Invertase im Cytosol von Kartoffelknollen zu gesteigerter Atmung, was die interne Sauerstoffkonzentration fast auf Null senkte und die Induktion von Alkohol- und Lactatdehydrogenase bewirkte.

auch für die Samen von Mais (Tsai et al., 1970) und Bohne (Weber et al., 1997) beschrieben. In Blättern und Wurzeln von *B. vulgaris* waren bei normaler O<sub>2</sub>-Versorgung keine SuSy-Transkripte nachweisbar, was bereits auf die besondere Rolle dieses Enzyms im kompakten Gewebe der wachsenden Rübe hindeutet. Wurden die Pflanzen hingegen 24 h lang unter anaeroben Bedingungen gehalten, war die mRNA auch in diesen Organen vorhanden (Carystinos et al., 1995; Hesse und Willmitzer, 1996).

#### **2.3.4.4 Kälte**

Kälte führt zu mitochondrialer Dysfunktion (Lyons und Raison, 1970) und hat damit ähnliche Auswirkungen wie Anaerobiose, wie vergleichende Untersuchungen an Reiskeimlingen zeigten. Bei Keimlingen, die 6 Tage bei 10 °C gewachsen waren, war die V-PPase-Menge signifikant erhöht und die PPI-Hydrolyseaktivität 20mal so hoch wie die der Kontrollpflanzen, die bei 25 °C gehalten worden waren. Nach Erhöhung der Temperatur auf 25 °C kam es zur Verminderung der V-PPase-Menge und -Aktivität. Ähnliche Effekte wurden in Reiskeimlingen bei und nach Sauerstoffmangel beobachtet (Carystinos et al., 1995). Auch bei Keimlingen der Mungobohne, die 48 h einer Temperatur von 4 °C ausgesetzt waren, waren PPI-Hydrolyse- und Protonenpumpaktivität sowie Proteinmenge bei der V-PPase fast doppelt so hoch wie vorher, während die entsprechenden Parameter bei der V-ATPase nahezu unverändert blieben (Darley et al, 1995).

#### **2.3.4.5 Verwundung**

Eine offene Wundoberfläche bedeutet für Pflanzen unkontrollierten Wasserverlust und eine Angriffsstelle für Pathogene. Um beides zu verhindern, entwickelt sich ein Wundperiderm, für dessen Bildung die Pflanze Energiere Ressourcen aktivieren muss. Dies lässt sich besonders gut an Zuckerrüben beobachten: Bei der Ernte wird der oberste Bereich mit den Blättern abgeschnitten, was im Bereich der Schnittfläche zur Mobilisierung von Saccharose und damit bei der Lagerung zu erheblichen Zuckerverlusten führt. Bemerkenswerterweise sind für den verwundungsbedingten Saccharoseabbau nicht SuSy-Isoformen, sondern Invertasen verantwortlich. So konnte anhand von gelagerten Rübenscheibchen gezeigt werden, dass die Transkriptspiegel von Isoformen der vakuolären Invertase und der Zellwand-Invertase, die vor der Verwundung nicht nachweisbar waren, drastisch anstiegen (Rosenkranz et al., 2001). Die Tatsache, dass die Wundoberfläche - verglichen mit dem intakten Rübenkörper - einer verbesserten Sauerstoffversorgung ausgesetzt ist, liefert eine Erklärung dafür, dass der Saccharoseabbau über den ATP-abhängigen Weg mit Invertase und Hexokinase/Fructokinase



verläuft. In Einklang damit steht das gegenläufige Expressionsmuster von V-ATPase und V-PPase nach Verwundung: Während mehrere Untereinheiten der V-ATPase einen Anstieg auf Transkriptebene zeigten und die ATP-abhängige Protonenpumpaktivität signifikant erhöht war, kam es gleichzeitig zum Absinken der Transkriptspiegel der V-PPase (Schirmer, 1998).

## **2.4 Transgene Pflanzen mit erniedrigtem Pyrophosphat Spiegel oder veränderter Expression Pyrophosphat-abhängiger Enzyme**

Neben den klassischen biochemischen Ansätzen zur Untersuchung von Stoffwechselwegen hat die Analyse transgener Pflanzen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. So konnte die generelle Bedeutung von PPi für den pflanzlichen Metabolismus in *Source*-, *Leit*- und *Sink*-Gewebe anhand von Transformanten gezeigt werden, die entweder erniedrigte PPi-Spiegel infolge ektopischer Überexpression einer löslichen Pyrophosphatase aus *E. coli* oder eine veränderte Expression von Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus aufwiesen. Vor allem für die Kartoffelpflanze, in deren kompakter Knolle die Umwandlung von Saccharose in Stärke in Abhängigkeit von PPi erfolgt, sind zahlreiche transgene Linien hergestellt worden. Die beobachteten metabolischen und phänotypischen Veränderungen waren teilweise erheblich, wenngleich je nach Pflanzenart und Linie alles andere als einheitlich.

### **2.4.1 Analyse von Transformanten mit ektopischer Überexpression einer Pyrophosphatase aus *E. coli***

Durch die konstitutive Überexpression der löslichen *E. coli*-Pyrophosphatase in Tabak- und Kartoffelpflanzen konnte die cytosolische PPi-Konzentration signifikant reduziert werden, was phänotypisch zu kleineren Pflanzen führte (Sonnewald, 1992). In *Source*-Blättern dieser Pflanzen akkumulierten lösliche Zucker und UDP-Glucose, während die Konzentration von Stärke, Hexosephosphaten und anderen phosphorylierten Metaboliten reduziert war (Jelitto et al., 1992). Grund dafür war vermutlich eine Gleichgewichtsverschiebung der Reaktanten der durch UGPase katalysierten Reaktion (vgl. Abb. 2-2), was die Saccharose- gegenüber der Stärkesynthese begünstigte. Die Stärkebildung verläuft nämlich über Glucose-6-Phosphat, das im Tausch gegen Pi in die Plastiden transportiert wird (Kammerer et al., 1998).

Zudem war bei den Tabaktransformanten ein Ausbleichen der Blätter zu beobachten, wie es zuvor schon bei Transformanten mit gestörter Phloembeladung beschrieben worden war (von

Schaewen et al., 1990). Bei Verwendung eines phloemspezifischen Promotors für die Überexpression der bakteriellen Pyrophosphatase erhielt man denselben Phänotyp (Lerchl et al., 1995). Im Gegensatz zu den Transformanten mit konstitutiver Expression war hier aber der Stärkegehalt in den *Source*-Blättern erhöht. Diese Befunde wurden so gedeutet: Die Saccharosemobilisierung in den Geleitzellen des Phloems verläuft ausschließlich über SuSy und UGPase (Geigenberger et al., 1993). Der Mangel an P<sub>Pi</sub> hemmt diesen Stoffwechselweg und führt zu einem erniedrigten ATP-Gehalt. Infolgedessen unterbleibt die Phloembeladung in den *Source*-Blättern, was zu einem Mangel an Assimilaten in den *Sink*-Organen und damit zu reduziertem Wachstum führt (Geigenberger et al., 1996). Ist die P<sub>Pi</sub>-Konzentration in den *Source*-Blättern nicht gentechnisch verändert, wird Saccharose über SuSy und UGPase in Glucose-6-P umgewandelt, das dann im Austausch gegen Pi in die Chloroplasten transportiert und dort zur Stärkesynthese benutzt wird. Interessanterweise konnte die Phloembeladung in diesen Transformanten durch die zusätzliche phloemspezifische Expression einer Invertase aus Hefe wiederhergestellt werden (Lerchl et al., 1995).

In der Kartoffelknolle führte die konstitutive Überexpression der löslichen *E. coli*-Pyrophosphatase zu erhöhten Spiegeln von Saccharose, Glucose, Fructose und UDP-Glucose. Phosphorylierte Intermediate und Stärke waren hingegen vermindert (Jelitto et al., 1992; Sonnewald, 1992). Durch die Blockierung der UGPase-Reaktion konnte Saccharose nicht in Hexosephosphate umgeformt werden, so dass der Aufbau von Stärke unterblieb. Die Verwendung des knollenspezifischen Patatin-Promotors führte zum selben Ergebnis (Stitt, 1998). Unerwarteterweise war aber bei der Analyse jüngerer Knollen der Pflanzen mit konstitutiver Pyrophosphatase-Expression die Stärkemenge nicht reduziert, sondern sogar leicht erhöht. Allerdings wurden hierfür andere Linien verwendet (Geigenberger et al., 1998).

#### **2.4.2 Analyse von Kartoffelpflanzen mit verringerter Expression von SuSy, UGPase und PFP**

Für die Kartoffel sind in den letzten Jahren praktisch alle Gene kloniert worden, die mit der Umwandlung von Saccharose in Stärke in Zusammenhang gebracht werden, und viele wurden in transgenen Ansätzen – allein oder in Kombination – hoch- oder niederreguliert (Fernie, 2002). Wie bereits erläutert, sind etliche der Genprodukte P<sub>Pi</sub>-abhängig. Durch Unterdrückung der entsprechenden Gene mit *Antisense*-Konstrukten konnte so auch die Funktion der P<sub>Pi</sub>-verbrauchenden Enzyme weiter aufgeklärt werden.

So waren in Kartoffelknollen mit stark herabgesetzter PFP-Expression die Spiegel für Hexosephosphate erhöht, während die von Metaboliten weiter stromabwärts in der Glykolyse erniedrigt waren (Hajirezaei et al., 1994). Dies zeigt, dass das Enzym in der kompakten Knolle in Richtung Glykolyse operiert. Die Inhibierung der UGPase-Expression hatte unerwartet geringe Auswirkungen auf die Größe und Zusammensetzung der Knollen (Zrenner et al., 1993). Dagegen führte *Antisense*-Inhibierung der SuSy-Aktivität unter 30% des Wildtyps zu verringertem Stärke- und Proteingehalt und reduziertem Gewicht der Knollen (Zrenner et al., 1995), was die Bedeutung dieses Stoffwechselwegs für den Saccharoseabbau demonstriert.

### 2.4.3 Organismen mit veränderter Expression der V-PPase

Für Tabak sind drei V-PPase-Isoformen kloniert worden (Lerchl et al., 1995). In einem *Antisense*-Ansatz, bei dem ein Fragment aus dem kodierenden Bereich einer Isoform (Klon TVP5) verwendet wurde, zeigten die Transformanten keinen signifikant veränderten Phänotyp. Dies lag vermutlich daran, dass die Homologie von 80-90% nicht ausreichte, um die Expression der anderen beiden Isoformen ebenfalls zu senken, so dass die Gesamtmenge an V-PPase-Protein nicht entscheidend verändert wurde (Fischer-Schliebs, persönliche Mitteilung).

Zu Beginn dieser Doktorarbeit lagen keine Berichte über transgene Pflanzen mit erhöhter V-PPase-Expression vor. (Kim et al., 1994) wiesen nach, dass die heterologe Expression des V-PPase-Gens aus *Arabidopsis* (*AVP1*) den Aufbau eines Protonengradienten in Hefe-Vakuolen bewirkte. Bei *enal*-Mutanten der Hefe konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *AVP1* in dem *per se* NaCl-sensitiven Hefe Stamm das Überleben bei 700 mM NaCl ermöglichte (Gaxiola et al., 1999). Den *enal*-Mutanten fehlt das Genprodukt für die an der Plasmamembran lokalisierte Na<sup>+</sup>-ATPase, was bei NaCl-Konzentrationen ab 200 mM letale Auswirkungen hat. Durch Analyse weiterer Mutanten, bei denen zusätzlich die Expression des endogenen NHX1-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters oder des GEF1-Chlorid-Kanals inhibiert war, konnte gezeigt werden, dass die wiederhergestellte Salztoleranz der *enal*-*AVP1*-Transformanten tatsächlich auf der Erhöhung der PMF am prä-vakuolären Kompartiment beruht, durch die über NHX1 und GEF1 vermehrt NaCl transportiert wird und so toxisch wirkende Na<sup>+</sup>-Ionen weitgehend aus dem Cytosol entfernt werden.

## 2.5 Fragestellung

Die Akkumulation zahlreicher Metabolite und Ionen in der pflanzlichen Vakuole erfolgt über  $H^+$ -Antiportsysteme, die von der *proton motive force* (PMF) am Tonoplasten angetrieben werden. Zwei  $H^+$ -Pumpen tragen zum Aufbau der PMF bei: Die vakuoläre  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) und die  $H^+$ -Pyrophosphatase (V-PPase). Während die Funktion der V-ATPase an eine hohe zelluläre Energieladung gebunden ist, vermag die V-PPase auch bei erniedrigter Energieladung Transportarbeit zu leisten. Dies gilt als Grund dafür, dass Expression und Aktivität der V-PPase bei Phosphatmangel oder limitierter Sauerstoffversorgung erhöht ist. Auch andere PPI-abhängige Stoffwechselwege werden unter diesen Bedingungen induziert, um die Funktion ATP-verbrauchender Enzyme zu ersetzen. Dieses Phänomen ist besonders umfassend an der wachsenden Kartoffelknolle untersucht worden, bei der es sich um ein kompaktes Gewebe mit niedrigem Sauerstoffgehalt handelt. Anders als bei Kartoffeln, die ihre Assimilate in Form von Stärke speichern, ist in Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) Saccharose die bevorzugte Speicherform. Über die molekularen Mechanismen der Saccharosespeicherung in *B. vulgaris* ist bisher wenig bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Die Energetisierung des Tonoplasten ist Voraussetzung für die Saccharoseakkumulation im Speicherparenchym der Zuckerrübe. Erfolgt die Etablierung der PMF durch V-PPase, V-ATPase oder beide? Wie ist die Expression der beiden Protonenpumpen in anderen Geweben? Gibt es entwicklungsbedingte Veränderungen bei den Transkriptspiegeln?
2. Welche Sauerstoffverhältnisse herrschen in der Speicherwurzel der Zuckerrübe? Besteht eine Korrelation zwischen Sauerstoffkonzentration und Expression von V-ATPase oder V-PPase?
3. In Suspensionskulturzellen von *B. vulgaris* sind unter Phosphatmangel die Transkriptspiegel von BVP2 erhöht, während die von BVP1 unverändert bleiben. Lässt sich durch Reporterstudien zeigen, dass der Anstieg bei BVP2 auf einer erhöhten Promotoraktivität beruht?

4. Ist es generell möglich, durch Überexpression einer vakuolären Pyrophosphatase die Transportleistung der tonoplastidären Antiportsysteme in Pflanzen zu steigern? Kann beispielsweise durch den verstärkten Transport toxischer  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Cytosol in die Vakuole die Salztoleranz erhöht werden? Welche Auswirkungen hat die V-PPase-Überexpression auf den Saccharosegehalt von Zuckerrüben?

5. Die Funktion der PPi-abhängigen Enzyme V-PPase, SuSy/UGPase und PFP ist von einer ausreichend hohen cytosolischen PPi-Konzentration abhängig. Die Existenz löslicher Pyrophosphatasen (S-PPasen) im Cytosol pflanzlicher Zellen wird daher vielfach angezweifelt (Ferne et al., 2002), wenngleich immunocytologische Untersuchungen dafür sprechen (Rojas-Beltran et al., 1999). Aus der Zuckerrübe sind bisher keine S-PPasen kloniert worden. Daher sollte untersucht werden, ob lösliche PPasen in *B. vulgaris* existieren, wo diese subzellulär lokalisiert sind und welche biochemischen Eigenschaften sie im Vergleich zu den bekannten V-PPasen aufweisen. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Überexpression einer pflanzlichen S-PPase andere Auswirkungen auf den pflanzlichen Metabolismus hat als die einer bakteriellen S-PPase oder einer pflanzlichen V-PPase. Schließlich sollten Transformanten hergestellt werden, die sowohl eine S-PPase als auch eine V-PPase aus Pflanzen überexprimieren.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl membranständige vakuoläre  $H^+$ -Pyrophosphatasen (V-PPasen, s. 3.1) als auch lösliche Pyrophosphatasen (S-PPasen, s. 3.2) der Zuckerrübe molekularbiologisch, zellbiologisch und biochemisch charakterisiert. Des Weiteren wurden transgene Pflanzen mit ektopischer Expression beider PPase-Typen allein oder in Kombination hergestellt (s. 3.3).

#### 3.1 Vakuoläre $H^+$ -Pyrophosphatasen in *Beta vulgaris*

##### 3.1.1 Klonierung der Vollängen-cDNA-Sequenz von *BVP1*

Voraussetzung für Expressionsanalysen und die Herstellung transgener Pflanzen war die Ermittlung der vollständigen und korrekten cDNA-Sequenz der V-PPase-Isoform 1 aus *B. vulgaris* (*BVP1*).

##### 3.1.1.1 Vervollständigung der 5'-UTR

Laut der von Kim et al. (1994b) veröffentlichten cDNA-Sequenz ist die 5'-UTR von *BVP1* 57 bp lang. Um zu überprüfen, ob diese Sequenz tatsächlich der gesamten 5'-UTR entspricht, wurde eine RACE-PCR mit cDNA durchgeführt, die aus Rüben-RNA hergestellt worden war. Auf diese Weise konnte eine 5'-UTR-Sequenz isoliert werden, die eine Länge von 94 bp aufweist und damit 37 bp länger ist als die veröffentlichte. Wie das Alignment in Abb. 3-1 verdeutlicht, ist die 5'-UTR nahezu identisch mit der genomischen Sequenz (Wang, unveröffentlicht) und damit intronfrei. Die Tatsache, dass sich in der genomischen Sequenz exakt 30 bp stromaufwärts ein typisches TATA-Boxmotiv befindet, macht es wahrscheinlich, dass der Beginn der neu isolierten cDNA tatsächlich dem Transkriptionsstart entspricht.

```

          *           20           *           40           *           60
5'-RACE   : ~~~~~~CTCCCTCTCCCTCTCTTCCAAACCCTCTTCATTTC : 34
Genom.    : TATAAAACAAAACCCACACTTCTCACACTCTTCCCTCTCCCTCTCTTCCAAACCCTCTTCATTTC : 63
cDNA_Kim  : ~~~~~~ : -
          ct cctctccctctcttccaaaccctc tcatt

          *           80           *           100          *           120
5'-RACE   : TCTCTCTCTCTCTCCTTTATCTTCTTCTTCTTCAATTTTCTTCTCCCATTTTCAAAAATCATG : 97
Genom.    : TCTCTCTCTCTCTCCTTTATCTTCTTCTTCTTCAATTTTCTTCTCCCATTTTCAAAAATCATG : 126
cDNA_Kim  : ~~~TCTCTCTCTCTCCTTTATCTTCTTCTTCTTCAATTTTCTTCTCCCATTTTCAAAAATCATG : 60
          tctcTcTCTCTCTCCTTTATCTTCTTCTTCTTCAATTTTCTTCTCCCATTTTCAAAAATCATG

```

Abb. 3-1 Alignment der durch RACE-PCR ermittelten 5'-UTR der *BVP1*-cDNA mit der entsprechenden genomischen Sequenz (Wang, unveröffentlicht) und der publizierten cDNA-Sequenz (Kim et al., 1994). Das Startcodon sowie das nächst liegende TATA-Boxmotiv in der genomischen Sequenz sind gelb hervorgehoben.

### 3.1.1.2 Klonierung und Sequenzierung der cDNA-Sequenz von *BVPI*

Für die Klonierung der cDNA von *BVPI* in Volllänge wurde Gesamt-mRNA sowohl aus Suspensionskulturzellen als auch aus *hairy roots*<sup>3</sup> isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit diesen cDNAs als Templaten und genspezifischen Primern am Ende der untranslatierten Bereiche wurde anschließend eine PCR durchgeführt. In beiden Fällen erhielt man die erwarteten, inklusive der untranslatierten Bereiche etwa 2,9 kb großen Amplifikate, die nach Klonierung in pCR<sup>®</sup>-TOPO 2.1 (Invitrogen) vollständig sequenziert wurden.

In Abb. 3-2 ist ein Alignment der abgeleiteten Proteinsequenzen dargestellt. Während sich die beiden Sequenzen aus Suspensionskultur und *hairy roots* untereinander an den drei Positionen 315, 325 und 394 unterscheiden, zeigt der Vergleich mit der veröffentlichten Proteinsequenz (Kim et al., 1994) insgesamt 14 Unterschiede. Die auffälligste Sequenzabweichung findet sich im Bereich der Positionen 289-296, in dem es bei der veröffentlichten Sequenz offensichtlich zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Die neu isolierten Sequenzen weisen nämlich an dieser Stelle 100% Identität mit V-PPasen anderer Pflanzenarten sowie mit der ebenfalls von Kim et al. (1994b) veröffentlichten Proteinsequenz der Isoform 2 aus *B. vulgaris* (BVP2) auf, was bedeutet, dass die beiden Beta-Isoformen einander noch ähnlicher sind als bisher angenommen.

Ob die drei Unterschiede zwischen den Proteinsequenzen aus Suspensionskultur und *hairy roots*, welche auf Punktmutationen beruhen, aufgrund unterschiedlicher Genotypen oder schlicht Fehlern der *Taq*-Polymerase bestehen, muss durch Überprüfung weiterer *BVPI*-Klone geklärt werden.

---

<sup>3</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der KWS Saat AG, Einbeck.

		*	20	*	40	*	60	*			
SK	:	MGAALLPDLITEIIIPVCAVIGIAFSLFQWYIVSQVKLSPDSTRNNNNKNGFSDSLIEEEGLNDQSVVA							:	70	
HR	:	MGAALLPDLITEIIIPVCAVIGIAFSLFQWYIVSQVKLSPDSTRNNNNKNGFSDSLIEEEGLNDQSVVA							:	70	
BVP1_Kim	:	MGAALLPDLITEIIIPVCAVIGIAFSLFQWYIVLRVKLSPDSTRNNNNKNGFSDSLIEEEGLNDQSVVA							:	70	
			80	*	100	*	120	*	140		
SK	:	KCAEQNAISEGATSFLFTEYQYVGFVMFAVLI FFLGSLVGEFSTSSQECTYDKTRRCKPALATAIFS								:	140
HR	:	KCAEQNAISEGATSFLFTEYQYVGFVMFAVLI FFLGSLVGEFSTSSQECTYDKTRRCKPALATAIFS								:	140
BVP1_Kim	:	KCAEQNAISEGATSFLFTEYQYVGFVMFAVLI FFLGSLVGEFSTSSQECTYDKTRRCKPALATAIFS								:	140
		*	160	*	180	*	200	*			
SK	:	TVAFLLGAITSLSGSGFFGMKIATYANARTTLEARKGVGKAFIVAFRSGAVMGFLLAANGLLVLYITILLF								:	210
HR	:	TVAFLLGAITSLSGSGFFGMKIATYANARTTLEARKGVGKAFIVAFRSGAVMGFLLAANGLLVLYITILLF								:	210
BVP1_Kim	:	TVAFLLGAITSLSGSGFFGMKIATYANARTTLEARKGVGKAFIVAFRSGAVMGFLLAANGLLVLYITILLF								:	210
		220	*	240	*	260	*	280			
SK	:	KIYYGDDWEGLFEAITGYGLGGSSMALFGRVAGGIYTKAADVGADLVGKVERDIPEDDPRNPAVIADNVG							:	280	
HR	:	KIYYGDDWEGLFEAITGYGLGGSSMALFGRVAGGIYTKAADVGADLVGKVERDIPEDDPRNPAVIADNVG							:	280	
BVP1_Kim	:	KIYYGDDWEGLFEAITGYGLGGSSMALFGRVAGGIYTKAADVGADLVGKVERDIPEDDPRNPAVIADNVG							:	280	
		*	300	*	320	*	340	*			
SK	:	DNVVDIAGMGSDFG-SYAESSCAALVVA SISSFGISHDLTAMMYPLLVS SVGIIVCLITTLFATDFFEI								:	349
HR	:	DNVVDIAGMGSDFG-SYAESSCAALVVA SISSFGISHDLTAMMYPLLVS SVGIIVCLITTLFATDFFEI								:	349
BVP1_Kim	:	DNVVDIAGMGSDFG-SYAESSCAALVVA SISSFGISHDLTAMMYPLLVS SVGIIVCLITTLFATDFFEI								:	350
		360	*	380	*	400	*	420			
SK	:	KAVKEIEPALKKQLIISTALMTVGVAVISWIALPTSFTIFDFGSQKEVQNWQLFLCVAVGLWAGLIIGFV							:	419	
HR	:	KAVKEIEPALKKQLIISTALMTVGVAVISWIALPTSFTIFDFGTSQKEVQNWQLFLCVAVGLWAGLIIGFV							:	419	
BVP1_Kim	:	KAVKEIEPALKKQLIISTALMTVGVAVISWIALPTSFTIFDFGSQKEVQNWQLFLCVAVGLWAGLIIGFV							:	420	
		*	440	*	460	*	480	*			
SK	:	TEYYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYKSVIIPIFAIAISIFVSFSFAAMYGIAMAALGMLS								:	489
HR	:	TEYYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYKSVIIPIFAIAISIFVSFSFAAMYGIAMAALGMLS								:	489
BVP1_Kim	:	TEYYTSNAYSPVQDVADSCRTGAATNVIFGLALGYKSVIIPIFAIAISIFVSFSFAAMYGIAMAALGMLS								:	490
		500	*	520	*	540	*	560			
SK	:	TIATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAIGSAALVSLALFGAFVS								:	559
HR	:	TIATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAIGSAALVSLALFGAFVS								:	559
BVP1_Kim	:	TIATGLAIDAYGPISDNAGGIAEMAGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAIGSAALVSLALFGAFVS								:	560
		*	580	*	600	*	620	*			
SK	:	RASIQTVDVLTTPKVF IGLIVGAMLPYWFSA MTMKS VGSAA LKMVEE VRRQFNTIPG LLEGTAKPDYATCV								:	629
HR	:	RASIQTVDVLTTPKVF IGLIVGAMLPYWFSA MTMKS VGSAA LKMVEE VRRQFNTIPG LLEGTAKPDYATCV								:	629
BVP1_Kim	:	RASIQTVDVLTTPKVF IGLIVGAMLPYWFSA MTMKS VGSAA LKMVEE VPKQFNTIPG LLEGTAKPDYATCV								:	630
		640	*	660	*	680	*	700			
SK	:	KISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIVGTFFGVETLSGVLGSLVSGVQIAISASNTGGAWDNAKKYIEAGA								:	699
HR	:	KISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIVGTFFGVETLSGVLGSLVSGVQIAISASNTGGAWDNAKKYIEAGA								:	699
BVP1_Kim	:	KISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIVGTFFGVETLSGVLGSLVSGVQIAISASNTGGAWDNAKKYIEAGA								:	700
		*	720	*	740	*	760				
SK	:	SEHARTLGPKGSDA HKA AVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFFATHGGLLFKYL							:	764	
HR	:	SEHARTLGPKGSDA HKA AVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFFATHGGLLFKYL							:	764	
BVP1_Kim	:	SEHARTLGPKGSDA HKA AVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFAPFFFATHGGLLFKYL							:	765	

Abb. 3-2 Alignment der BVP1-Proteinsequenzen, abgeleitet aus den entsprechenden cDNA-Sequenzen aus Suspensionskultur (SK) und *hairy roots* (HR) sowie aus der von Kim et al. (1994b) veröffentlichten Sequenz. Der rot unterlegte Bereich ist Teil des katalytischen Zentrums (Takasu et al., 1997).



### 3.1.2 Studien zur Expression vakuolärer Pyrophosphatasen in *B. vulgaris*

Die Expression von V-PPasen in *B. vulgaris* wurde auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene untersucht.

#### 3.1.2.1 Expression der V-PPase in Abhängigkeit von Alter und Gewebe

Zur Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression der beiden V-PPase-Isoformen in unterschiedlichen Geweben wurden Zuckerrüben im Freiland angezogen. Um eine detaillierte zeitliche und räumliche Auflösung zu erreichen, wurden über die gesamte Vegetationsperiode hinweg Proben von *Source*- und *Sink*-Blättern sowie Speicherwurzeln genommen. Das Pflanzenmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Isolierung von Gesamt-RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei der anschließenden Northernblot-Analyse kamen genspezifische 3'-UTR-Sonden zum Einsatz, um die Expression beider Isoformen getrennt voneinander untersuchen zu können. Bei einer Identität der Sondensequenzen von 36% war eine Kreuzhybridisierung unter den gewählten Stringenzbedingungen auszuschließen. Wie in Abb. 3-3 zu sehen, verläuft die Expression beider Isoformen in koordinierter Weise. Zwar ist in allen untersuchten Geweben zu allen Zeitpunkten eine gewisse Basisexpression vorhanden, jedoch sind die Transkriptspiegel in jungen wachsenden Geweben deutlich höher als in reifen Geweben. So ist das Transkriptniveau in jungen Blättern generell höher als in alten, und in der Rübe nimmt die Expression auf mRNA-Ebene im Lauf der Entwicklung immer weiter ab.

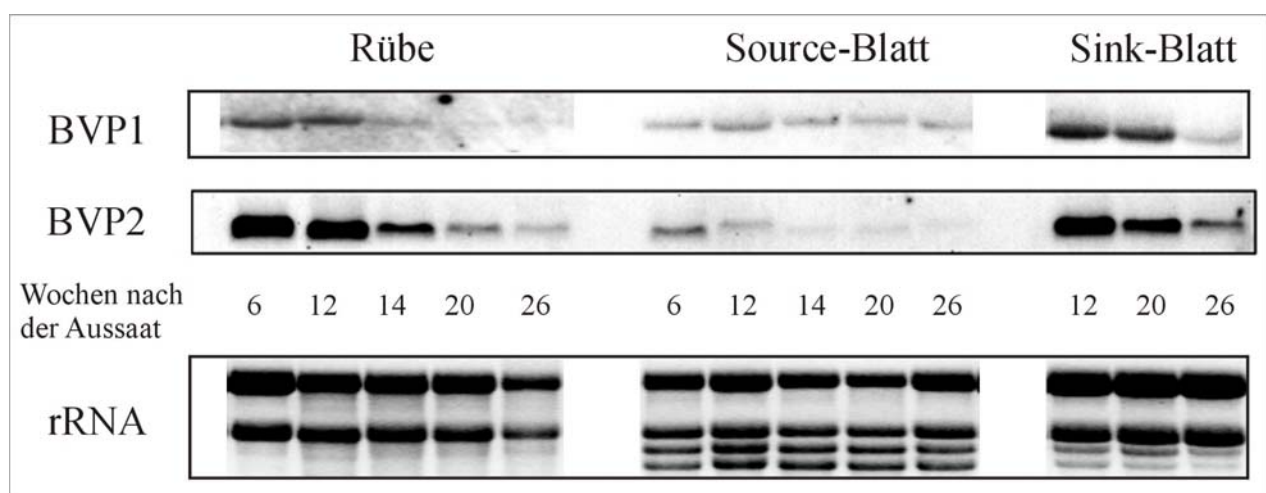


Abb. 3-3 Northernblot-Analyse der V-PPase-Expression in verschiedenen Geweben der Zuckerrübe. Über eine gesamte Vegetationsperiode hinweg wurden Proben von jungen (*Sink*-) und alten (*Source*-) Blättern sowie von Rüben genommen. Für jeden Zeitpunkt wurden die Proben von mindestens drei Pflanzen gemischt. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde jeweils  $15\ \mu\text{g}$  in einem 1,4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit biotinylierten 3'-UTR-Sonden, um die Expression beider V-PPase-Isoformen getrennt voneinander untersuchen zu können. Als Mengenabgleich sind die ethidiumbromidgefärbten Banden der ribosomalen RNA im Gel dargestellt.

### 3.1.3 Sauerstoffkonzentration und Transkriptspiegel der tonoplastidären Protonenpumpen in verschiedenen Zonen der Rübe

Es ist bekannt, dass der interne Sauerstoffpartialdruck in kompakten Pflanzengewebe wie Kartoffelknollen, Früchten oder Samen signifikant erniedrigt ist, selbst wenn die externe Sauerstoffversorgung gut ist. Man vermutet, dass unter hypoxischen Bedingungen generell eine Umstellung hin zu einem ATP-sparenden Metabolismus stattfindet (Geigenberger, 2003). So wurde z.B. als Folge von Anaerobiose in Reiskeimlingen die Induktion der V-PPase auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene beobachtet (Carystinos et al., 1995). Über die Sauerstoffverhältnisse in der Zuckerrübe war bisher nichts bekannt. Daher sollte untersucht werden, ob in der Zuckerrübe hinsichtlich der Sauerstoffkonzentration ein Gradient von der Peripherie bis zum Zentrum existiert und gegebenenfalls eine Korrelation bezüglich der Expression von V-PPase und V-ATPase besteht.

Im Gegensatz zur Kartoffel handelt es sich bei der Zuckerrübe um ein Wurzelgewebe mit ausgeprägtem Xylem. Insofern ist es denkbar, dass das Wasser im Transpirationsstrom die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Speicherwurzel beeinflusst. Daher erfolgten die O<sub>2</sub>-Messungen nur wenige Minuten, nachdem die Rüben samt Blattwerk auf dem Acker ausgegraben worden waren. Mit Hilfe einer Sauerstoff-Mikroelektrode, die lateral in die Rübe eingeführt wurde, konnte die Sauerstoffkonzentration im Abstand von 5 mm gemessen werden. Parallel dazu wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Stanzlinge entnommen, um aus den entsprechenden Zonen Gesamt-RNA zu isolieren. Diese wurde dann einer Northernblot-Analyse unter Verwendung von Sonden für die V-PPase und die Untereinheit c<sub>1</sub> der V-ATPase unterzogen.

Wie in Abb. 3-4A zu sehen, beträgt die Sauerstoffkonzentration direkt unter der Oberfläche nur 12,7% und nimmt nach innen weiter stark ab; 2,5 cm unter der Oberfläche wurde eine O<sub>2</sub>-Konzentration von 3,4% gemessen. Dagegen betrug die Sauerstoffkonzentration im Blattstiel von *B. vulgaris* durchschnittlich 20,3% (Daten nicht gezeigt). Bei der Bestimmung der Transkriptspiegel von V-PPase und V-ATPase wurden in den verschiedenen tiefen Bereichen keine Unterschiede festgestellt (Abb. 3-4B). Auch in tieferen Schichten, die mit der Sauerstoffelektrode nicht mehr erreicht werden konnten, war die Expression überall gleich hoch (Daten nicht gezeigt).

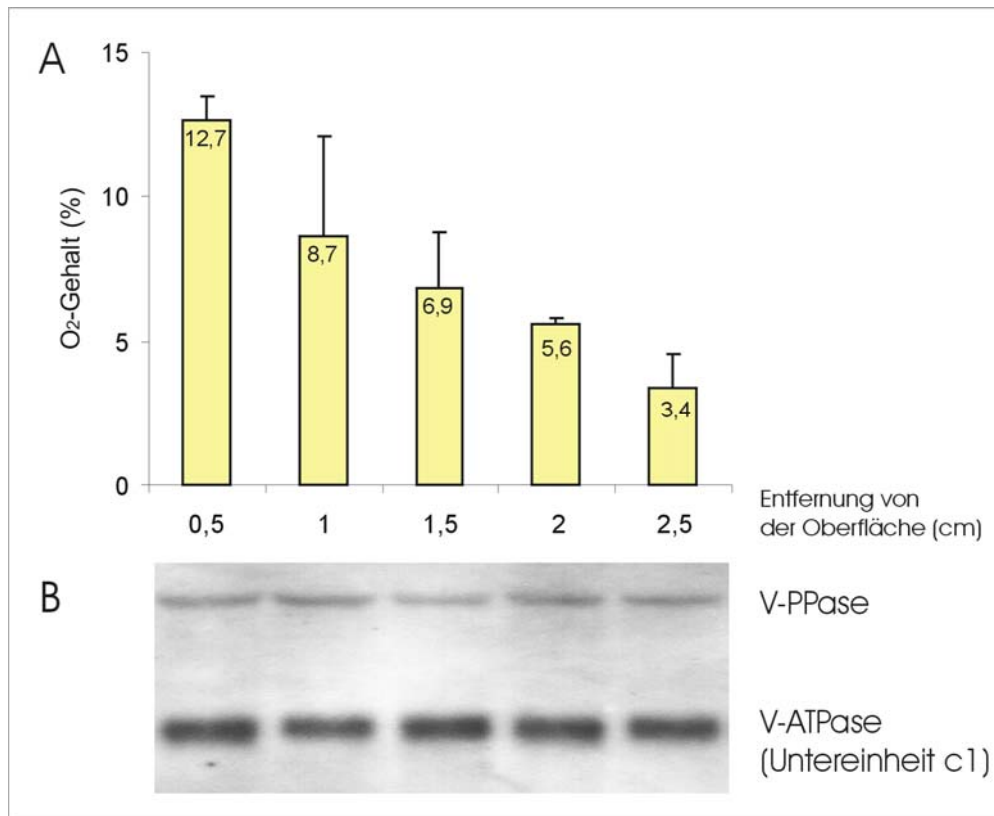


Abb. 3-4 Sauerstoffkonzentration (A) und Transkriptspiegel von V-PPase und V-ATPase (B) in Zuckerrüben je nach Abstand von der Oberfläche. Die dargestellten Sauerstoffkonzentrationen sind Mittelwerte von Messungen, die an 3-4 verschiedenen Rüben durchgeführt wurden. Für die Northernblot-Analyse wurde je 10 µg Gesamt-RNA geblottet. Zum Nachweis der V-ATPase-Untereinheit c<sub>1</sub> wurde eine genspezifische 3'-UTR-Sonde eingesetzt. Die gezeigten V-PPase-Banden wurden mit einer genspezifischen Sonde gegen die Isoform 2 (BVP2) detektiert. Die Verwendung einer BVP1-Sonde führte zum gleichen Ergebnis (nicht gezeigt).

### 3.1.3.1 Immunologischer Nachweis und Aktivitätsmessungen von V-PPase und V-ATPase

Der Nachweis, dass V-PPase und V-ATPase am Tonoplasten lokalisiert sind, erfolgte durch Westernblot-Analysen und Bestimmung der Enzymaktivitäten. Zu diesem Zweck wurde durch Dichtegradientenzentrifugation eine angereicherte Tonoplastenfraktion aus Zuckerrüben nach dreimonatiger Lagerung bei 4 °C isoliert.

Das Ergebnis der Westernblot-Analyse ist in Abb. 3-5 dargestellt. Mit dem verwendeten V-PPase-Antiserum wurde eine einzelne Bande detektiert. Mit Antikörpern gegen die V-ATPase wurden 5 Hauptbanden detektiert, bei denen es um die Untereinheiten A, B, C, D/E und c handelt (Schirmer, 1998). Sowohl V-PPase als auch V-ATPase werden demnach in Rüben exprimiert und sind am Tonoplasten lokalisiert.

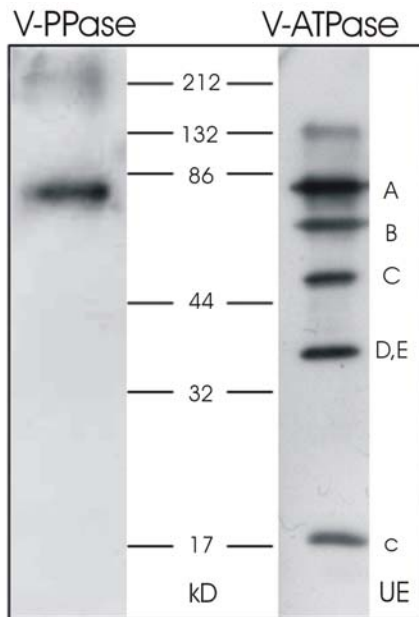


Abb. 3-5 Westernblot-Analyse zum Nachweis von V-PPase und V-ATPase in Zuckerrüben nach dreimonatiger Lagerung bei 4 °C. Es wurde je 5 µg Tonoplastenprotein in einem 12%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Für die Detektion der V-ATPase-Untereinheiten wurde ein gegen die V-ATPase aus *Kalanchoë daigremontiana* gerichtetes Kaninchen-Antiserum verwendet. Zum Nachweis der V-PPase wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das Protein aus *Vigna radiata* eingesetzt. Der vorgefärbte Proteinmarker (Biorad) ermöglichte eine ungefähre Größenbestimmung der detektierten Banden.

Die Aktivität der beiden Enzyme wurde zum einen anhand der Hydrolyseraten nach (Ames, 1966) und zum anderen anhand der Protonenpumpaktivitäten nach (Palmgren, 1990) bestimmt. Wie Abb. 1-6 verdeutlicht, zeigen beide Enzyme in der Speicherwurzel Protonenpumpaktivität. Die maximale Absorptionsabnahme ( $\Delta A_{495\text{nm}}^{\text{max}}$ ) war für beide Enzyme nahezu identisch. Die spezifische Aktivität der V-ATPase war mit einem Wert von  $84 \Delta A_{495\text{ nm}} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  etwa 2,4mal so hoch wie die der V-PPase mit  $35 \Delta A_{495\text{ nm}} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

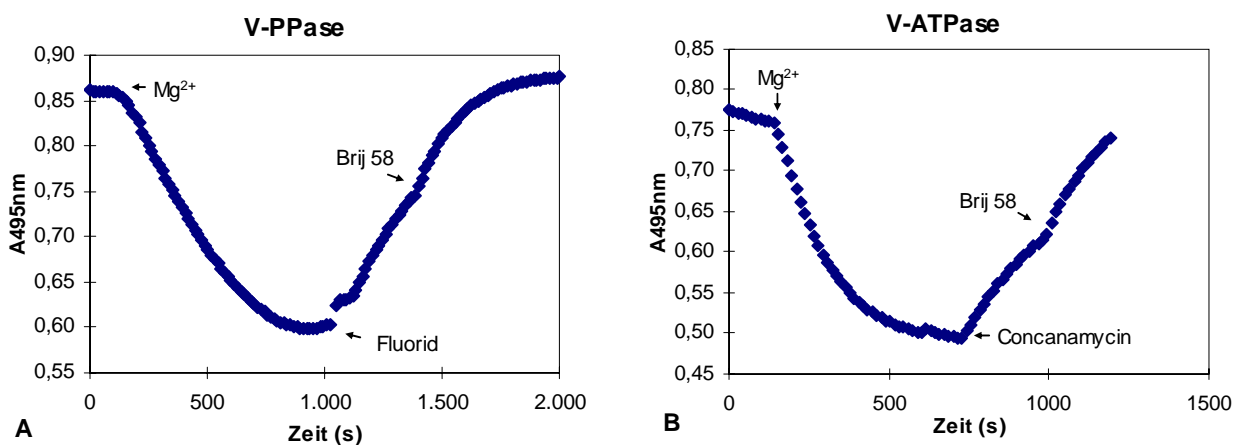


Abb. 3-6 Bestimmung der Protonenpumpaktivität von V-PPase (A) und V-ATPase (B) nach Palmgren (1990). Pro Messung wurde 50 µg angereicherte Tonoplastenfraktion eingesetzt, die aus Zuckerrüben nach 3monatiger 4 °C-Lagerung isoliert worden war. Die Aufnahme von Protonenaufnahme in die Tonoplastenvesikel wurde gemessen als Absorptionsabnahme von Acridinorange bei 495 nm. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von  $\text{MgSO}_4$  (Endkonzentration 4 mM). Nach Erreichen der maximalen Absorption wurden die spezifischen Inhibitoren NaF (V-PPase) und Concanamycin A (V-ATPase) zugesetzt, was zu einem Anstieg der Absorption führte. Bei zusätzlicher Gabe von Brij 58, einem Detergens, kam es zum raschen Zusammenbruch des Protonengradienten und  $A_{495\text{ nm}}$  erreichte wieder den Ausgangswert.

In Einklang damit stehen die Werte der Hydrolyseraten, die anhand von freigesetztem Pi ermittelt wurden. Hier wurde für die V-PPase eine spezifische Aktivität von  $17,3 \mu\text{mol PPi mg}^{-1} \text{h}^{-1}$  gemessen, während der Wert für die V-ATPase mit  $31,6 \mu\text{mol ATP mg}^{-1} \text{h}^{-1}$  fast doppelt so hoch war. Durch Bestimmung verschiedener Volumenaktivitäten wurde sichergestellt, dass die Messungen im linearen Bereich erfolgten.

### **3.1.4 Promotoraktivitäten vakuolärer Pyrophosphatasen in *B. vulgaris*-Suspensionskultur unter besonderer Berücksichtigung von Phosphatmangel**

Phosphatmangel führt bei Suspensionskulturzellen der Zuckerrübe zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptspiegel von BVP2, nicht aber BVP1 (Wang, unveröffentlichte Ergebnisse). Um zu überprüfen, ob dieser isoformspezifische Anstieg auf einer erhöhten Promotoraktivität beruht, wurden Reporterstudien an Suspensionskulturzellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in frisches Gamborg B5<sup>+</sup>-Flüssigmedium überführt und 3 Tage in Abwesenheit oder Gegenwart von  $1,1 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf entsprechende Agarplatten transferiert und mit Promotor-Reporterkonstrukten beschossen. Nach Abgleich der Luciferasedaten, bei dem sowohl die unterschiedliche Transformationseffizienz anhand der parallel ermittelten GUS-Werte als auch die unterschiedliche Größe der verschiedenen Konstrukte berücksichtigt wurden, erhielt man die in Abb. 3-7 dargestellten Promotoraktivitäten.

Bei Anzucht der Zellen mit Phosphat weisen beide BVP-Promotoren erheblich höhere Aktivitäten als der als stark geltende CaMV35S-Promotor auf. Die Luciferaseaktivität des BVP1-Promotors ist fast 5mal so hoch wie die des CaMV35S-Promotors und 2,5mal so hoch wie die des BVP2-Promotors, dessen Aktivität somit doppelt so hoch ist wie die des CaMV35S-Promotors. Dies bestätigt die Ergebnisse von Wang (unveröffentlicht), bei denen die BVP1-Aktivität ebenfalls bis zu 5mal so hoch war wie die des CaMV35S-Promotors. Die für BVP2 ermittelte Aktivität war doppelt etwa doppelt so hoch wie des CaMV35S-Promotors. In dem von Moes (2002) beschriebenen Versuch war die Aktivität des BVP2-Promotors etwa so hoch wie die des CaMV35S-Promotors und ebenfalls deutlich niedriger als die des BVP1-Promotors.

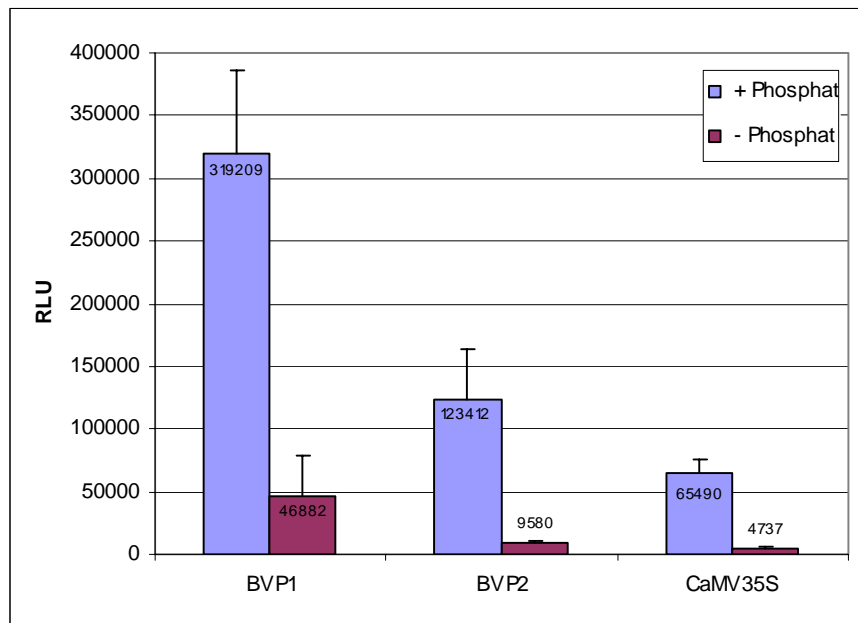


Abb. 3-7 Luciferaseaktivitäten der Promotoren von BVP1 und BVP2 sowie des CaMV35S-Promotors nach ballistischer Transformation von drei Tage alten *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen, die mit (blau) oder ohne (rot) 1,1 mM Phosphat angezogen worden waren. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 10 Beschuss-Experimenten mit den entsprechenden Standardabweichungen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Transformationseffizienzen (GUS-Werte) und Plasmidgrößen.

Werden die Zellen in phosphatfreiem Medium angezogen, kommt es zu einem dramatischen Abfall der Luciferaseaktivitäten; im Vergleich zu den in Vollmedium gewachsenen Zellen sinkt die Restaktivität aller 3 Promotoren auf 8-14%. Demnach scheint der selektive Anstieg des BVP2-Transkriptspiegels in Suspensionskulturzellen nach Phosphatmangel nicht in einer verstärkten Promotoraktivität, sondern eher in einer erhöhten mRNA-Stabilität begründet zu liegen. Allerdings sinkt auch die Luciferaseaktivität des konstitutiv exprimierten CaMV35S-Promotors, für den keine Phosphatabhängigkeit beschrieben ist, stark ab. Dies legt insgesamt den Schluss nahe, dass es in Suspensionskulturzellen bei Phosphatmangel zu einem generellen Absinken der Translation kommt, was zu einer starken Reduktion der Reporterproteinaktivitäten führt. Demnach ist das verwendete Reportersystem nicht zur Klärung der Frage geeignet, ob die erhöhten Transkriptspiegel von BVP2 bei Phosphatmangel auf einer erhöhten Promotoraktivität beruhen. Möglicherweise sind *nuclear run-on assays* eine erfolgversprechendere Alternative.

## 3.2 Lösliche Pyrophosphatasen in *B. vulgaris*

Der PPi-Spiegel im Cytosol pflanzlicher Zellen hängt einerseits von Biosyntheseprozessen wie Protein-, Saccharose- und Zellwandsynthese ab, bei denen PPi als Nebenprodukt entsteht. Auch ein Export des bei der Stärkesynthese gebildeten PPi aus den Plastiden ins Cytosol (Farre et al., 2000) oder cyclische Prozesse zur PPi-Synthese unter Beteiligung von PFK und PFP bzw. V-ATPase und V-PPase wurden diskutiert, blieben jedoch spekulativ (Fernie et al., 2002). Andererseits ist für die cytosolische PPi-Konzentration die Aktivität PPi-verbrauchender Enzyme relevant. Um zur Klärung der Frage beizutragen, welche Rolle dabei lösliche Pyrophosphatasen spielen, sollte am Beispiel der Zuckerrübe untersucht werden, ob S-PPasen existieren, wo diese subzellulär lokalisiert sind und welche biochemischen Eigenschaften sie im Vergleich zu den bekannten V-PPasen aufweisen.

### 3.2.1 Klonierung der ersten löslichen Pyrophosphatase aus *B. vulgaris* (BSP1)

Bis zum Beginn dieser Arbeit lagen keinerlei Sequenzinformationen über lösliche Pyrophosphatasen (S-PPasen) aus der Zuckerrübe vor. Unter Verwendung von Gesamt-cDNA aus Suspensionszellkultur wurde mit Hilfe folgender degenerierter Primer, die anhand der veröffentlichten Sequenzen aus Arabidopsis (EMBL-Datenbank) und Kartoffel (Rojas-Beltran et al., 1999) synthetisiert worden waren, ein 435 bp langes Fragment aus dem kodierenden Bereich amplifiziert: sol-L1 5'-TGCTGCTCATCCWTGGCA-3'

sol-R1 5'-TCRTTYTTCTTGTARTCYTCAA-3'

Durch RACE-PCRs konnten anschließend die flankierenden Bereiche ermittelt und so die gesamte cDNA-Sequenz des als *BSP1* (Beta Soluble Pyrophosphatase 1) bezeichneten Gens kloniert werden. Diese ist insgesamt 1114 bp lang; 5'- und 3'-UTR haben eine Länge von 118 bzw. 330 bp (Abb. 3-9). Das 666 bp lange offene Leseraster kodiert demnach für ein Protein aus 222 Aminosäuren (Abb. 3-11). Die *BSP1*-Sequenz erscheint in der EMBL-Datenbank unter der *accession number* AJ344157.

### 3.2.2 Identifizierung weiterer Gene für S-PPasen im Zuckerrübengenom

#### 3.2.2.1 Southernblot-Analyse

In *A. thaliana* wurden bisher 6 Gene identifiziert, die ortholog zu löslichen Pyrophosphatasen sind. Auch für Kartoffel, Reis und andere Pflanzenarten sind mehrere Isoformen bekannt (Rojas-Beltran et al., 1999). Um der Frage nachzugehen, ob auch in *B. vulgaris* die lösliche

Pyrophosphatase von einer Genfamilie kodiert wird, wurde ein Southernblot angefertigt. Genomische DNA wurde aus Beta-Blättern isoliert, mit 3 verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit einer homologen, 400 bp langen Biotin-Sonde, die gegen den hoch konservierten kodierenden Bereich von *BSP1* gerichtet war.

Wie Abb. 3-8 zeigt, war unabhängig davon, ob die DNA mit *Bam*HI, *Hind*III oder *Eco*RI geschnitten wurde, pro Spur nur eine Bande zu sehen. Dies bestätigte die PCR-Ergebnisse und war zunächst ein Indiz dafür, dass in Beta möglicherweise nur ein Gen für eine lösliche Pyrophosphatase existiert.

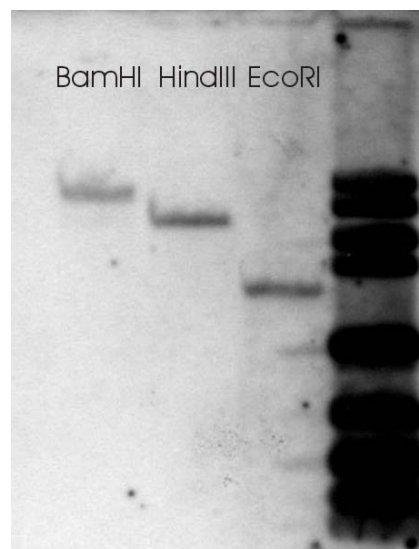


Abb. 3-8 Southernblot-Analyse löslicher Pyrophosphatasen in *Beta vulgaris*. Nach Hybridisierung mit einer Sonde gegen den kodierenden Bereich von *BSP1* war unabhängig vom verwendeten Restriktionsenzym jeweils nur eine Bande zu sehen. Die Temperatur beim Waschen mit hoher Stringenz betrug 55 °C. Rechts außen sind die Banden eines DNA-Markers zu erkennen.

Allerdings hat auch bei *A. thaliana* eine Southernblot-Analyse löslicher Pyrophosphatasen zu der Annahme geführt, es gebe nur eine Isoform (Kieber und Signer, 1991), was erwiesenermaßen nicht richtig ist. Eine Sequenzanalyse der 6 S-PPase-Gene aus *A. thaliana* verdeutlichte schließlich, dass die genomische Organisation äußerst komplex ist: Obwohl die cDNAs nur eine Größe von etwa 1 kb haben, weisen die genomischen Sequenzen bis zu 8 Introns unterschiedlicher Größe auf. Da die *B. vulgaris*-Gene mit großer Wahrscheinlichkeit eine vergleichbare Exon-Intron-Struktur besitzen, sind im Bereich der 400 bp langen Sonde vermutlich 6 Introns vorhanden, die eine Hybridisierung der Sonde verhinderten.



### 3.2.2.2 Durchmusterung einer Zuckerrüben-EST-Datenbank

Durch die Bereitstellung der Zuckerrüben-EST-Datenbank, die im Rahmen des nationalen Genomforschungsprojekts GABI-BEET (<http://gabi.rzpd.de>) erstellt worden war, konnten drei Klone identifiziert werden, die orthologe Sequenzen zu *BSP1* aufwiesen. Diese EST-Klone wurden daraufhin vollständig sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Nukleotidsequenzen der EST-Klone 024-020-B23 und 024-015-A09 große Ähnlichkeit mit der von *BSP1* aufwiesen (s. Abb. 3-9), während die Sequenz von 024-013-F14 erhebliche Abweichungen zeigte.

### 3.2.3 Klonierung von drei weiteren Vollängen-cDNAs löslicher Pyrophosphatasen aus *B. vulgaris*

Die vollständige Sequenzierung des EST-Klons 024-020-B23, der einer Speicherwurzel-cDNA-Bank entstammt, ergab ein offenes Leseraster (ORF) von 657 bp und eine 3'-UTR von 478 bp. Da sich stromaufwärts vom ersten ATG nur 7 Basen befinden, ist das 5'-Ende dieses Klons in jedem Fall unvollständig. Um zu überprüfen, ob dies die 5'-UTR oder sogar den kodierenden Bereich betrifft, wurde eine RACE-PCR durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Sequenz 5'-seitig um 96 bp erweitert werden. Da sich darin kein mögliches Startcodon befindet, ist davon auszugehen, dass bei *BSP2* – wie das Gen im folgenden bezeichnet wird – der für ein 219 Aminosäuren großes Protein kodierende ORF von einer 103 bp langen 5'-UTR flankiert wird. Insgesamt hat die cDNA eine Länge von 1238 bp (Abb. 3-9, Abb. 3-11)

Ebenfalls aus einer Speicherwurzel-cDNA-Bank stammt der Klon 024-015-A09 mit einer Gesamtlänge von 1100 bp. Der kodierende Bereich mit 663 bp - entsprechend 221 Aminosäuren (Abb. 3-11) - wird demnach flankiert von einer 215 bp langen 5'-UTR und einer 222 bp langen 3'-UTR (Abb. 3-9). Die Tatsache, dass in einer Blatt-cDNA-Bank ein unabhängiger Klon mit identischer Sequenz identifiziert wurde, deutet zum einen darauf hin, dass die cDNA-Sequenz vollständig ist, und zeigt zum anderen, dass das im folgenden *BSP3* genannte Gen sowohl in der Rübe als auch im Blatt exprimiert wird.

```

bsp1 : ~~~~~ : -
bsp2 : ~~~~~ : -
bsp3 : ATTGCTACTCTCTCTCTCTCTGCTTTGCTAGTTTGCTTACCTTGAGCTGACAGTCACTCCCTTCTTTCTCCTTTTTCTTTCTCCATCCTTTTG : 100

bsp1 : ATTATAAAACCCTTAAANTAGCGGAGTTTAAAGAAATTTGTAGATCTCCGATCTCTTGTATTCTTCAATCTAAAAGCTTTCGATTTTACGCTCTT : 100
bsp2 : ~~~~~GATCAAAATAGCAACAAGTGTGGGGAGCCTAGCAACCAAGG-----AAGAGACTCTAAAAAAAATCTCCTTTTTCATTCCAGT : 84
bsp3 : CTTCTTTCATAAGCTTAAATAACAGCGATCTACGATTTTTATTAGATCTCACT----TTCATTTCTTTTGTCTCAAGTTTCTCCTTAGTTTCCT : 196

bsp1 : CGC-TAATTTTGTGAACATCGAAGCAGATGAATGCCGTTCCGGAGATCAATGCTGTTGCTTCAAAGTAAAGAAGATTCGCAGACTCCGAAG : 199
bsp2 : GTTTCACCTTAACGAATATGTTGAAGAAATGAA-----GGAGAGGAGAGTAAACCTGAAGGTAGCCACGTCATTTAGGTTTCTCCGGTGGCC--- : 175
bsp3 : CTTCTCAGCTAAAAGAACATGCTTCTCCCTTGAATGAGAAATGAGACTGAGAAAAAGATGTGGG---TATTCAAAATATCCAGCCATCCCTCGT : 293

bsp1 : TTGAACCAAGGATCAATTCCTCAATCTCAAGGAGATCTGTTCCGCCCATCCTTGGCATGATCTCAGATTTGGACCTAATGCCCTCAAATCTGTAACT : 299
bsp2 : CTCATGAGAGATCCTTCTTCCATGACCAGCAATCTGTGCTGCTCACCCCTGGCATGATCTTGAATTTGGCCTGATGCTCCACCACTTTTCAACT : 275
bsp3 : TTAATGAAAGAAATCTTCTCCATGACTAGAAGATCAATGCTGCAACCCATGGCATGATCTGAGATAGGTCCTGAGCTCCTGTAATTTCAACT : 393

bsp1 : GTGTTGTGAGATACCTAAGGGAGCAAGTCAAGTATGAGCTTGACAAGAAACTGGACTTATTATCGTTGATCCAAATATACTCATGTGGTCTA : 399
bsp2 : GTGTTGTGAGATAAGCAAGGGAGCAAGTAAAGTACGAGTTTGACAAGAACTAGGGTTTGAATTAAGTTGATCGGGTCTATACATCATGAGTTGTTA : 375
bsp3 : GTGTCATGAGATAGCTAAGGGAGTAAAGTCAAAATATGAACTTGACAAGAACTGCTGTTTGAATTAAGTTGATCCTATTTCTTATTCATCCGCTGTTA : 493

bsp1 : TCCCAACAATAGGTTTATTCACAGAACATCTGGCAAGATCGTGAACCCATGGAATCTTTAGTCTCATGCAGGAACCACTCCTCCAGGCGGCTT : 499
bsp2 : TCCCAATAATTAAGTTTATTCACAGAACATCTGGCAAGATCGTGAACCCATGGAATCTTTAGTCTCATGCAGGAACCACTCCTCCAGGCGGCTT : 475
bsp3 : TCCCAACAATAGGATTATTCATCCCTCGAACCTTTGGAAGACAGTGAACCCATGGAATCTTTAGTCTCATGCAGGAACCCGCTCCTCCAGGATGCTT : 593

bsp1 : CTTCCAGCCCGGGCAATGGTTTAAATGCTATGATGATCAGGGGAGAAAGACGATTAAGATAATTCAGTTTGTGCCGATGATCCTGAAGTTCCGCATT : 599
bsp2 : CTTCCAGCTCCGGCTATGGACTCATGCTATGATGATCAGGGGAGAAAGACGATTAAGATAATTCAGTTTGTGCCGATGATCCTGAAGTTCCGCATT : 575
bsp3 : TTCCGGCCAAAACCATAGGATTTATGCTATGATGATCAGGGGAGAAAGACGATTAAGATAATTCAGTTTGTGCCGATGATCCTGAAGTTCCGCATT : 693

bsp1 : ACACTGATTCAAACAGCTTCTCCTCATCGTTTGGCTGAGATCAACGCTTTTTTGAAGACTACAAGAAAAATGAGAACAAGAAGTTGCAGTGAATGA : 699
bsp2 : ACAAGGAACCTTAAAGAACTTCTCCTCATCGCTTCCCTGAAATCCGCGTTTCTTTGAAGACTACAAGAAAGAACGAGAACAAGAGCGTTGTGAATGA : 675
bsp3 : TCAATGACTTCAAAGAGCTCCACCTCATCGTTTGGCTGAGATACCTCGCTTTTTTGAAGATTAAGAAAAATGAAAACAAGGAGTTCAGCTTGATGA : 793

bsp1 : ATTTTCCAGCTCAAATTCCTCATCGATGCCATCCACCACTCATGGATCTTAAGCGGAATACATCTACAGACATTGAGGAGATGAAATGCCACTT : 799
bsp2 : ATCGGAACTTAAAGAACTTCTCCTCATCGCTTCCCTGAAATCCGCGTTTCTTTGAAGACTACAAGAAAGAACGAGAACAAGAGCGTTGTGAATGA : 775
bsp3 : GTTCTTCCCGCTTCTAATGGCCATGAGGCAATACAGTACTCATGGATCTTAAGCGAACTAGCTGTCGAGACCTTGGAGCACAGTATTCCTTAAATG : 893

bsp1 : T--CAAATATTGTCATTCATA-----TCCTGAAGTAAATGAGGCTTTGGTCCACATCTTACATCTTATTTTGGG-----CTACCTATTAAAGAG : 887
bsp2 : CG-TGCTATGCAACAACAAGCCTTCCCTCATCGCTTCCCTGAAATCCGCGTTTCTTTGAAGACTACAAGAAAGAACGAGAACAAGAGCGTTGTGAATGA : 874
bsp3 : CAGTCAATATTGAGATTGAA-----TGTAACTTGAAGGCTTGTGATTCAGATATTTCACACAGGTTTATTCC----CTTATCTGTGAATA : 981

bsp1 : TCGATGTT---GCAATCCCAAAAGAAAGGAATTTCCCTGTTCTTTCTGAAATCTTCTGTCGAATAATTTAIGTATTGTAGAAAGCAAA : 984
bsp2 : TAAATGCCA-GCAGCTTTGATAGGTTTATATCATCATGATAAGTTCCTGAAATCCGCGTTTCTTTGAAGACTACAAGAAAGAACGAGAACAAGAGCGTTGTGAATGA : 971
bsp3 : TAGATGTTGAGTGGTGGTACATTTCTTACTGTCCTTGAAGTTGGATGCTACGCTGTGTAATACCATCTTAAACGGTTGTAAAT---GCTCCAC : 1079

bsp1 : ACAATCTTCATGACTTTCAAGTTGAGTTCCCTATCAATGTTGCTTAGGAGGCTATTGTAATGCTCAATTTATTCGACTTCAATG--TC-----TTTTCT : 1082
bsp2 : ATGCATGGTCCAGGTTTTTAAATGAAATGATATGCAGTCTTGTATAAGTTGCACCAATCTGCTCCCTTTACATTTTATACCGGGCAGATGAGGGAA : 1071
bsp3 : ATGAAT--TGAAATTTTTTCGCT----- : 1100

bsp1 : TTTTCTATAAAATATNCATTTTTTTATAT----- : 1114
bsp2 : ACAATGAAAATGGACCTCCCAAGCGGTGGGGATTTGGTAAATTCAGTTGGTTTGAAGTTTAAACACCAATTTTTTCTCTTTTTTACCGCGTGAATATGTT : 1171
bsp3 : ~~~~~ : -

bsp1 : ~~~~~ : -
bsp2 : CTTTCATGCTTGTAAACAAGATTTGAATCCGTGCCCTTTTGTATATACATGACACAATTCCTCATCTC : 1238
bsp3 : ~~~~~ : -

```

Abb. 3-9 cDNA-Alignment der drei isolierten S-PPase-Sequenzen *BSP1-BSP3* aus *B. vulgaris*. Die Startcodons sind grün, die Stopcodons rot unterlegt.

Der Klon 024-013-F14 wurde in einer Blatt-cDNA-Bank identifiziert. Seine unvollständige Sequenz besteht aus einem offenen Leseraster von 601 bp und einer 3'-UTR, von der nur 20 bp bekannt sind. Zur Ermittlung des 5'-Endes wurde zum wiederholten Male die RACE-Technologie erfolgreich angewendet. Das mit BSP4 bezeichnete Gen hat demnach eine 111 bp lange 5'-UTR und einen kodierenden Bereich von 897 bp, womit das entsprechende Protein mit 299 Aminosäuren deutlich größer als die übrigen drei ausfällt. Die cDNA-Sequenz von *BSP4* ist aufgrund der geringen Sequenzidentität zu den übrigen 3 Isoformen gesondert in Abb. 3-10 dargestellt.

```

1  gaaaacttcc cacttcagtc tccaaactca cagctcttct ctgcattttg tggctgaaac
61  tgtgaccagg tgcagaaaca gagagagaga gaaagagagt gagcaacaac aatggcgact
121 acaagagtaa taacagcagc agcaagcaat actacctctt ccttaatctt caaacgccct
181 ccttcttctt cttcatttca tattctaaag agatcctcta attctctttc tctctccttc
241 aaaaaaccaa ctctctctaa acgcctcttc acttgccgcg ctatttatag acctcaagat
301 gttttctcta aagaacaagg tcagcctgaa accctcgatt atcacgtctt cttcgtcgat
361 acttccggca agaaggtttc cccttggcat gatatcccat tgcaactggg agatggtatt
421 ttttaattttg ttggtgaaat accaaaagaa tcaagtgcta agatggaggt tgcgaccgac
481 gagctttaca ctcccataaa gcaggatacc aagaagggaa aacttcgata ttacccttac
541 aatataaatt ggaattatgg cctattacca caaacatggg aagacccatc actagccaac
601 tctgaagtgg aagggtgcatt tttagacaat gatcccgtcg atggtggtga aataggtgaa
661 aaggagcgga cggttggaga gattttgaaa atcaaaccctt tagctgatat ggctatgatt
721 gatgagggtg aacttgactg gaaaataatc gctatttcat tggatgatcc caaagcttct
781 cttgtgaatg atggtgagga cgtggagaag catttcctg gaactttaac agcaatcagg
841 gactggttta gagattacaa aatcccagat ggaaaaccag ctaacaagtt cggctcttggc
901 aacaaggcag caagcaagga ttatgctctc aaggatcatca ccgagactaa tgaatcttgg
961 gctaaactcg tgaagcgtaa tattgctgct ggggaactct ccctagtg agacgatgct
1021 cccctcgt

```

Abb. 3-10 cDNA-Sequenz der S-PPase *BSP4* aus *B. vulgaris*. Das Startcodon ist grün, das Stopcodon rot unterlegt.

### 3.2.4 Analyse und Vergleich der Primärstruktur der vier S-PPasen aus *B. vulgaris*

In Abb. 3-11 sind die abgeleiteten Proteinsequenzen der vier isolierten S-PPasen aus *B. vulgaris* gezeigt. BSP1-BSP3 weisen die 17 hoch konservierten Reste, die sämtlichen bisher identifizierten S-PPasen gemeinsam sind (Sivula et al., 1999), bei BSP4 ist ein Glycin durch Alanin ersetzt (s. rote Markierungen).

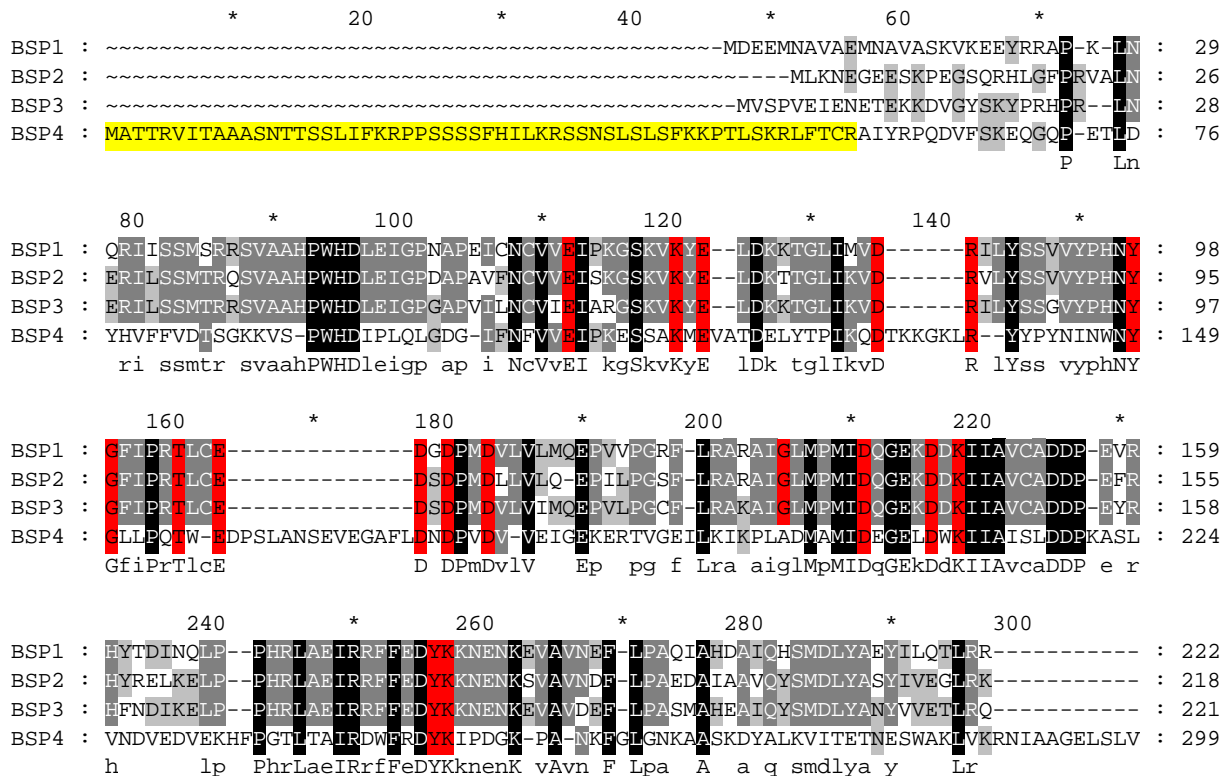


Abb. 3-11 Proteinsequenz-Alignment der vier klonierten S-PPasen aus *B. vulgaris*. Die 17 hoch konservierten Aminosäuren, die bei allen bisher isolierten S-PPasen aus allen taxonomischen Gruppen gefunden wurden (Sivula et al., 1999), sind rot markiert. Das 56 Aminosäuren lange plastidäre Transitpeptid des BSP4-Proteins, welches durch das Programm *TargetP* identifiziert wurde, ist gelb hervorgehoben.

Die Sequenzen von BSP1, BSP2 und BSP3 sind sich mit Identitäten zwischen 82,4 und 85,5% sehr ähnlich (s. Tab. 3-1), wobei sich die größten Unterschiede – wie generell bei S-PPasen üblich – im N-terminalen Bereich finden. Wie aus Tab. 3-2 hervorgeht, ähneln sich die drei Isoformen nicht nur in Größe und Sequenz, sondern auch in ihrem errechneten pI-Wert. Die Primärstruktur der Isoform BSP4 zeigt hingegen deutliche Abweichungen: Das Protein ist vor allem aufgrund des erheblich längeren N-terminalen Bereichs erheblich größer und besitzt nur 36-38% Sequenzidentität zu den anderen Isoformen (Tab. 3-1; Tab. 3-2).

Isoform	BSP1	BSP2	BSP3	BSP4
<b>BSP1</b>	100	82,4	83,4	36,0
<b>BSP2</b>		100	85,5	38,2
<b>BSP3</b>			100	37,4
<b>BSP4</b>				100

Tab. 3-1 Identitäten der vollständigen Proteinsequenzen der vier klonierten S-PPase-Isoformen aus *B. vulgaris* (in %).

Isoform	Aminosäuren	M <sub>r</sub> [kDa]	pI
<b>BSP1</b>	222	25,5	5,62
<b>BSP2</b>	219	24,9	5,31
<b>BSP3</b>	221	25,4	5,46
<b>BSP4</b>	299	35,5	5,86

Tab. 3-2 Anzahl der Aminosäuren, relative Massen und errechnete pI-Werte der drei S-PPase-Isoformen aus *B. vulgaris*.

### 3.2.5 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung

Die abgeleiteten Proteinsequenzen von BSP1, BSP2 und BSP3 weisen 83-85% Identität zu einer Isoform aus *Solanum tuberosum* auf, für die durch immunocytochemische Untersuchungen eine cytosolische Lokalisierung nachgewiesen werden konnte (Rojas-Beltran et al., 1999). Um weitere Hinweise auf die subzelluläre Lokalisierung der vier S-PPasen aus *B. vulgaris* zu erhalten, wurden sowohl *in silico*-Analysen als auch Reporterproteinstudien durchgeführt.

Unter Verwendung des Programms *TargetP* wurde für die Proteine BSP1-BSP3 eine Lokalisierung im Cytosol vorausgesagt. Eine Lokalisierung in den Plastiden wurde aufgrund fehlender Transitpeptide ausgeschlossen, während dasselbe Programm bei BSP4 ein 56 Aminosäuren langes plastidäres Transitpeptid eindeutig identifizierte (s. gelbe Markierung in Abb. 3-11).

Demnach gibt es in *B. vulgaris* mehrere cytosolische Isoformen und eine plastidäre Isoform für lösliche Pyrophosphatasen. Durch umfangreiche Sequenzvergleiche konnte festgestellt werden, dass diese Aussage auch für andere höhere Pflanzen zutrifft. Des Weiteren ließen die Vergleiche mit potentiellen S-PPase-Sequenzen aus Pilzen, Tieren und Prokaryonten interessante Rückschlüsse aus phylogenetischer Sicht zu. Die Ergebnisse dieser Datenbankrecherche werden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Rahmen der Diskussion ausführlich dargestellt. Für die Fragestellungen im Hinblick auf den Saccharosestoffwechsel der Zuckerrübe waren die cytosolischen S-PPase-Isoformen von übergeordnetem Interesse und wurden daher experimentell detailliert untersucht.

Um das Ergebnis der *in silico*-Analyse für BSP1 zu überprüfen, wurden Reporterproteinstudien durchgeführt. Dazu wurde der gesamte kodierende Bereich von BSP1 vor die Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) in einen modifizierten pFF19-Vektor kloniert (Wachter et al., 2004). Um eine optimale Translation zu gewährleisten, wurde unmittelbar vor das Startcodon eine Kozak-Sequenz (5'-GCCACC-3') eingefügt. Als Positivkontrolle wurde ein pFF19-Plasmid verwendet, das die Sequenz für ein anderes Fusionsprotein enthält; dieses besteht aus einem 81 Aminosäuren langen Transitpeptid der plastidären  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase ( $\gamma$ -ECS) aus *Brassica juncea* und dem rot-fluoreszierenden Proteins (RFP). Beide Reporterengenkonstrukte standen unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors (Abb. 3-12).

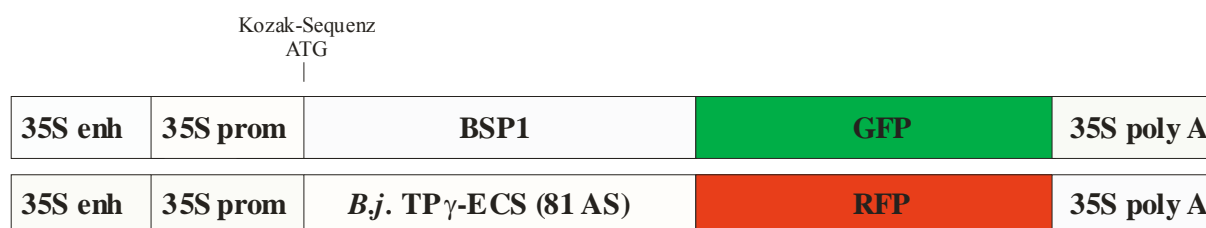


Abb. 3-12 Schematische Darstellung der beiden Reporterengenkonstrukte zum Nachweis der subzellulären Lokalisierung von BSP1 (Erläuterungen im Text).

Die Plasmide wurden in einem Doppelbeschuss mittels Partikelkanone in Suspensionskulturzellen von *B. vulgaris* eingebracht. 24 h nach dem Beschuss wurden die Zellwände mit Hilfe lytischer Enzyme verdaut (Protoplastierung). Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung nach weiteren 24 h ergab, dass BSP1 im Cytosol lokalisiert ist: Während das RFP-Fusionsprotein des Kontrollplasmids in die Plastiden geschleust wurde, welche infolgedessen rot leuchteten, war das grün fluoreszierende

BSP1-GFP-Fusionsprotein in den cytosolischen und kernnahen Bereichen zu sehen (Abb. 3-13). Damit konnten für BSP1 die Voraussagen der Sequenzanalysen *in vivo* bestätigt werden.

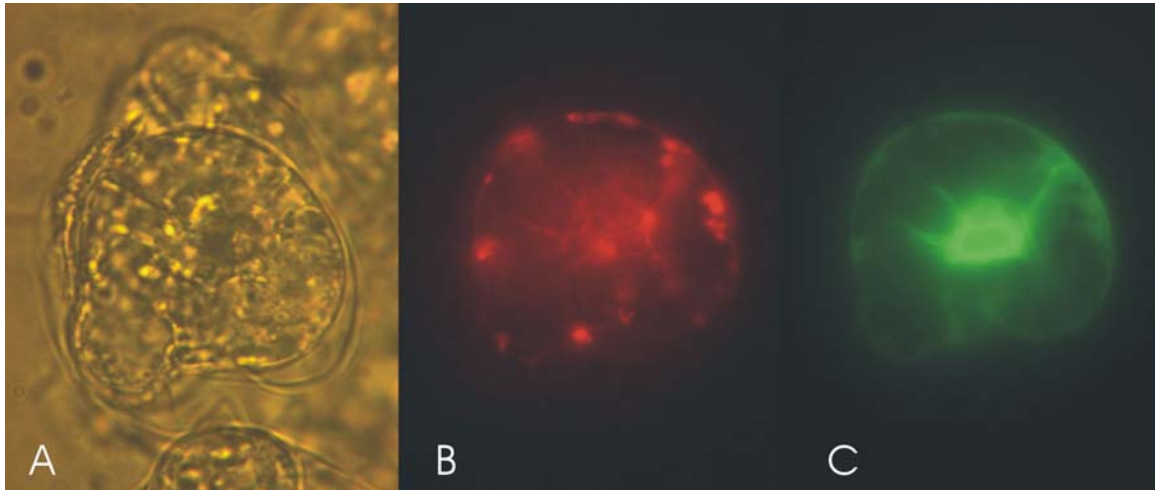


Abb. 3-13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transformierten Zuckerrübenzellen. A: Im Durchlicht ist die transformierte *Beta vulgaris*-Zelle nicht von untransformierten zu unterscheiden. B: Nach Anregung des RFP leuchten aufgrund des fusionierten plastidären Transitpeptids der  $\gamma$ -ECS aus *B. juncea* die Plastiden rot (Kontrolle). C: Die Anregung des GFP zeigt, dass die mit dem GFP fusionierte S-PPase BSP1 kein solches Signalpeptid besitzt. Stattdessen erscheinen die cytoplasmatischen und kernnahen Bereiche des Protoplasten grün.

### 3.2.6 Studien zur Expression von BSP1

Die Expression von BSP1 in verschiedenen Geweben der Zuckerrübe wurde auf Transkript- und Proteinebene untersucht. Einen ersten Hinweis auf die Expression von BSP1 lieferte die Tatsache, dass es bei der 5'-RACE-PCR keine Rolle spielte, ob als Ausgangsmaterial RNA aus jungem Blatt, Speicherrübe, Suspensionskultur oder *hairy roots* eingesetzt wurde. Das bedeutet, dass in all diesen Geweben Transkripte von BSP1 vorhanden sein mussten, da sonst keine Amplifikation identischer Sequenzen möglich gewesen wäre.

#### 3.2.6.1 Northernblot-Analysen

Die Detektion von BSP1 mittels einer homologen 3'-UTR- Sonde gestaltete sich schwierig. Trotz vergleichbarer Länge der verwendeten Sonden waren die Northernblot-Signale im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen (V-PPase, V-ATPase) schwach, weshalb relativ lange Expositionszeiten (>24 h) gewählt werden mussten. Wie mehrere Northernblot-Analysen zeigten, ist die BSP1-Transkriptmenge in nicht photosynthetisch aktiven Geweben der Zuckerrübe deutlich höher als in grünen. So ließ sich in alten Blättern kein und in jungen Blättern nur relativ wenig BSP1-Transkript nachweisen, während in Suspensionskulturzellen

und wachsenden Rüben die mRNA-Spiegel höher waren (Abb. 3-14A). Die Expressionsanalyse verschiedener Gewebe über die gesamte Vegetationsperiode (Abb. 3-14B) ergab, dass die Transkriptspiegel in Wurzeln junger Pflanzen vergleichsweise hoch sind. Auch in jungen Rüben war die BSP1-mRNA gut nachweisbar, doch wurde das Signal mit zunehmender Entwicklung immer schwächer und war schließlich kaum noch detektierbar. Bei jungen Blättern war das Signal deutlich schwächer als bei Wurzeln derselben Pflanze. In *Source*-Blättern war das BSP1-Transkript generell nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3-14 Northernblot-Analyse der BSP1-Expression in unterschiedlichen Geweben der Zuckerrübe. A: Transkriptniveau in altem Blatt (AB), jungem Blatt (JB), Suspensionskultur (SK) und junger Rübe (JR). B: Expression in Wurzeln und Rübe in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Gegen Ende der Vegetationsperiode sowie im 2. Jahr nach der Aussaat (J2) ist kein BSP1-Transkript mehr nachweisbar. Je 15 µg Gesamt-RNA wurde in einem 1,4%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer biotinylierten 3'-UTR-Sonde. Im Vergleich zu Sonden mit ähnlicher Länge, die zum Nachweis von V-PPase oder V-ATPase-Transkripten verwendet wurden, musste eine 10-20mal längere Expositionszeit gewählt werden.

### 3.2.6.2 Westernblot-Analyse

Mit Hilfe des in *E. coli* überexprimierten BSP1-Proteins wurden zwei polyklonale Antiseren aus Kaninchen gewonnen. Diese wurden eingesetzt, um durch Westernblot-Analyse lösliche Pyrophosphatasen in Blättern von *A. thaliana* und *B. vulgaris* sowie in der ausgewachsenen Beta-Speicherwurzel nachzuweisen. Dazu wurde je 5 µl Rohextrakt - entsprechend 2,5 mg Frischgewichtsäquivalenten - in einem 15%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das rekombinante Protein aufgetragen. Wie Abb. 3-15 zeigt, ist im Immunoblot bei der Arabidopsis-Blattprobe im Bereich von 30 kDa eine Bande zu erkennen. Bei den Beta-Proben sind sowohl im Blatt als auch in der Rübe zwei Banden zu sehen. Dass die obere der beiden Banden BSP1 repräsentiert, konnte mit Hilfe transgener Arabidopsis-Pflanzen geklärt werden, die BSP1 überexprimierten: Bei diesen Transformanten erschien eine zusätzliche Bande auf Höhe der oberen Bande, die bei den Proben aus Zuckerrübe zu sehen ist (vgl. Abb. 3-28). Ob es sich bei der unteren Bande um ein Abbauprodukt oder eine andere Isoform handelt, lässt sich (noch) nicht beurteilen. Das rekombinante Protein läuft aufgrund der 6 N-terminalen Histidinreste und weiterer klonierungsbedingter Aminosäuren weniger weit. Bei den zahlreichen schwächeren Banden darunter, die bei Auftrag geringerer



Proteinmengen (1-10 ng) vollständig verschwanden (Daten nicht gezeigt), handelt es sich um Abbauprodukte.

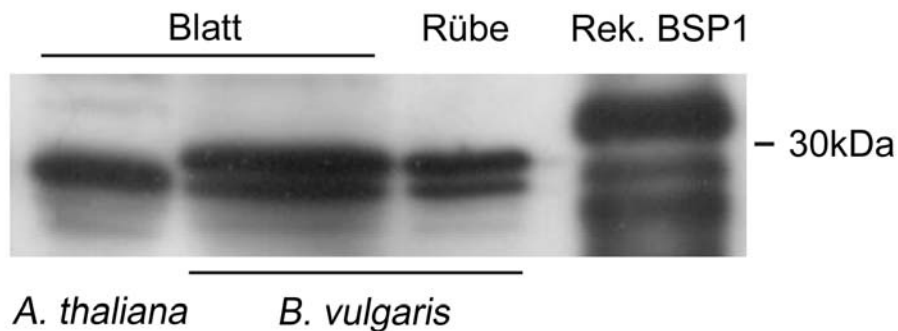


Abb. 3-15 Nachweis löslicher Pyrophosphatasen mittels Immunoblot in Blattproben von *A. thaliana* und *B. vulgaris* sowie in der reifen Beta-Rübe.

Da die Verwendung zweier Anti-BSP1-Seren, die von unterschiedlichen Kaninchen stammten, zum selben Ergebnis führte, während mit den entsprechenden Prä-Immunsereen keine Signale zu sehen waren (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass es sich bei den hier gezeigten Banden um spezifische immunologische Reaktionen handelt. Demnach sind sowohl in Blättern als auch in reifen Speicherwurzeln lösliche Pyrophosphatasen vorhanden. Bezogen auf identische Frischgewichtäquivalente scheint bei der Zuckerrübe die Proteinmenge im Blatt höher zu sein als in der Speicherwurzel. Wie die Amidoschwarzgefärbte Membran verdeutlichte, war die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein bei der Blattprobe aber erheblich größer als bei der Rübenprobe. Demnach wäre – bezogen auf identische Gesamtproteinmengen – die Signalintensität in der Rübe höher als im Blatt.

### 3.2.7 BSP1 und BSP2: Heterologe Überexpression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich funktionell tatsächlich um Pyrophosphatasen handelt, wurden die Proteine BSP1 und BSP2 in *E. coli*-Zellen überexprimiert, aufgereinigt und anschließend auf Pyrophosphataseaktivität hin getestet. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) kloniert. Die Synthese der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurde nach Erreichen einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,9 durch IPTG induziert, dessen Bindung an das Lac-Repressorprotein den starken T5-Phagenpromotor aktivierte.

### 3.2.7.1 Optimierung der Parameter für die Überexpression

Um die Proteinausbeute zu optimieren, wurden IPTG-Konzentration (0,1-1 mM) sowie Anzuchttemperatur (20, 28 und 37 °C) und -dauer (3-15 h) der Bakterien variiert. Dabei stellte sich die Anzucht über Nacht bei 37 °C in Gegenwart von 1 mM IPTG als optimal heraus. Infolgedessen wurden diese Bedingungen bei den folgenden Aufreinigungen standardmäßig gewählt. Für die sich anschließende Nickel-Affinitätschromatographie war es nicht möglich, den vom Hersteller empfohlenen Natriumphosphat-Puffer zu verwenden, da der anschließende Nachweis der Pyrophosphataseaktivität auf der Freisetzung von Phosphat beruht. Daher wurde alternativ 50 mM MOPS-Puffer verwendet. Des Weiteren war es für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine essentiell, dass alle verwendeten Puffer 5 mM  $Mg^{2+}$  enthielten. Ohne Magnesium war in den Elutionsfraktionen keine Pyrophosphataseaktivität nachweisbar, obwohl darin laut SDS-PAGE Proteine der erwarteten Größe vorhanden waren und sich im Reaktionspuffer  $Mg^{2+}$ -Ionen befanden. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass es (außerhalb des katalytischen Zentrums) ein Bindungszentrum für  $Mg^{2+}$  als Stabilisator des Proteins gibt. Auf die Bedeutung von  $Mg^{2+}$  für die Lagerung (s. 3.2.7.3) und Aktivität (s. 3.2.8.5) der rekombinanten S-PPasen aus *B. vulgaris* wird später eingegangen.

### 3.2.7.2 Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

In Abb. 3-16 ist exemplarisch das Ergebnis einer Aufreinigung des rekombinanten BSP1-Proteins über Nickel-Affinitätschromatographie nach Aufschluss der Bakterien mit Lysozym dargestellt. Im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (Spur 1) ist nach Induktion mit IPTG eine zusätzliche Bande auf Höhe der 30 kDa-Markerbande im Überstand des Bakterienlysats zu erkennen (Spur 2). Dabei handelt es sich um das rekombinante BSP1-Protein, das aufgrund der sechs N-terminalen Histidinreste sowie weiterer Aminosäuren, deren Vorhandensein durch die Expressionskassette des Vektors bedingt ist, insgesamt 23 Aminosäuren länger ist als das native Protein. Im Durchfluss (Spur 3) ist deutlich weniger BSP1-Protein vorhanden, was auf die Histidin-vermittelte Bindung an die Nickel-NTA-Agarosematrix zurückzuführen ist. Bei den folgenden Waschschrritten mit 20-50 mM Imidazol wurden unspezifisch an die Säule gebundene *E. coli*-Proteine sowie der Großteil des Lysozyms von der Säule gewaschen (Spur 5-7). Die Elution des gereinigten BSP1-Proteins erfolgte mit Imidazolkonzentrationen von 100 und 250 mM.

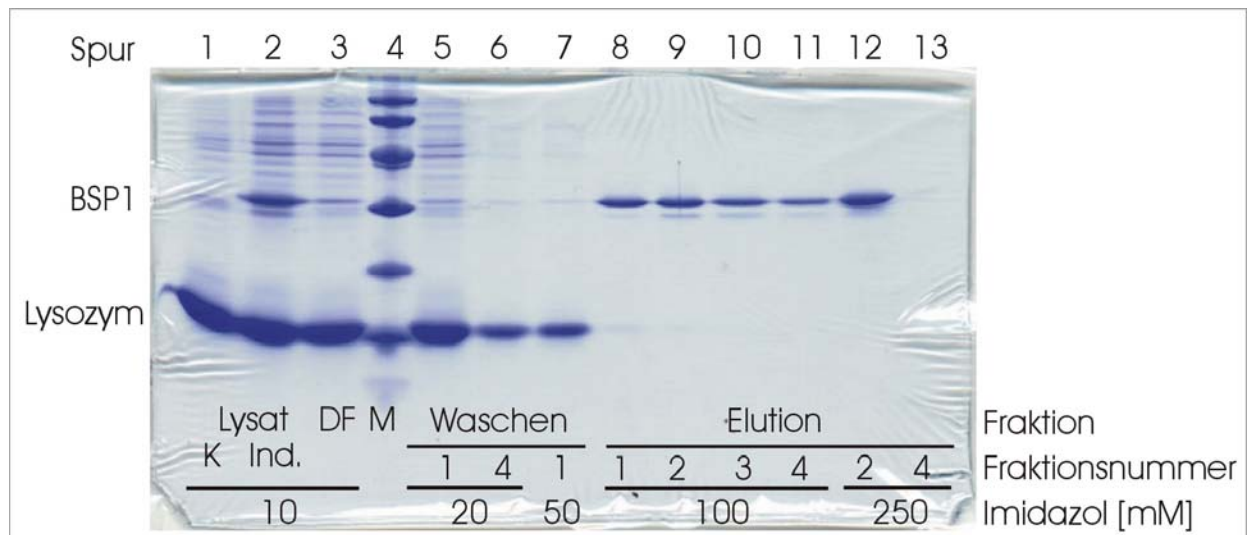


Abb. 3-16 Coomassie-gefärbtes PAA-Gel (15%) nach Aufreinigung des rekombinanten BSP1-Proteins über Nickel-Affinitätschromatographie und gelelektrophoretischer Auftrennung ausgewählter Fraktionen. Nachdem die Bakterien einer 50ml-Kultur eine  $OD_{600}$  von 0,9 erreicht hatten, wurde die Synthese des rekombinanten BSP1 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 1 h Wachstum bei 37 °C wurden die Bakterien pelletiert und 30 min in 2,5 ml lysozymhaltigem Puffer inkubiert. Nach Zentrifugation befand sich im Überstand das ca. 30 kDa große rekombinante BSP1-Protein (Spur 2), welches in der nicht-induzierten Kontrolle fehlt (Spur 1). Dies zeigt, dass der T5-Phagenpromotor nur in Gegenwart von IPTG aktiv war. Nach 30minütiger Inkubation mit Nickel-NTA-Agarose wurde das Protein-Matrix-Gemisch in eine Säule gefüllt und der Durchfluss (DF) gesammelt (Spur 3). Es folgten mehrere Wasch- und Elutionsschritte mit Puffern steigender Imidazolkonzentration, wobei das Volumen jeder Fraktion 0,5 ml betrug: viermal 20 mM, zweimal 50 mM, zweimal 75 mM, viermal 100 mM und viermal 250 mM Imidazol (vgl. Spur 5-13). Von jeder Fraktion wurde 37,5  $\mu$ l auf das Gel geladen. Als Proteinstandard wurde der LMW-Marker (Amersham) aufgetragen (Spur 4). Weitere Erläuterungen im Text.

Die so gereinigten Proteine BSP1 und BSP2 wurden anschließend auf ihre Pyrophosphataseaktivität hin getestet und einer umfangreichen biochemischen Analyse unterzogen. Des Weiteren wurde das rekombinante BSP1-Protein zur Gewinnung zweier Kaninchen-Antiseren (vgl. 3.2.6.2) eingesetzt.

### 3.2.7.3 Lagerung

Um die optimalen Bedingungen für die Lagerung der rekombinanten Proteine herauszufinden, erfolgte die Aufbewahrung der Elutionsfraktionen bei unterschiedlichen Temperaturen. Es stellte sich heraus, dass das Einfrieren auf -20 °C und/oder das Auftauen der Proben zu einem Totalverlust der Pyrophosphataseaktivität führte. Dabei war es unerheblich, ob die Proben ohne oder mit 25 bzw. 50% Glycerol eingefroren wurden. Zwischen der Lagerung bei RT und 4 °C gab es keine wesentlichen Unterschiede, weshalb die Fraktionen standardmäßig bei RT aufbewahrt wurden. Allerdings unterschieden sich die beiden rekombinanten Proteinen untereinander im Hinblick auf die Stabilität: Während BSP2 über Wochen hinweg in Lösung blieb und kaum an Aktivität verlor, fiel ein Teil des BSP1-Proteins kontinuierlich aus, was sich auch in einem Verlust an Aktivität widerspiegelte.

Auf die Bedeutung von  $Mg^{2+}$ -Ionen für die Stabilität während der Aufreinigung wurde bereits unter 3.2.7.1 verwiesen. In Einklang mit diesem Ergebnis steht die Tatsache, dass das Dialysieren der Elutionsfraktionen gegen einen magnesiumfreien Puffer zu einem völligen Aktivitätsverlust im Fall von BSP1 und einer 50%igen Aktivitätsreduzierung im Fall von BSP2 führte (vgl. 3.2.8.5).

### **3.2.8 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine BSP1 und BSP2**

Zum Nachweis der Pyrophosphataseaktivität wurde der bei Rojas-Beltran et al. (1999) beschriebene Assay verwendet, der auf dem photometrischen Nachweis eines Molybdat-Orthophosphatkomplexes beruht. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der beiden rekombinanten S-PPasen aus der Zuckerrübe wurde der Einfluss zweiwertiger Kationen, der Temperatur, des pH-Werts sowie der Konzentration von  $PP_i$  und  $Mg^{2+}$  auf die Enzymaktivität bestimmt. Des Weiteren wurden die Quartärstruktur und die mögliche Ausbildung von Disulfidbrücken untersucht.

#### **3.2.8.1 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Enzymaktivität**

Es ist eine gemeinsame Eigenschaft sämtlicher Pyrophosphatasen, dass sie – unabhängig davon, ob sie membrangebunden oder löslich sind –, nur in Gegenwart zweiwertiger Ionen, insbesondere von  $Mg^{2+}$  aktiv sind. Demzufolge wurde die Aktivität von BSP1 und BSP2 in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener zweiwertiger Ionen (je 2,5 mM) bei einer  $PP_i$ -Konzentration von 1 mM getestet (Abb. 3-17). Die höchste Aktivität war bei beiden Enzymen erwartungsgemäß in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  zu beobachten, während ohne Magnesium überhaupt keine Aktivität messbar war. Die Aktivität sank ebenfalls auf Null, wenn sich 10 mM EDTA im Reaktionspuffer befand, welches die  $Mg^{2+}$ -Ionen komplexierte (Daten nicht gezeigt). Ersetzte man  $Mg^{2+}$  durch  $Mn^{2+}$ , war im Fall von BSP1 noch 25% Restaktivität vorhanden, während BSP2 sogar 44% Restaktivität aufwies. Bei  $Co^{2+}$  zeigten beide Enzyme knapp 20% Restaktivität, verglichen mit  $Mg^{2+}$ . Hingegen war mit  $Ca^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  keine Pyrophosphataseaktivität messbar.

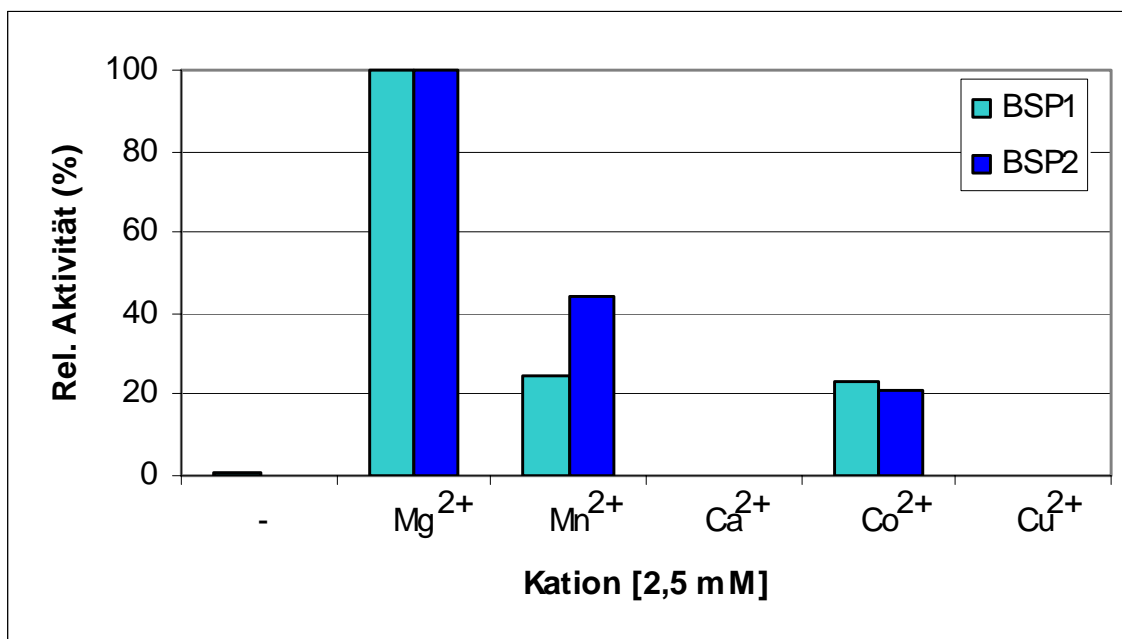


Abb. 3-17 Relative Pyrophosphataseaktivität von BSP1 und BSP2 in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Kationen. Die Konzentration dieser Kationen im Reaktionspuffer betrug jeweils 2,5 mM, die P<sub>Pi</sub>-Konzentration 1 mM.

In Gegenwart von 2,5 mM Mg<sup>2+</sup> war die Aktivität stark herabgesetzt, wenn sich gleichzeitig Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Reaktionspuffer befanden (Abb. 3-18): in Gegenwart von 50 µM Ca<sup>2+</sup> war die Aktivität von BSP1 um 55% und die von BSP2 um 62% reduziert. Bei einer Konzentration von 500 µM Ca<sup>2+</sup> betrug die Restaktivität 4 bzw. 1%.

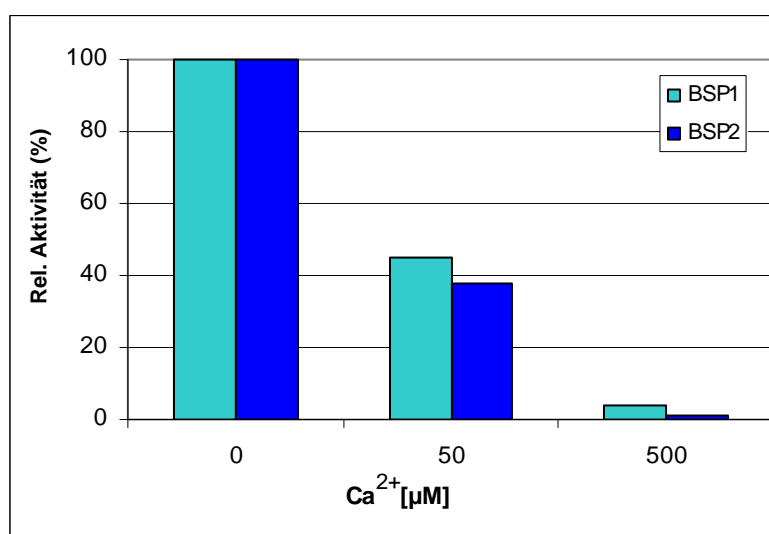


Abb. 3-18 Relative Pyrophosphataseaktivität von BSP1 und BSP2 in Gegenwart von 0, 50 und 500 µM Ca<sup>2+</sup>. Die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration betrug 2,5 mM, die P<sub>Pi</sub>-Konzentration 1 mM.

### 3.2.8.2 Einfluss des pH-Werts auf die Pyrophosphataseaktivität

Die Abhängigkeit der Pyrophosphataseaktivität vom pH-Wert ist in Abb. 3-19 dargestellt. Demnach liegt das pH-Optimum von BSP1 bei 8,0 und das von BSP2 bei 7,5. Höhere pH-Werte führen bei beiden Enzymen zu einem rapiden Aktivitätsverlust. Bemerkenswert ist, dass sich die relative Aktivität der beiden Isozyme im neutralen bzw. leicht sauren pH-Bereich unterscheidet: so weist BSP1 bei pH 7,0 nur noch 53% der maximalen Aktivität auf, während BSP2 hier noch 83% Restaktivität besitzt. Bei pH 6,0 ist der Unterschied noch extremer: 25% Restaktivität für BSP1 gegenüber 58% für BSP2.

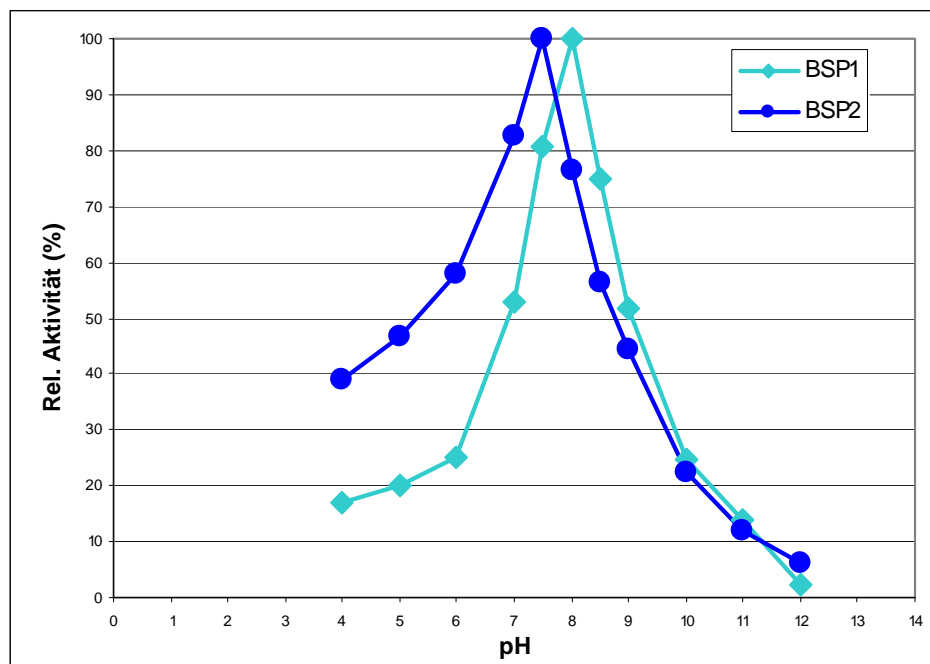


Abb. 3-19 Bestimmung des pH-Optimums für BSP1 und BSP2. Gemessen wurde in einem pH-Bereich von 4 bis 12 in Gegenwart von 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM PPI.

### 3.2.8.3 Einfluss der Temperatur auf die Pyrophosphataseaktivität

Zur Bestimmung der Temperaturoptima wurde die Aktivität der beiden Isozyme in einem Bereich von 26-70 °C gemessen. Dabei erfolgte die Zugabe der Enzyme nach 10minütiger Inkubation des Reaktionspuffers bei verschiedenen Temperaturen. Wie Abb. 3-20 verdeutlicht, zeigten die Isozyme unterschiedliche Temperaturoptima: BSP1 hatte bei 53 °C, BSP2 sogar bei 58 °C die höchste Aktivität. Beide Proteine weisen damit eine vergleichsweise hohe Thermostabilität auf. Bei einer Temperatur von 70 °C betrug die Restaktivität nur noch 14 bzw. 17%. Nach 5minütiger Inkubation bei 90 °C kam es zu einem vollständigen Verlust der Pyrophosphataseaktivität (Daten nicht gezeigt).

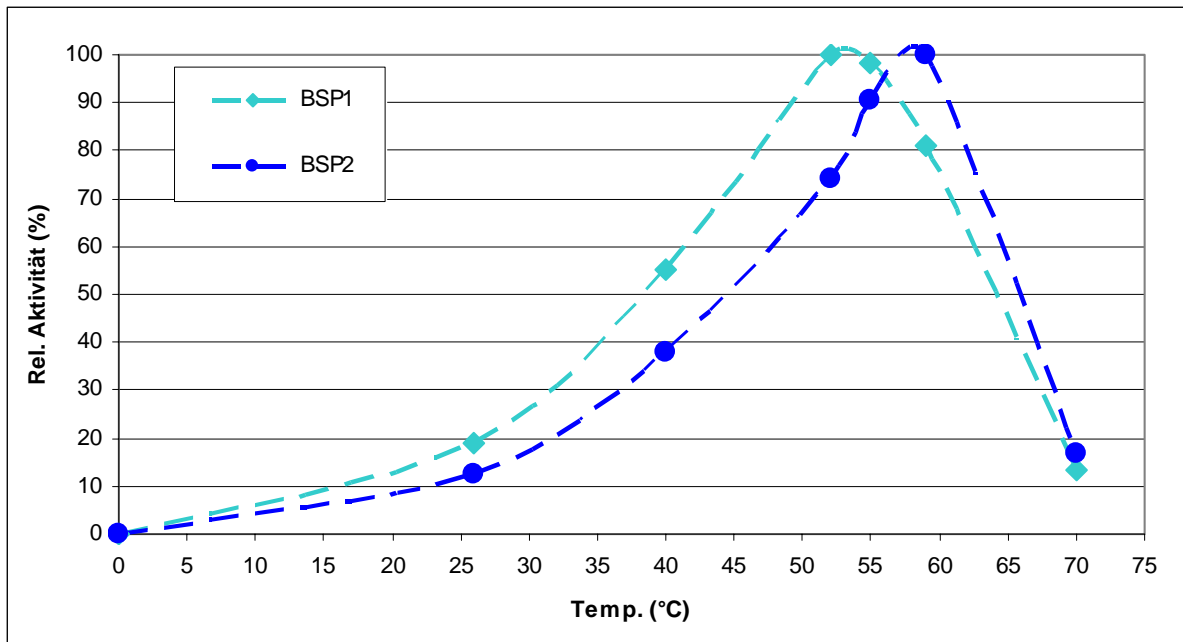


Abb. 3-20 Temperaturoptima von BSP1 und BSP2. Die Pyrophosphataseaktivität wurde in Gegenwart von 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{PPi}$  bestimmt. Die Reaktion wurde nach 10minütiger Inkubation des Reaktionspuffers bei verschiedenen Temperaturen zwischen 26 und 70 °C durch Zugabe des entsprechenden Enzyms gestartet.

#### 3.2.8.4 Einfluss der Pyrophosphatkonzentration auf die Aktivität – Bestimmung der $K_m$ -Werte für BSP1 und BSP2

Um die Affinität der S-PPasen aus *B. vulgaris* zum Substrat zu untersuchen, wurde die Aktivität von BSP1 und BSP2 bei steigender  $\text{PPi}$ -Konzentration in Gegenwart von 2,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  bestimmt (Abb. 3-21). Wie die hyperbolischen Kurven verdeutlichen, zeigen beide Enzyme typische Michaelis-Menten-Kinetik. Mit Hilfe von Eadie-Hofstee-Diagrammen wurde der  $K_m$ -Wert bestimmt, der demnach für BSP1 bei 51  $\mu\text{M}$  und für BSP2 bei 53  $\mu\text{M}$   $\text{PPi}$  liegt.

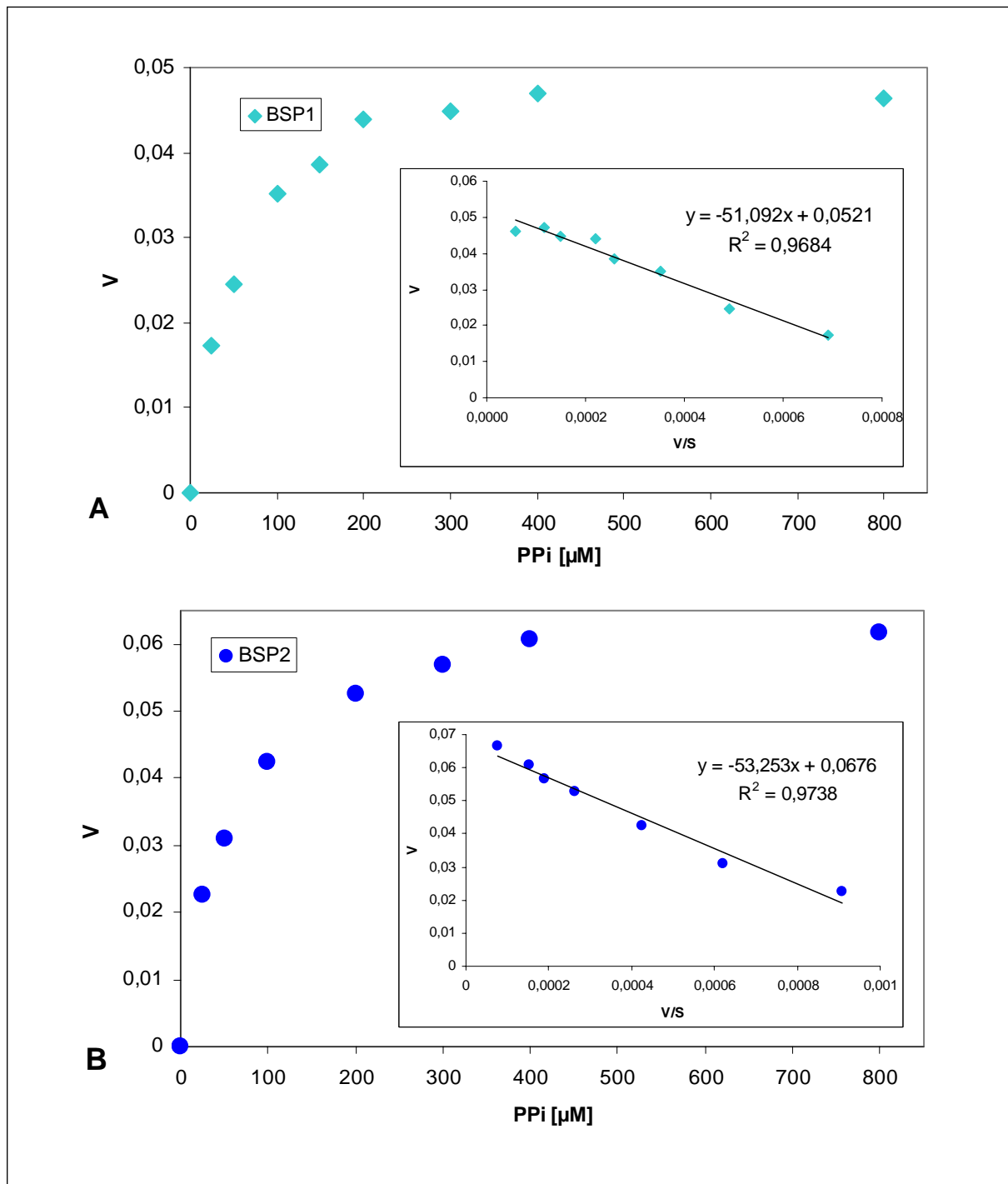


Abb. 3-21 Einfluss verschiedener PPI-Konzentrationen (0-800  $\mu\text{M}$ ) auf die Aktivität von BSP1 (A) und BSP2 (B) in Gegenwart von 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Die kleinen Schaubilder zeigen Eadie-Hofstee-Diagramme, mit Hilfe derer die  $K_m$ -Werte beider Isozyme für PPI graphisch bestimmt wurden.



### 3.2.8.5 Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Pyrophosphataseaktivität

Standardmäßig wurden bei den Assays zur Bestimmung der Pyrophosphataseaktivität Aliquots der Elutionsfraktionen verwendet, die bei der Nickel-Affinitätschromatographie der rekombinanten Proteine gesammelt worden waren (s. 3.2.7). Da die Elutionspuffer 5 mM  $\text{MgCl}_2$  enthielten, mussten die Proteine zunächst umgepuffert werden, bevor der Einfluss unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen auf die Aktivität getestet werden konnte. Dies geschah durch Dialyse gegen einen magnesiumfreien Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0). Die Dialyse erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur oder 4 °C. Dabei fiel ein Großteil des gelösten Proteins aus, im Fall von BSP1 so viel, dass praktisch keine Pyrophosphataseaktivität mehr messbar war. Bei BSP2 war die Aktivität unter Standardbedingungen (1 mM PPI, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) nach der Dialyse bei 4 °C etwa halb so hoch wie davor. So ließen sich mit dieser dialysierten Probe Untersuchungen zum Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Aktivität von BSP2 durchführen.

In Gegenwart von 1 mM PPI war bei  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  praktisch keine PPase-Aktivität messbar. Ab einer Konzentration von 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  war die Aktivität annähernd maximal, weshalb diese Konzentrationsverhältnisse routinemäßig für Aktivitätsmessungen verwendet wurden. Im Gegensatz zur hyperbolischen Kurve, die man bei steigender PPI-Konzentration beobachtete, erhielt man im Hinblick auf die Aktivität von BSP2 bei steigender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 3-22).

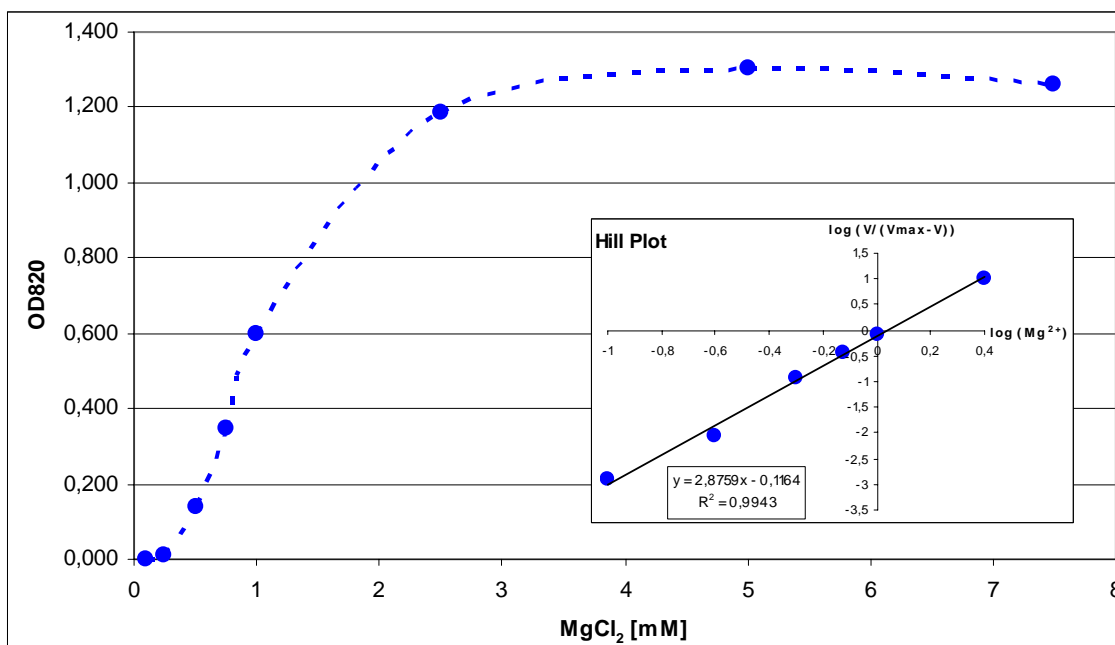


Abb. 3-22 Aktivität von BSP2 in Abhängigkeit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration. Die PPI-Konzentration betrug jeweils 1 mM. Die Darstellung der Daten als Hill-Plot ist in dem kleinen Diagramm zu sehen. Anhand der Steigung wurde ein Hill-Koeffizient von 2,9 ermittelt.

Der graphisch ermittelte Hill-Koeffizient ergab einen Wert von 2,9, was auf einen positiven kooperativen Effekt hinweist. Es stellte sich somit die Frage, ob es bei BSP2 zu einer Interaktion mehrerer Untereinheiten kommt. Daher sollte das Molekulargewicht des Enzyms unter quasi-physiologischen Bedingungen durch FPLC bestimmt werden.

### 3.2.8.6 FPLC-Analyse

Um festzustellen, ob die pflanzliche S-PPase als Monomer vorliegt oder ein Oligomer bildet, wurde mit dem rekombinanten BSP2-Protein eine FPLC-Analyse durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde auch überprüft, ob  $Mg^{2+}$  einen Einfluss auf die Quartärstruktur hat. Wie in Abb. 3-23A dargestellt, erhielt man unter Verwendung eines  $Mg^{2+}$ -freien Laufpuffers zwei Hauptpeaks bei 60,3 und 50,4 ml, was nach Eichung der Säulen  $M_r$ -Werten von 28 und 54 kDa entspricht. Dies bedeutet, dass BSP2 in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen überwiegend als Monomer und zu einem geringeren Anteil als Dimer vorliegt. Wird die Säulenchromatographie hingegen in Gegenwart von 5 mM  $Mg^{2+}$  durchgeführt, beobachtet man einen einzelnen Peak bei 46 ml, was einer relativen Masse von ca. 71 kDa entspricht. Ob es sich dabei möglicherweise um ein Trimer oder ein noch größeres Oligomer handelt, muss in einem Wiederholungsexperiment unter Verwendung eines für diesen Größenbereich besser geeigneten Säulenmaterials (z.B. Sephadex G-200) gezeigt werden. Ganz offensichtlich induziert aber  $Mg^{2+}$  eine Oligomerisierung bei BSP2, wofür auch die sigmoidale Kinetik in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration (Abb. 3-22) spricht.

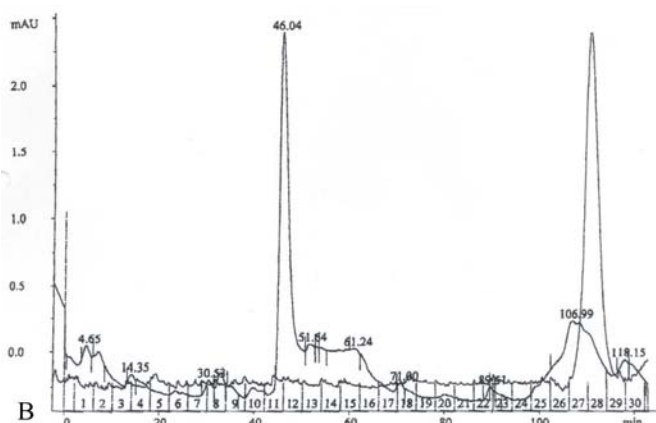
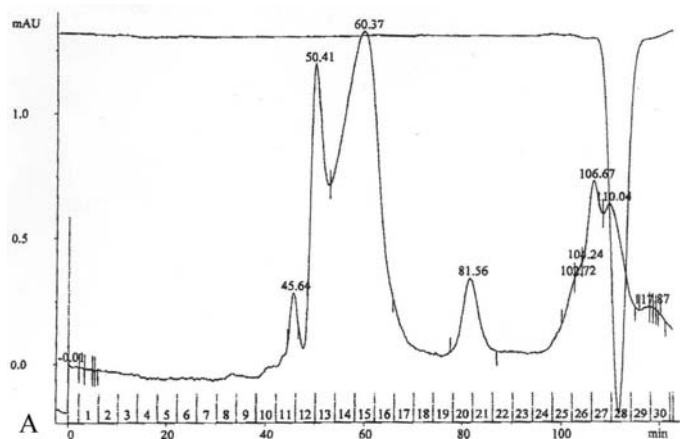
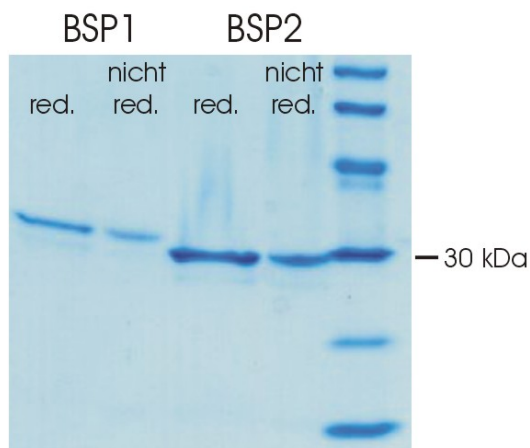


Abb. 3-23 FPLC-Analyse von BSP2 in Gegenwart und Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ . Die Läufe wurden mit einer Superdex 75-Säule wie unter 5.5.7 beschrieben in Abwesenheit (A) oder Gegenwart (B) von 5 mM  $MgCl_2$  durchgeführt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. Im Versuch B wurde weniger Protein eingesetzt. Da Proteine in verdünnter Lösung gewöhnlich eher zur Monomerbildung neigen als in konzentrierter, ist die beobachtete Oligomerisierung umso bemerkenswerter.

### 3.2.8.7 Redoxregulation

Wie das Proteinalignment in Abb. 3-11 zeigt, weisen die BSP-Sequenzen an drei Positionen konservierte Cystein-Reste auf; bei BSP1 und BSP3 existiert jeweils noch ein zusätzliches Cystein. Um zu überprüfen, ob die Cystein-Reste Disulfidbrücken ausbilden, wurden die rekombinanten Proteine BSP1 und BSP2 in reduzierendem oder nicht reduzierendem Auftragspuffer aufgenommen, einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend mit Coomassie gefärbt. Wie in Abb. 3-24 zu sehen ist, wurde das Laufverhalten der Proteine durch die unterschiedlichen Redoxbedingungen der Auftragspuffer nicht beeinflusst, so dass davon



auszugehen ist, dass die löslichen Pyrophosphatasen in *B. vulgaris* keine inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken ausbilden.

Abb. 3-24 Vergleichende SDS-PAGE von BSP1 und BSP2 unter verschiedenen Redox-Bedingungen. Die Laufstrecken der Proteine sind identisch, unabhängig davon ob ein reduzierender oder nicht reduzierender Auftragspuffer verwendet wurde.

### 3.3 Transgene Pflanzen mit Überexpression von vakuolärer und löslicher Pyrophosphatase aus *B. vulgaris*

Zur Klärung der Frage, ob die Transportleistung der tonoplastidären Antiportsysteme durch die Überexpression einer vakuolären Pyrophosphatase gesteigert werden kann, wurden *A. thaliana* (Modellorganismus) und *B. vulgaris* (Nutzpflanze) mit dem *BVP1*-Gen, das für eine V-PPase aus *B. vulgaris* kodiert, durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer transformiert. Durch Transformation mit *BSP1*, dem Gen einer löslichen Pyrophosphatase aus *B. vulgaris*, sollte überprüft werden, ob die Überexpression einer pflanzlichen S-PPase andere Auswirkungen auf den pflanzlichen Metabolismus hat als die einer V-PPase oder einer bakteriellen S-PPase (Jelitto et al., 1992; Sonnwald, 1992; Lerchl et al., 1995). Schließlich wurde ein Doppelkonstrukt für die gleichzeitige Überexpression von *BVP1* und *BSP1* zur Stimulation von Wachstums- und Membrantransportprozessen hergestellt.

#### 3.3.1 Herstellung der Konstrukte

Für die Überexpression von V- und S-PPase wurden Sequenzen aus *B. vulgaris* verwendet. Dazu wurden die Sequenzen von *BVP1* (L32792) oder *BSP1* (AJ344157), die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert worden war, samt den untranslatierten Bereichen in den Pflanzentransformationsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) kloniert (Abb. 3-25A, B). Um beide Gene gleichzeitig überexprimieren zu können, wurde ein spezielles pBinAR-Doppelkonstrukt (DK) hergestellt, in dem sich die kompletten Expressionskassetten beider Gene in entgegengesetzter Orientierung auf der T-DNA befanden (Abb. 3-25C).

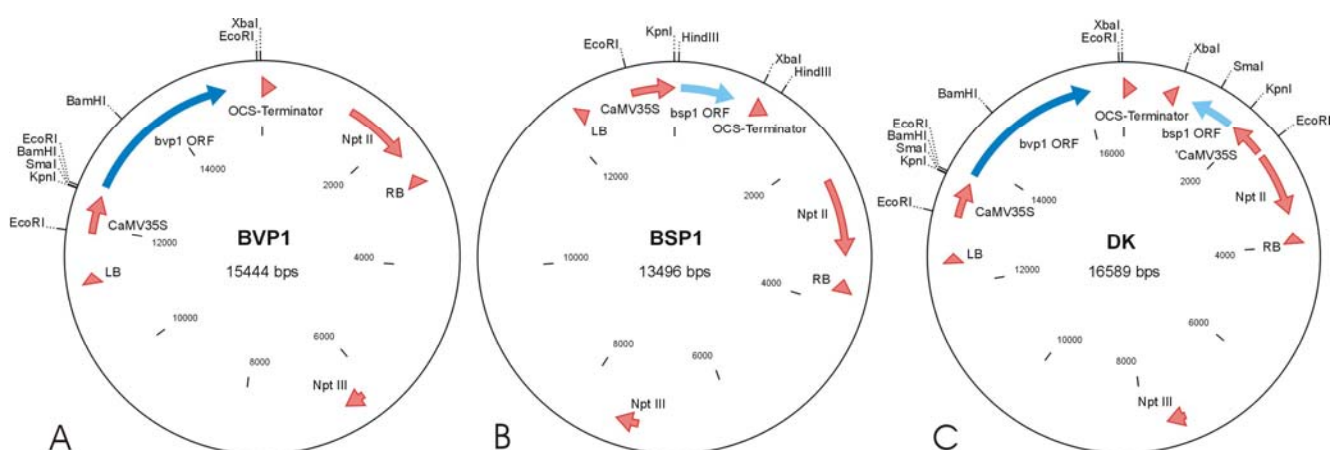


Abb. 3-25 Die drei pBinAR-Konstrukte zur Überexpression von V-PPase (A), S-PPase (B) oder beiden PPasen zugleich (C). Im Doppelkonstrukt (DK) befinden sich die Expressionskassetten in entgegengesetzter Orientierung zwischen *left border* (LB) und *right border* (RB) der T-DNA. Die Transgene stehen unter Kontrolle des konstitutiven CaMV35S-Promotors und des OCS-Terminators. Der Vektor vermittelt sowohl eine bakterielle (*npt III*) als auch eine pflanzliche (*npt II*) Resistenz gegen Kanamycin.

### 3.3.2 Pflanzentransformation und Selektion positiver Transformanten

Die Herstellung transgener Zuckerrüben, die über Blattscheibentransformation mit anschließender Regeneration in Sterilkultur unter Selektionsbedingungen erfolgte, wurde bei der KWS Saat AG (Einbeck) durchgeführt. Dabei konnten bisher 13 kanamycinresistente V-PPase- und 8 S-PPase-Transformanten, aber noch keine Doppeltransformanten regeneriert werden. Um das Expressionslevel von BVP1 sowie BSP1 in den transgenen Zuckerrüben mit dem im Wildtyp zu vergleichen, wurde Gesamt-RNA aus Blättern der Transformanten in Sterilkultur isoliert und Northernblots unter Verwendung genspezifischer Sonden hergestellt. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptspiegel in 4 der BVP1- und 5 der BSP1-Linien gegenüber den beiden Wildtyp-Linien deutlich erhöht waren (Abb. 3-26). Diese Linien werden derzeit zur Blüte gebracht, um Saatgut für die Rübenproduktion zu gewinnen.

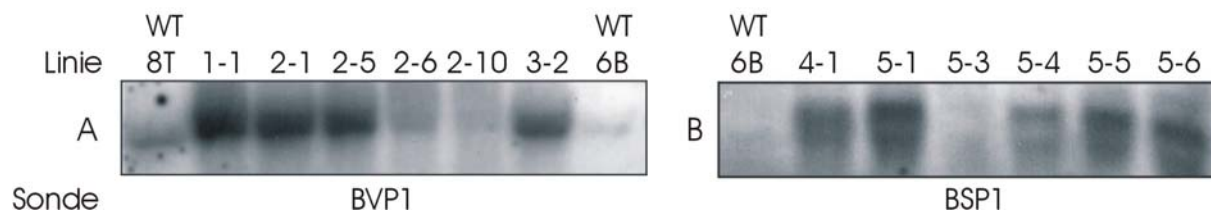


Abb. 3-26 Northernblot-Analyse transgener Zuckerrüben-Linien, die BVP1 (A) oder BSP1 (B) überexprimieren. Aus Blättern der Pflanzen in Sterilkultur wurde Gesamt-RNA isoliert und es wurde je 15 µg nach Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe genspezifischer Sonden.

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe der *Floral dip*-Methode (s. 5.9.4.4). Die Samen der Transformanten wurden auf kanamycinhaltigem MS-Agar ausgesät. Für alle drei Konstrukte wurden kanamycinresistente Pflanzen erhalten, die anschließend in Erde umgesetzt wurden. Der Nachweis des ektopisch exprimierten BVP1-Gens in Pflanzen der T1-Generation erfolgte wie bei den Zuckerrübentransformanten mittels Northernblot. Auch hier zeigte sich, dass die Expression des Transgens u. a. aufgrund von Positionseffekten sehr unterschiedlich war (Abb. 3-27).

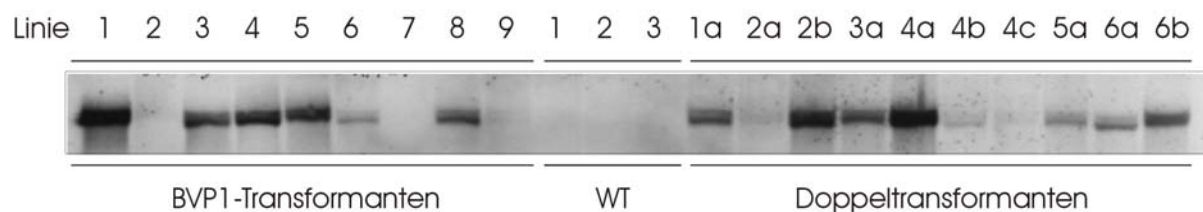


Abb. 3-27 Northernblot-Analyse ausgewählter Arabidopsis-Linien (T1-Generation), welche BVP1 allein oder in Kombination mit BSP1 (Doppeltransformanten) überexprimieren. Bei der Hybridisierung nach Blotten von 15 µg Gesamt-RNA wurde eine genspezifische 3'-UTR Sonde gegen *BVP1* verwendet. Da diese nicht mit dem Transkript der endogenen V-PPase hybridisiert, ist beim Wildtyp (WT) kein Signal zu erkennen.

Die Expression von BSP1 in transgenen Arabidopsis-Pflanzen konnte mit geringerem Aufwand über Westernblot-Analysen untersucht werden, da es sich dabei erstens um ein lösliches Protein handelte und zweitens das Beta-Protein größer als die vom Antikörper detektierte endogene S-PPase war. Dazu wurde eine cytosolische Proteinfraction aus Blättern isoliert und je 1,5 mg Frischgewichtäquivalent auf ein 14%iges PPA-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten erfolgte die Detektion mit Hilfe eines polyklonalen BSP1-Antikörpers. In Abb. 3-28 ist exemplarisch ein Immunoblot mit Proben von BSP1-Transformanten dargestellt (bei den Doppeltransformanten war das gleiche Bandenmuster zu beobachten): Im Wildtyp (WT) ist im Bereich von 30 kDa nur eine Hauptbande zu sehen, welche von endogenen S-PPasen herrührt. Bei den Transformanten ist oberhalb dieser Bande eindeutig eine zusätzliche Bande zu erkennen, bei der es sich um BSP1 handelt, wie der Vergleich mit der Kontrolle (K) aus Zuckerrübe zeigt.

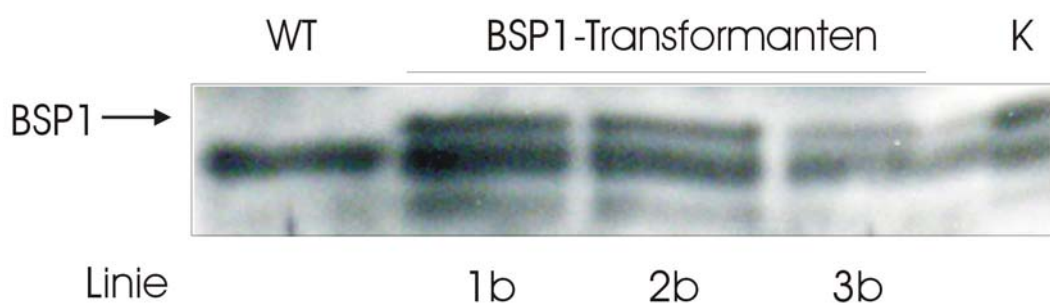


Abb. 3-28 Westernblot-Analyse transgener Arabidopsis-Linien mit BSP1-Überexpression. Im Vergleich zum Wildtyp erscheint bei den BSP1-Transformanten eine zusätzliche Bande. Auf gleicher Höhe ist auch bei der Kontrolle (K) aus Zuckerrübe eine Bande zu sehen. Weitere Erläuterungen im Text.

Auf diese Weise konnten für Arabidopsis 6 Linien mit gesteigerter BVP1-, über 20 Linien mit gesteigerter BSP1-Expression und über ein Dutzend Doppeltransformanten identifiziert werden. In der T1-Generation waren unter normalen Wachstumsbedingungen keine phänotypischen Veränderungen gegenüber der Morphologie des Wildtyps zu erkennen. Derzeit läuft die Anzucht von T2-Pflanzen für eine detaillierte Untersuchung im Hinblick auf Wachstumsrate, Inhaltsstoffe und Salztoleranz.

## 4 Diskussion

Die wachsende Speicherwurzel der Zuckerrübe ist ein spezialisiertes Speicherorgan, das bis zu 21% Saccharose enthält. Aufgrund des atypischen sekundären Dickenwachstums der Beta-Rübe ist das Gewebe in der äußersten Peripherie meristematisch aktiv, während sich im Inneren das Speicherparenchym befindet. Damit bestehen wesentliche Unterschiede zur Kartoffelknolle, bei der es sich ontogenetisch um ein reines Sprossorgan handelt, dessen Wachstum auf diffusen Zellteilungen im Mark beruht und in dem die Assimilate in Form von Stärke gespeichert werden.

Für die Kartoffelknolle konnte gezeigt werden, dass die Spaltung der Saccharose, die über das Phloem angeliefert wird, nicht über Invertasen, sondern über SuSy und UGPase erfolgt. Die resultierenden Hexosephosphate bilden die Vorstufen für die Stärkesynthese in den Plastiden. Bei diesem Saccharoseabbauweg ist das Co-Substrat Pyrophosphat (PPi) und nicht ATP. Es wird vermutet, dass die hypoxischen Verhältnisse in der Kartoffelknolle, unter denen ATP limitierend ist, ein Grund dafür sind, dass die Saccharosespaltung nicht über den ATP-abhängigen Weg der Invertase verläuft (Geigenberger, 2003).

Auch in der Zuckerrübe ist die Expression der SuSy hoch (Hesse und Willmitzer, 1996), während die Invertase-Aktivität im unverwundeten Rübenkörper sehr niedrig ist (Giaquinta, 1979). Nach dem Modell von (Fieuw und Willenbrink, 1990) wird die Saccharose aus dem Phloem zunächst durch SuSy und UGPase in Hexosephosphate gewandelt, am Tonoplasten resynthetisiert und über einen H<sup>+</sup>-Antiport in die Vakuole transportiert. Der Aufbau des für den Transport notwendigen Protonengradienten könnte über die V-ATPase und/oder die V-PPase erfolgen. Letztere benötigt – ebenso wie die UGPase – PPi als Substrat.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse stand zu Beginn dieser Arbeit die Frage, ob auch im Speicherparenchym der Zuckerrübe hypoxische Bedingungen vorliegen und demzufolge die ATP-sparende V-PPase beim Aufbau der PMF am Tonoplasten eine besondere Rolle spielt. Die Tatsache, dass es nach Verwundung - und der damit verbundenen verbesserten Durchlüftung des Gewebes - zu einer Zunahme der V-ATPase-Transkripte und einer Abnahme der V-PPase-Transkripte kam (Schirmer, 1998), unterstützte diese Hypothese. In meristematisch aktiven Pflanzengeweben wird die V-PPase stark exprimiert. Als Grund dafür wird die Notwendigkeit einer effektiven Hydrolyse von PPi gesehen, um die zahlreichen

Biosyntheseprozesse voranzutreiben. Demzufolge sollte die Expression der V-PPase im äußersten Bereich, in dem sich das meristematisch aktive Gewebe der wachsenden Rübe befindet, besonders hoch sein. Im Hinblick auf eine biotechnologische Anwendung könnte sich die Überexpression einer V-PPase sowohl positiv auf den Saccharose-Transport in die Vakuolen des Speicherparenchyms als auch die Syntheseleistungen im Meristembereich auswirken und damit zu einer Ertragssteigerung führen.

Lösliche Pyrophosphatasen (S-PPasen) gelten bei Pflanzen aufgrund von Aktivitätsmessungen auf die Plastiden beschränkt (Weiner et al., 1987). Allerdings deuten immunocytologische Untersuchungen auf eine cytosolische Lokalisierung dieser Enzyme hin (Rojas-Beltran et al., 1999). Aufgrund der vermuteten besonderen Bedeutung des cytosolischen PPi-Pools in der Zuckerrübe wurden im Rahmen dieser Arbeit neben den V-PPasen auch S-PPasen hinsichtlich Expression, subzellulärer Lokalisierung und Bedeutung für die Regulation des PPi-Metabolismus untersucht.

#### **4.1 In der Zuckerrübe herrschen hypoxische Verhältnisse**

Bei der Messung der O<sub>2</sub>-Konzentration in verschiedenen Schichten des Rübenkörpers stellte sich heraus, dass hier tatsächlich hypoxische Verhältnisse herrschen, während im Blattstiel die O<sub>2</sub>-Konzentration durchschnittlich 20,3% beträgt. Bereits 5 mm unterhalb von der Rübenoberfläche liegt die O<sub>2</sub>-Konzentration bei 12,7%, was auf diffusionshemmende Eigenschaften der cutinisierten Rindenzellen schließen lässt. Noch extremere Sauerstoffgradienten wurden an jungen Samen von *Vicia faba* gemessen: Hier sinkt die O<sub>2</sub>-Konzentration von 21% in der Atmosphäre auf unter 1% direkt unterhalb der Samenhülle ab, welche eine Dicke von weniger als 1 mm aufweist (Rolletscheck et al., 2002). In der Zuckerrübe fällt der Sauerstoffgehalt mit wachsendem Abstand von der Oberfläche ab und liegt schon in einer Tiefe von 2,5 cm bei nur noch 3,4%. Die gemessenen Werte sind vergleichbar mit denen, die für Kartoffelknollen ermittelt wurden: 12% direkt unter dem Periderm und 5% in einer Tiefe von 2 cm (Geigenberger et al., 2000). Möglicherweise sind die geringen Sauerstoffpartialdrücke ein Grund dafür, dass die Phloementladung in Rüben wie Kartoffeln über den ATP-sparenden SuSy-Stoffwechselweg (Hesse und Willmitzer, 1996) und nicht durch Invertasen erfolgt (Abb. 2-2); Transkripte und Aktivitäten der Invertasen sind in Rüben nur bis zu einem Alter von 6 Wochen nachweisbar (Rosenkranz, unveröffentlichte Ergebnisse; Giaquinta, 1979).



## 4.2 Vakuoläre H<sup>+</sup>-Pyrophosphatasen in *Beta vulgaris*

Nach dem Nachweis eines Sauerstoffgradienten in der wachsenden Rübe wurde in Northernblot-Studien untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Sauerstoffkonzentration und der Expression von V-PPase und V-ATPase existiert. Des Weiteren wurden die Transkriptspiegel der beiden V-PPase-Isoformen während der gesamten Entwicklung in Rüben und Blättern untersucht.

### 4.2.1 Die Expression der V-PPase erfolgt in Abhängigkeit von Gewebe und Entwicklungsstadium

Die Expression der beiden V-PPase Isoformen, BVP1 und BVP2, erfolgt in koordinierter Art und Weise. In keinem der untersuchten Gewebe wurde die spezifische Expression nur einer Isoform festgestellt. Die Transkriptspiegel waren vor allem in jungen, schnell wachsenden Geweben hoch. So fanden sich die höchsten mRNA-Niveaus in jungen Blättern und Rüben (Abb. 3-3), doch auch in jungen Wurzeln, *hairy roots* oder Suspensionkulturzellen war die Expression gesteigert (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt frühere Berichte über die besondere Rolle der V-PPase im Zusammenhang mit dem Wachstum von Pflanzenzellen: Das Substrat PP<sub>i</sub> wird aufgrund der hohen metabolischen Aktivität in diesen Geweben in großer Menge gebildet und muss infolgedessen hydrolysiert werden, um die zahlreichen Biosyntheseprozesse nicht zu hemmen. Der Aufbau des H<sup>+</sup>-Gradienten am Tonoplasten ermöglicht gleichzeitig die Akkumulation von osmotisch wirksamen Substanzen in der Vakuole, die eine wichtige strukturelle Voraussetzung für das Streckungswachstum der Zellen darstellt (Nakanishi und Maeshima, 1998). Es ist auffällig, dass die Expression der V-PPasen in jungen Blättern am Ende der Vegetationsperiode geringer ist als zu Beginn. Es wäre daher von Interesse zu untersuchen, ob auch die Wachstumsrate der Blätter im Herbst niedriger ist als im Frühjahr.

In alten Blättern und reifen Rüben, in denen die mitotische Aktivität niedrig und das Streckungswachstum der Zellen abgeschlossen ist, ist die Expression beider Isoformen zwar niedrig, erlischt aber nicht vollständig. Dies verdeutlicht, dass die V-PPase auch in ausdifferenzierten Geweben eine wichtige Rolle als Haushalts-Enzym spielt. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die V-PPase zwar ursprünglich als integraler Bestandteil der Vakuolenmembran – daher auch der Name – charakterisiert wurde (Rea und Sanders, 1987), inzwischen aber auch an der Plasmamembran (Ratajczak et al., 1999) und im Golgi-Apparat (Oberbeck et al., 1994) nachgewiesen wurde.

Die besondere Bedeutung der V-PPase in den Membranen des Golgi-Apparats wird durch die Identifizierung eines neuen Typ von V-PPasen betont, der offenbar nur hier lokalisiert ist: (Drozdowicz et al., 2000) zeigten durch heterologe Überexpression in Hefe, dass es sich bei dem mit AVP2 bezeichneten Protein aus *A. thaliana* (AF182813) tatsächlich um eine H<sup>+</sup>-translozierende V-PPase handelt, obwohl das Enzym nur 36% Sequenzidentität zu AVP1 (AY078953) aufweist, der bis dahin einzigen bekannten V-PPase Isoform aus *A. thaliana* (Sarafian et al., 1992). Außer der geringen Ähnlichkeit zu den bisher bekannten V-PPase-Sequenzen verschiedener Pflanzenarten, die untereinander über 80% Identität aufweisen, ist eine weitere Besonderheit von AVP2, dass der Protonentransport in Abwesenheit von K<sup>+</sup>-Ionen erfolgen kann. Inzwischen wurden z.B. aus *Arabidopsis thaliana* und dem Protisten *Plasmodium falciparum* weitere Orthologe dieser V-PPasen vom Typ II kloniert. Durch Reporterstudien konnte gezeigt werden, dass AVP2 praktisch ausschließlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Mitsuda et al., 2001). Zwar handelt es sich bei BVP1 und BVP2 um V-PPasen vom Typ I, doch ist keineswegs ausgeschlossen, dass auch V-PPasen dieses Typs in den Golgi-Membranen vorkommen. Untersuchungen an der V-ATPase zeigten, dass die Ansäuerung von Golgi-Vesikeln essentiell für deren korrekten Transport zur Vakuole ist (Matsuoka et al., 1997). Diese Ansäuerung erfolgt offenbar nicht durch V-ATPasen allein, sondern in Kombination mit V-PPasen (Mitsuda et al., 2001).

#### **4.2.2 Die Expression von V-PPase und V-ATPase in der Speicherwurzel ist unabhängig von der Sauerstoffkonzentration überall gleich hoch**

Unter Sauerstoffmangel werden ATP verbrauchende Enzyme funktionell häufig durch P<sub>Pi</sub> hydrolysierende Enzyme funktionell ersetzt (Stitt, 1998). So erfolgt z.B. in Wurzelhaarzellen aus Mais die Ansäuerung der Vakuole unter aeroben Bedingungen durch die V-ATPase, unter anaeroben hingegen durch die V-PPase (Brauer et al., 1997).

Im Hinblick auf die Expression von V-PPase oder V-ATPase innerhalb der Zuckerrübe konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Sauerstoffkonzentration und der Expression beobachtet werden: Obwohl die O<sub>2</sub>-Spiegel von der Peripherie bis zum Zentrum steil absinken, sind die Transkriptspiegel der V-PPase überall gleich (Abb. 3-4). Auch in der äußersten Schicht der Rübe, wo aufgrund der meristematischen Aktivität mit einer besonders hohen V-PPase-Expression zu rechnen war, waren die Transkriptspiegel nicht erhöht. Ein Grund dafür könnte allerdings sein, dass der Anteil des Meristems im Vergleich zum Speichergewebe in der 2 mm dicken Probe zu gering war.

Die V-ATPase wird trotz der hypoxischen Verhältnisse im gesamten Rübenkörper exprimiert, und zwar unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in allen Schichten gleich stark. Dies ist insofern überraschend, als es in Kartoffelknollen parallel zum Abfall der O<sub>2</sub>-Konzentration von der Peripherie zum Zentrum fast zu einer Halbierung der ATP-Konzentration und der zellulären Energieladung kommt (Geigenberger et al., 2000). Offenbar wird aber im Speicherparenchym der Zuckerrübe auch bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von weniger als 5% noch ausreichend ATP für die Energetisierung der Endomembranen synthetisiert. Im Einklang damit zeigen Messungen der ATP-Spiegel und der *energy charge*, dass es während der Entwicklung von Zuckerrüben sogar zu einem Anstieg beider Parameter kommt. Gleichzeitig sinkt der Proteingehalt pro g Trockengewicht auf weniger als die Hälfte, während das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht nur leicht ansteigt (Stein und Willenbrink, 1976). Dies verdeutlicht, dass die metabolische Aktivität in diesem Gewebe und damit der ATP-Bedarf für Syntheseleistungen im Lauf der Entwicklung sinkt. Es steht mehr ATP für Transportprozesse zur Verfügung, und die zelluläre Energieladung kann trotz geringer O<sub>2</sub>-Spiegel auf einem hohen Niveau gehalten werden.

Eine niedrigere Syntheserate bedeutet aber auch eine geringere PPi-Produktion. Dass die Energetisierung des Tonoplasten nicht exklusiv durch die V-PPase erfolgt, liegt also möglicherweise auch an der relativ geringen Verfügbarkeit des Substrats. Zwar liegen noch keine Daten über die PPi-Konzentration in der Zuckerrübe vor, doch ist anzunehmen, dass sie niedriger ist als z.B. in metabolisch sehr aktiven Geweben wie Blatt-, Spross- und Wurzelmeristemen oder auch Suspensionskulturzellen. Für wachsende Kartoffelknollen wurde eine Gesamt-PPi-Konzentration von 2-3 nmol pro g Frischgewicht gemessen (Geigenberger et al., 2000). Ein Volumenverhältnis der Vakuole zum Cytosol von 10:1 vorausgesetzt, entspricht dies einer cytosolischen PPi-Konzentration von etwa 20-30 µM, was zehnfach niedriger ist als der für Spinatblätter (200-300 µM) oder Grünalgen (193 µM) ermittelte Wert (Weiner et al., 1987; Takeshige und Tazawa, 1989).

#### **4.2.3 V-PPase und V-ATPase sind in der Speicherwurzel am Tonoplasten aktiv**

Nachdem auf Transkriptebeleg gezeigt werden konnte, dass sowohl V-ATPase als auch V-PPase in der Rübe exprimiert werden, sollte in einer angereicherten Tonoplastenfraktion aus gelagerten Rüben nachgewiesen werden, dass beide Protonenpumpen an der Vakuolenmembran lokalisiert und aktiv sind. Dies geschah zum einen durch Immunoblot-Analysen: Unter Verwendung eines Antikörpers gegen die V-PPase aus *Vigna radiata* wurde

nur eine Bande detektiert, mit Antikörpern gegen die V-ATPase ließen sich die Untereinheiten A, B, C, D/E und c nachweisen. Bemerkenswerterweise sind die Laufstrecken der V-PPase und der V-ATPase-Untereinheit A in der SDS-PAGE identisch (Abb. 3-5), obwohl sie - entsprechend den cDNA-Sequenzen - unterschiedliche relative Massen von 80 kDa und 68,5 kDa haben (Kim et al., 1994; Lehr et al., 1999). Sarafian und Poole (1989) beschrieben, dass die aus Roter Rübe (ebenfalls *Beta vulgaris*) aufgereinigte V-PPase laut SDS-PAGE statt der erwarteten 80 kDa eine Größe von nur 67 kDa aufwies. Eine hohe elektrophoretische Mobilität im SDS-Gel wurde auch bei V-PPasen von anderen Arten beobachtet. So wurde z.B. bei *Vigna radiata* anhand des gereinigten Proteins nach SDS-PAGE eine Größe von 73 kDa bestimmt, was im Widerspruch zu der errechneten Größe von 80 kDa steht. Das ungewöhnliche Laufverhalten wird auf den hohen Anteil hydrophober Aminosäuren zurückgeführt, welcher eine überproportional starke Beladung mit SDS zur Folge hat (Nakanishi und Maeshima, 1998).

Neben den immunologischen Nachweisen wurden mit der angereicherten Tonoplastenfraktion auch Aktivitätsmessungen der beiden  $H^+$ -Pumpen durchgeführt. Bei der Bestimmung der Hydrolyseraten von ATP bzw.  $PP_i$  zeigte sich, dass die spezifische Aktivität der V-ATPase fast doppelt so hoch war wie die der V-PPase. Der für die V-PPase ermittelte Wert von  $17,3 \mu\text{mol } PP_i \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  steht im Einklang mit der spezifischen Aktivität von  $13,3 \mu\text{mol } PP_i \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , die an Tonoplasten aus frisch geernteten Roten Rüben gemessen wurde (Sarafian und Poole, 1989). Die Bestimmung der Protonenpumpaktivität durch Messung der Absorptionsabnahme von Acridinorange ergab, dass die spezifische Aktivität der V-ATPase 2,4mal so hoch war wie die der V-PPase. Die maximale Rate der Absorptionsabnahme war aber bei beiden Enzymen identisch, was darauf hinweist, dass sie in der Lage sind, vergleichbare Protonengradienten aufzubauen (Abb. 3-6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter hypoxischen Verhältnissen, wie sie in der Speicherrübe herrschen, die V-PPase die V-ATPase am Tonoplasten nicht ersetzt, sondern ergänzt. Die genaue physiologische Bedeutung der beiden Protonenpumpen im Speicherparenchym der Zuckerrübe ist noch nicht eindeutig bewiesen. Nach der vorherrschenden Meinung erfolgt die Akkumulation von Saccharose in der Vakuole durch einen  $H^+$ -Antiporter (Willenbrink et al., 1984; Briskin et al., 1985; Echeverria und Gonzalez, 2000). V-PPase und V-ATPase wären demnach für die Energetisierung des Tonoplasten verantwortlich. Dieses Modell beruht auf Saccharose-Kinetiken isolierter Tonoplastenvesikel. Ein Saccharose/ $H^+$ -Antiporter aus Pflanzen ist aber selbst nach der vollständigen Entschlüsselung der Genome von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* bis heute nicht kloniert worden. Sollte es möglich sein, die vakuoläre Saccharose-Akkumulation in transgenen Pflanzen – und hier speziell Zuckerrüben – durch Erhöhung der V-PPase-Aktivität zu steigern (s. 4.4), so wäre dies ein klares Indiz für die Richtigkeit der Antiport-Hypothese.

### 4.3 Lösliche PPasen in *Beta vulgaris*

Die Rolle löslicher Pyrophosphatasen (S-PPasen) in Pflanzen ist unklar. Insbesondere konnte die Frage nach der subzellulären Lokalisierung bisher nicht befriedigend beantwortet werden. In Plastiden von Spinatblättern wurde, verglichen mit dem Cytosol, eine hohe S-PPase-Aktivität und eine niedrige PPi-Konzentration gemessen (Weiner et al., 1987). Dies gilt als Voraussetzung für die Stärkesynthese, da die von der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysierte Reaktion  $\text{Glucose-1-Phosphat} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP-Glucose} + \text{PPi}$  *in vivo* nahe am Gleichgewicht liegt. Das entstehende PPi muss daher hydrolysiert werden, um die Bildung von ADP-Glucose, dem Substrat für die Stärkesynthase, zu begünstigen.

In Pflanzenzellen existieren mindestens drei Enzyme, die cytosolisches PPi als Energie- bzw. Phosphatdonor nutzen können. Daher vermutete man, dass die Hydrolyse von cytosolischem PPi durch V-PPase, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) und PPi-abhängiger Phosphofruktokinase (PFK) erfolgt (Stitt, 1998). Allerdings konnte an Petiolen von Kartoffelblättern mit Hilfe von Gold-markierten Antikörpern eindeutig eine cytosolische Lokalisierung von S-PPasen nachgewiesen werden (Rojas-Beltran et al., 1999). Auch das Fehlen typischer plastidärer Signalpeptide bei den meisten der bisher isolierten Sequenzen macht eine rein plastidäre Lokalisierung von S-PPasen unwahrscheinlich. Über S-PPasen in *Beta vulgaris* lagen bisher keinerlei Informationen vor.

#### **4.3.1 Das Genom von *Beta vulgaris* besitzt mindestens 4 verschiedene Gene für S-PPasen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei vollständige cDNA-Sequenzen (*BSP1-BSP3*) kloniert, deren abgeleitete Proteinsequenzen über 80% Identität sowohl untereinander als auch zu einer cytosolischen Pyrophosphatase aus *Solanum tuberosum* (Rojas-Beltran et al., 1999) aufweisen. Außerdem wurde mit *BSP4* eine weitere Vollängen-cDNA kloniert, deren abgeleitete Proteinsequenz zwar typische S-PPase-Motive enthält, aber nur 36-38% Sequenzidentität zu den drei übrigen Isoformen besitzt. In einer umfangreichen Datenbankrecherche, bei der potentielle S-PPase-Sequenzen aus Pflanzen, Pilzen, Tieren und Prokaryonten miteinander verglichen wurden, wurde geprüft, welche Rückschlüsse die Primärstruktur auf Funktion, subzelluläre Lokalisierung und Phylogenie erlaubt.

#### **4.3.2 Die cytosolischen S-PPasen der Pflanzen gleichen den prokaryontischen, die plastidären hingegen den S-PPase der Pilze und Tiere**

In der EMBL/SwissProt-Datenbank befinden sich zahlreiche Proteinsequenzen, die zumeist aufgrund von Ähnlichkeiten mit der von (Lahti et al., 1988) klonierten *E. coli*-Sequenz als lösliche Pyrophosphatasen annotiert wurden, wenngleich der Funktionsnachweis nur für die wenigsten erbracht ist. Durch Vergleich der Primärstrukturen wurde in zwei Studien übereinstimmend festgestellt, dass sich die S-PPasen aufgrund von Größe und Primärstruktur in zwei große Gruppen einteilen lassen (Rojas-Beltran et al., 1999; Sivula et al., 1999). Demnach stehen den etwa 200 Aminosäuren langen Proteinen von Pflanzen und Prokaryonten die fast 300 Aminosäuren langen Enzyme von Tieren und Pilzen gegenüber. Der Größenunterschied beruht zum einen darauf, dass die C-terminalen Bereiche der tierischen und pilzlichen S-PPasen länger sind. Zum anderen existieren zwei typische Insertionen in der Mitte dieser Proteine, die bei den pflanzlichen und bakteriellen S-PPasen fehlen (Sivula et al., 1999). Allerdings beschrieben Rojas-Beltran et al. (1999) einen partiellen EST-Klon aus Reis (D15382), dessen abgeleitete Proteinsequenz eine dieser Insertionen aufwies. Aufgrund dieser Befunde stellten sie die allgemein gefasste Hypothese auf, dass Pflanzen sowohl über S-PPasen vom ‚prokaryontischen‘ als auch vom ‚eukaryontischen‘ Typus verfügen.

Seit 1999 sind zahlreiche Sequenzen potentieller S-PPasen aus Pflanzen hinzugekommen. Dabei handelt es sich nicht immer um vollständige cDNA-Sequenzen, sondern meist um EST-Klone. Nach der Klonierung der 4 Vollängen-cDNAs aus *B. vulgaris* wurden die veröffentlichten Sequenzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer erneuten

vergleichenden Analyse unterzogen. Aufgrund überlappender Sequenzbereiche von EST-Klonen desselben Clusters konnten dabei auch Proteinsequenzen für S-PPasen abgeleitet werden, für die noch keine vollständigen cDNAs vorliegen.

Die Primärstrukturen von BSP1, BSP2 und BSP3 sind mit Längen von 222, 219 und 221 Aminosäuren sowie Sequenzidentitäten zwischen 82,4 und 85,5% einander sehr ähnlich (Tab. 3-1, Tab. 3-2). Die Proteinsequenz von BSP4 unterscheidet sich hingegen in mehrfacher Hinsicht: Sie ist mit 299 Aminosäuren erheblich länger und weist im Vergleich zu den anderen Isozymen weniger Sequenzidentität, eine längere N-terminale Domäne sowie zwei Insertionen auf, die aus 6 bzw. 14 Aminosäuren bestehen. Damit entspricht diese Isoform genau dem S-PPase-Typ, der bisher bei Tieren und Pilzen gefunden wurde, während die drei anderen eher prokaryontischen Sequenzen gleichen (Abb. 4-1).

Die Durchmusterung des vollständig entschlüsselten Genoms von *A. thaliana* führte zu einem vergleichbaren Ergebnis: Von den sechs annotierten S-PPasen ähneln sich fünf sehr stark in Länge (212-218 Aminosäuren) und Primärstruktur (83-91% Identität), während sich die sechste, auf Chromosom 5 kodierte Isoform (AJ252210) mit einer Länge von 300 Aminosäuren, einem geringeren Identitätsgrad, einer längeren N-terminalen Domäne sowie den beiden für Pilze und Tiere beschriebenen Insertionen deutlich abhebt. Das Computerprogramm *TargetP* identifizierte bei der stark abweichenden Arabidopsis-Isoform ein 66 Aminosäuren langes plastidäres Transitpeptid, während für die anderen fünf eine cytosolische Lokalisierung vorausgesagt wurde. Des Weiteren weisen die fünf ähnlichen Isoformen nur 38-41% Identität zu der sechsten auf, aber 86-90% zu einer Isoform aus *Solanum tuberosum*, für die die cytosolische Lokalisierung experimentell nachgewiesen wurde (Rojas-Beltran et al., 1999).

Diese Ergebnisse führen mich zu dem Schluss, dass es in Pflanzen sowohl plastidäre als auch cytosolische S-PPasen gibt und dass diese wegen der eben beschriebenen strukturellen Unterschiede aufgrund der Primärstruktur eindeutig identifizierbar sind. Die cytosolischen Isoformen entsprechen dem ‚prokaryontischen‘, die plastidären Enzyme dem ‚eukaryontischen‘ S-PPase-Typ. Vergleiche mit den Proteinsequenzen von potentiellen plastidären S-PPasen weiterer Pflanzenarten sprechen für die Richtigkeit dieser Annahme. Für *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* wurden in der Datenbank vier weitere vollständige Sequenzen identifiziert, die sich von allen anderen

bekannten pflanzlichen S-PPasen in folgenden Punkten unterscheiden: Hohes Molekulargewicht, langer N-terminaler Bereich mit plastidärem Transitpepid (ermittelt durch *TargetP*) und zwei Insertionen (s. Abb. 4-1). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass ein Anti-Hefe-PPase-Serum das plastidäre PPase-Isozym der Grünalge *Dunaliella salina* detektierte (Mortain-Bertrand et al., 1996). Diese Kreuzreaktion ist ein weiteres Indiz für die nahe Verwandtschaft pilzlicher und plastidärer Isoformen.

Das Sequenzmotiv der ersten Insertion ist bei den plastidären S-PPasen hoch konserviert: Bei den untersuchten Monokotylen lautet es TKKGNL, bei den Dikotylen TKKGKL. Die Sequenz der Dikotylen entspricht damit exakt dem Insertionsmotiv I der pilzlichen Sequenzen von *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris* und *S. pombe* und unterscheidet sich von den Orthologen aus *D. melanogaster*, *B. taurus* und *H. sapiens* jeweils nur an der ersten Position (xKKGKL). Von den 14 Aminosäuren der Insertion II sind bei den sechs plastidären S-PPasen sieben Reste vollständig konserviert (DPxxANxxVEGxxx). Bei den pilzlichen und tierischen Sequenzen finden sich hier grundsätzlich 13 Aminosäuren, von denen nur die ersten beiden sowie die letzte untereinander konserviert sind.

Wie die Datenbankrecherche und eigene Klonierungsarbeiten ergaben, existieren in *A. thaliana* mindestens fünf, in *O. sativa* vier, in *B. vulgaris* drei (s. 4.3.3) und in *S. tuberosum* zwei Isoformen für cytosolische S-PPasen. Zumindest für die Arten *O. sativa* und *A. thaliana*, deren Genom vollständig sequenziert ist, lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, dass für die plastidäre Isoform nur ein Gen vorhanden ist. Der geringe Verwandtschaftsgrad der beiden Arten lässt Rückschlüsse auf die Gesamtsituation bei höheren Pflanzen zu. Es ist demnach anzunehmen, dass die cytosolische S-PPase generell jeweils von einer Genfamilie kodiert wird, während für die plastidär lokalisierte Isoform offenbar nur ein Gen existiert.



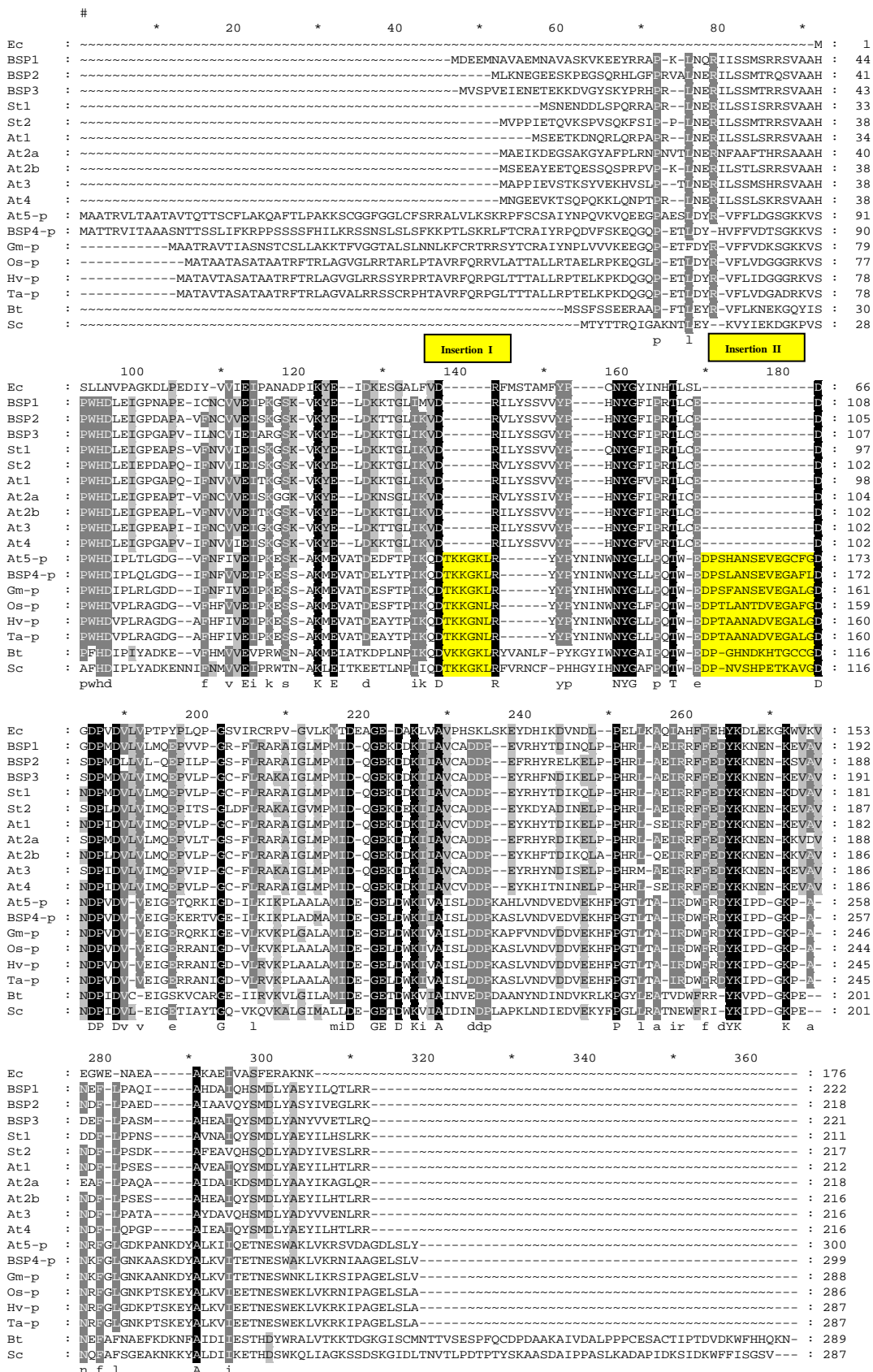


Abb. 4-1 Proteinsequenz-Alignment von S-PPasen aus *Beta vulgaris* (BSP), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum tuberosum* (St), *Glycine max* (Gm), *Oryza sativa* (Os), *Hordeum vulgare* (Hv), *Triticum aestivum* (Ta) sowie *Escherichia coli* (Ec), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) und *Bos taurus* (Bt). Die potentiellen plastidären S-PPasen sind mit dem Zusatz ‚-p‘ gekennzeichnet. Die Nummerierung der *A. thaliana*-Sequenzen erfolgte anhand der Chromosomen, auf denen die entsprechenden Gene kodiert sind.

In Tab. 4-1 sind die postulierten Unterschiede von cytosolischen und plastidären Isozymen pflanzlicher S-PPasen zusammengefasst.

	Plastidäre S-PPasen	Cytosolische S-PPasen
<b>Aminosäuren</b>	286-300	214-222
<b>Länge des Transitpeptids</b> (n Aminosäuren), ermittelt durch <i>TargetP</i>	<i>A. thaliana</i> : 66 <i>B. vulgaris</i> : 56 <i>G. max</i> : 54 <i>O. sativa</i> : 47	-
<b>Insertion I</b>	6 Aminosäuren: TKKG(K/N)L	-
<b>Insertion II</b>	14 Aminosäuren: DPxxANxxVEGxxx	-
<b>Anzahl der Isoformen</b>	1	2-5
<b>Größte Ähnlichkeit mit S-PPasen von</b>	Pilzen und Tieren	Prokaryonten

Tab. 4-1 Merkmale von cytosolisch und plastidär lokalisierten S-PPasen aus Pflanzen. Grundlage der Daten sind die Sequenzen, die im Alignment von Abb. 4-1 aufgeführt sind. Weitere Erläuterungen im Text.

Das Dendrogramm in Abb. 4-2 veranschaulicht noch einmal die mutmaßlichen Verwandtschaftsverhältnisse: Insbesondere sind die cytosolischen und plastidären Isoformen der verschiedenen Pflanzenarten einander jeweils ähnlicher als cytosolische und plastidäre Isoformen in derselben Art.

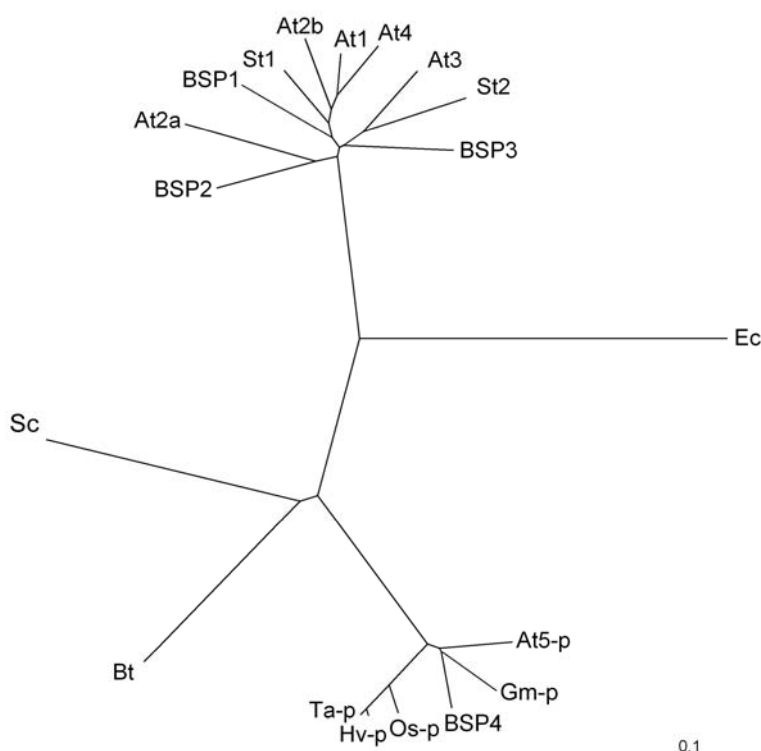


Abb. 4-2 Phylogenetischer Stammbaum löslicher Pyrophosphatasen, der auf dem Sequenzalignment in Abb. 4-1 basiert. Die Verwandtschaftsanalyse erfolgte bei den potentiellen plastidären Sequenzen ohne die durch *TargetP* ermittelten Transitpeptide. Die Bezeichnungen sind in der Legende zu Abb. 4-1 erklärt.

### 4.3.3 Die Lokalisierung von BSP1-BSP3 ist cytosolisch, die von BSP4 hingegen plastidär

Wie das Alignment in Abb. 4-1 zeigt, entsprechen die abgeleiteten Proteinsequenzen der aus Zuckerrübe klonierten S-PPase-Gene *BSP1-BSP3* in Länge und Primärstruktur dem prokaryontischen und damit - nach dem unter 4.3.2 postulierten Modell - dem cytosolischen PPase-Typ: Die Ähnlichkeit der drei Proteine zur PPase aus *E. coli* ist mit 41% größer als zu der aus *S. cerevisiae* (27%), die Insertionen I und II fehlen, und zu der nachgewiesenermaßen cytosolischen Isoform aus Kartoffel besteht 83-85% Sequenzidentität. Zudem wurde bei keinem der drei Isozyme aus *B. vulgaris* durch das Programm *TargetP* ein plastidäres Transitpeptid identifiziert. Demzufolge gruppieren sie im phylogenetischen Stammbaum mit den cytosolischen S-PPasen (Abb. 4-2).

Um das *in silico* gewonnene Ergebnis, nach dem es sich bei den 3 Proteinen aus *B. vulgaris* um cytosolische Isoformen handelt, zu verifizieren, wurden Reporterproteinstudien exemplarisch mit dem BSP1-Protein und dem plastidären Transitpeptid der  $\gamma$ -ECS aus *Brassica juncea* als Kontrolle durchgeführt. Nach Co-Bombardement von Suspensionskulturzellen der Zuckerrübe war das mit dem grün fluoreszierenden Protein in Volllänge fusionierte BSP1-Protein im Cytosol und im Bereich des Zellkerns lokalisiert, während in denselben Zellen das rot fluoreszierende Protein aufgrund der Fusion mit einem plastidären Transitpeptid in die Plastiden geleitet wurde (Abb. 3-13). Damit konnten für BSP1 die Voraussagen der Sequenzanalysen *in vivo* bestätigt werden.

Für BSP2 und BSP3 liegen noch keine Reporterproteinstudien vor. Allerdings deuten alle bisher erhobenen Daten darauf hin, dass es sich auch bei ihnen um cytosolische Proteine handelt. Der hohe Ähnlichkeitsgrad der drei Primärstrukturen mit ihren vergleichsweise kurzen N-terminalen Bereichen (vgl. Abb. 4-1) sowie die Tatsache, dass für Plastiden und Mitochondrien bisher nur N-terminale Transitpeptide gefunden wurden, machen es unwahrscheinlich, dass BSP2 und BSP3 eine andere subzelluläre Lokalisierung aufweisen als das BSP1-Protein, dessen cytosolische Lokalisierung hier mittels GFP-Fusion gezeigt werden konnte.

Dagegen handelt es sich bei BSP4 mit größter Wahrscheinlichkeit um die plastidäre Isoform: Durch das Programm *TargetP* wurde 56 Aminosäuren langes plastidäres Transitpeptid identifiziert. Wie das Alignment in Abb. 4-1 zeigt, weist die Primärstruktur außerdem die

beiden typischen Insertionen auf und gleicht den potentiellen Plastiden-Isozymen anderer Pflanzen, die laut *in silico*-Analyse ebenfalls über Transitpeptide verfügen, mit 84-90% Sequenzidentität<sup>4</sup> mehr als den Zuckerrübenproteinen BSP1-BSP3 (36-38% Sequenzidentität<sup>4</sup>). Des Weiteren ist die Ähnlichkeit zu den S-PPasen aus *B. taurus* und *S. cerevisiae* mit Sequenzidentitäten<sup>4</sup> von über 50% sehr groß. Dies alles wird auch durch das Dendrogramm in Abb. 4-2 veranschaulicht. Die Kenntnis der Volllängen-cDNA von BSP4 bietet nun die Möglichkeit, entweder die gesamte Sequenz oder nur die des potentiellen Transitpeptids vor ein Reportergen (*GFP*) zu klonieren. Durch Beschussexperimente ließe sich dann nachweisen, ob die hier aufgrund der Primärstruktur getroffene Vorhersage einer plastidären Lokalisierung zutreffend ist.

#### 4.3.4 BSP1 wird vor allem in jungen und heterotrophen Geweben exprimiert

Wie Northernblot-Analysen mit einer genspezifischen 3'-UTR-Sonde für BSP1 zeigten, sind die Transkriptspiegel in jungen wachsenden Geweben höher als in alten und in photosynthetisch inaktiven Zellen höher als in grünen. So fanden sich die stärksten Signale bei heterotroph wachsenden Suspensionskulturzellen sowie jungen Wurzeln und Speicherwurzeln. Die hohe Expression in bis zu 6 Wochen alten Rüben korreliert demnach zeitlich mit der Präspeicherphase, in der auch Invertasen stark exprimiert werden und noch keine Saccharose eingelagert wird (Giaquinta, 1979). Die Assimilate werden stattdessen vollständig zur Energiegewinnung und zur Makromolekülsynthese in den meristematisch aktiven Zellen verwendet. Während die Invertasen für die Bereitstellung der dafür benötigten Hexosen sorgen, verhindert die hohe Expression der cytosolischen S-PPasen die Akkumulation von P<sub>Pi</sub>, die sich inhibitorisch auf die Biosyntheseprozesse auswirken würde. In *Sink*-Blättern waren die Transkriptspiegel niedriger als in Wurzeln derselben Pflanze und in *Source*-Blättern praktisch nicht nachweisbar. Letzteres steht in Einklang mit den an Spinatblättern durchgeführten Messungen von Weiner et al. (1987), die keine cytosolische PPase-Aktivität nachweisen konnten.

Überraschenderweise ließen sich in einer Westernblot-Analyse mit einem gegen BSP1 gerichteten Antiserum Immunsignale sowohl in Speicherwurzeln als auch in Blättern von *B. vulgaris* sowie Blättern von *A. thaliana* detektieren: Während bei beiden *B. vulgaris*-

---

<sup>4</sup> Werte ermittelt für die prozessierten Proteine ohne Transitpeptid.

Geweben je zwei Banden im Bereich von 30 kDa zu sehen waren, war es bei *A. thaliana* nur eine. Bezogen auf die aufgetragene Gesamtproteinmenge waren die Signale in der Rübe stärker als im Blatt. Die bisherigen Daten lassen keinen Schluss zu, ob die BSP1-Antikörper nur die cytosolischen oder auch die plastidäre(n) Isoform(en) erkennen. Nicht zuletzt deswegen sollte das BSP4-Protein überexprimiert und daraufhin getestet werden, ob es mit den BSP1-Antikörpern kreuzreagiert. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die obere der beiden Banden tatsächlich BSP1 repräsentiert, da nach Transformation von *A. thaliana* mit der *BSP1*-Sequenz eine zusätzliche Bande der erwarteten Größe zu sehen war (Abb. 3-28).

Vergleichende Expressionsanalysen von pflanzlichen S-PPasen sind bisher kaum publiziert worden. In einer Immunoblot-Analyse an *S. tuberosum*, die mit einem Antikörper gegen eine homologe cytosolische S-PPase durchgeführt wurde, ließen sich in Blattstielen, Sprossen, Stolonen und Wurzeln je zwei Banden nachweisen, welche Proteinen von 28 und 29 kDa entsprachen (Rojas-Beltran et al., 1999). In der wachsenden Knolle war nur die Bande des 29 kDa-Proteins zu sehen. Dies ist ein erster Hinweis auf die gewebespezifische Expression von Isoformen, welche die Existenz von Genfamilien für cytosolische S-PPasen in Pflanzen erklären würde. In Blattspreiten von *Source*- und *Sink*-Blättern waren die Spiegel beider Proteine extrem niedrig. Letzteres bestätigt das Ergebnis der Northernblot-Analyse an Geweben der Zuckerrübe, bei der in Blättern kaum BSP1-Transkript erkennbar war.

Nimmt man alle bisher gefundenen Ergebnisse zusammen, so ist folgendes Szenario denkbar: BSP1 und möglicherweise weitere Isoformen cytosolischer S-PPasen werden – wie auch die beiden untersuchten Isoformen der V-PPase – vor allem in schnell wachsenden Geweben exprimiert, um das bei den Biosyntheseprozessen anfallende PPi effizient zu beseitigen. In differenzierten Geweben sinkt die metabolische Aktivität und infolgedessen die PPi-Synthese, was zur Erniedrigung der Transkriptspiegel der cytosolischen S-PPasen führt. Möglicherweise erfolgt der Abbau der Proteine nur langsam und es kommt stattdessen zu einer Inaktivierung durch posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung (vgl. 4.3.5.4). Dies würde erklären, warum sich in Blättern zwar Immunsignale, aber keine enzymatische Aktivität (Weiner et al., 1987) nachweisen lassen. Um diese Hypothese zu überprüfen, ist es nötig, mit Hilfe von Markerenzymen die Aktivität cytosolischer S-PPasen im Laufe der Entwicklung von *B. vulgaris* zu messen und mit den Expressionsdaten zu vergleichen.

#### 4.3.5 Erste biochemische Charakterisierung rekombinanter S-PPasen aus Pflanzen

Die S-PPasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* sind einschließlich der Kristallstrukturen biochemisch und biophysikalisch sehr gut charakterisiert worden. Für die pflanzlichen Orthologe liegen hingegen vergleichsweise wenig Daten vor. Alle biochemischen Charakterisierungen wurden an Proteinen durchgeführt, die aus Rohextrakten oder angereicherten Plastidenfraktionen über DEAE- und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt worden waren. Daraus ergeben sich zwei Probleme: Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den aufgereinigten Fraktionen noch Spuren anderer Proteine oder Substanzen befinden, die die Aktivität der S-PPasen beeinflussen. Zum anderen ist es nicht möglich, eindeutig zu bestimmen, ob die gemessene PPase-Aktivität von cytosolischen oder plastidären Isoformen stammt, die – wie oben gezeigt – strukturell stark divergieren und daher möglicherweise auch unterschiedliche Eigenschaften haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei cytosolische S-PPasen aus *B. vulgaris*, BSP1 und BSP2, in *E. coli* überexprimiert und über *His-Tag*-vermittelte Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Nachdem für beide Isozyme der Funktionsnachweis erbracht worden war, wurden die biochemischen Eigenschaften im Detail untersucht.

##### 4.3.5.1 BSP1 und BSP2 haben die für S-PPasen typischen Temperatur- und pH-Optima

Das pH-Optimum von BSP1 und BSP2 liegt bei 8,0 bzw. 7,5 (Abb. 3-19). Werte im leicht alkalischen Bereich sind für S-PPasen typisch – offenbar unabhängig von der subzellulären Lokalisierung: Isoformen aus *Zea mays*, *Sesamum indicum*, *Saccharum officinarum*, *Capsicum annuum*, *Hevea brasiliensis*, *Typha latifolia*, der Grünalge *Dunaliella salina* sowie der Blaualge *Spirulina maxima*, haben pH-Optima von 7,7-8,6 (Hara et al., 1980; Ho, 1984; Jacob et al., 1989; Gama Brandao und Aoyama, 1992; Mortain-Bertrand et al., 1992; Pwee und Ho, 1995; Mortain-Bertrand et al., 1996; Hemalatha und Prasad, 2002). Übereinstimmend damit wurde für das *E. coli*-Enzym ein pH-Optimum von 8,2 ermittelt, während es beim Ortholog aus *S. cerevisiae* bei pH 7,0 liegt (Cooperman et al., 1992). Interessanterweise weist BSP2 im neutralen bis leicht sauren pH-Bereich, der für das Cytosol relevant ist, eine erheblich höhere Aktivität auf als BSP1 (Abb. 3-19).

Bei der Bestimmung der Temperaturoptima – 53 °C für BSP1 und 58 °C für BSP2 – zeigte sich, dass beide Isoformen eine hohe Thermostabilität aufweisen (Abb. 2-20). Ähnlich hohe Temperaturoptima wurden bei S-PPasen aus Mais (>47 °C) und Sesam (50 °C) gemessen (Gama Brandao und Aoyama, 1992; Hemalatha und Prasad, 2002). Die Tatsache, dass auch aus dem Archaeobakterium *Sulfolobus acidocaldarius* eine S-PPase mit einem Temperaturoptimum von 75 °C kloniert wurde (Meyer et al., 1995), legt nahe, dass diese Proteingruppe phylogenetisch sehr alt ist. Die hohe Thermostabilität der S-PPasen bildete sich vermutlich vor langer Zeit unter klimatischen Bedingungen aus, die sich deutlich von den heute herrschenden Temperaturverhältnissen unterschieden.

#### **4.3.5.2 Mg<sup>2+</sup> spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität, Aktivität, und Oligomerisierung**

Bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine über Nickel-Affinitätschromatographie war ohne Mg<sup>2+</sup> in den Wasch- und Elutionspuffern keine Pyrophosphataseaktivität in den Elutionsfraktionen nachweisbar. Die Lagerung in magnesiumfreiem Puffer führte zum Aktivitätsverlust und Ausfällen der Proteine. Diese Instabilität ist auch für andere pflanzliche S-PPasen beschrieben. So kam es z.B. bei der chromatographischen Aufreinigung einer S-PPase aus Pollen von *Typha latifolia* in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> zum Aktivitätsverlust (Hara et al., 1980), und die Aufbewahrung von S-PPasen aus *Saccharum officinarum* hatte in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> zu erfolgen, um Aktivitätsverluste zu minimieren (Pwee und Ho, 1995). Diese Befunde sprechen dafür, dass pflanzliche S-PPasen ein regulatorisches Bindungszentrum für Mg<sup>2+</sup>-Ionen besitzen, deren Besetzung einen stabilisierenden Einfluss auf die Proteine hat.

Bei der S-PPase aus *E. coli* handelt es sich um ein Homohexamer (genauer gesagt um ein Dimer zweier Trimere) aus Untereinheiten von 20 kDa, bei der aus *S. cerevisiae* hingegen um ein Homodimer aus 32 kDa-Untereinheiten. Röntgenstrukturuntersuchungen an beiden Enzymen haben übereinstimmend gezeigt, dass pro Monomer insgesamt 4 Mg<sup>2+</sup>-Bindestellen (M1-4) existieren. M3 und M4 befinden sich - wie die beiden Bindestellen für PPi - innerhalb des katalytischen Zentrums. M1 und M2 liegen außerhalb des katalytischen Zentrums und binden Mg<sup>2+</sup> mit niedriger bzw. hoher Affinität: Das *E. coli*-Enzym weist bei pH 7,5 für M1 ein K<sub>d</sub> von 50 µM und für M2 ein K<sub>d</sub> von 1,4 mM auf (Avaeva et al., 2000). Hexamere, die Mg<sup>2+</sup>-Ionen gebunden haben, sind enger miteinander assoziiert als solche, die keine gebunden haben, da Mg<sup>2+</sup>-Ionen an den Kontaktstellen der Untereinheiten die Stabilität der

Hexamerform vermitteln (Kankare et al., 1996). Auch andere Oligomerisierungszustände zeigen PPase-Aktivität, doch sinkt diese in der Reihenfolge Hexamer, Trimer, Dimer und Monomer. Das Monomer ist zudem instabil (Vainonen Iu et al., 2002).

Durch die FPLC-Analyse des BSP2-Proteins aus der Zuckerrübe wurde zum ersten Mal gezeigt, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen auch bei pflanzlichen S-PPasen zur Oligomerisierung führen (Abb. 3-23). Wenngleich die diesbezüglich erhobenen Daten vorläufig sind und der vorherrschende Oligomerisierungsgrad (Trimer oder größer) noch nicht bekannt ist, so stehen sie im Hinblick auf die stabilisierende Wirkung von  $Mg^{2+}$  im Einklang mit den Ergebnissen, die für die *E. coli*-PPase gefunden wurden.

Die PPase-Aktivität von BSP1 und BSP2 ist  $Mg^{2+}$ -abhängig. Bei der Bestimmung der BSP2-Kinetik in Abhängigkeit von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration in Gegenwart von 1 mM PPI zeigte sich, dass der Kurvenverlauf sigmoidal ist (Abb. 3-22). Messungen an einer cytosolischen S-PPase aus Mais (Gama Brandao und Aoyama, 1992) sowie plastidären Isoformen aus *Dunaliella salina* (Mortain-Bertrand et al., 1996) und *Capsicum annuum* (Mortain-Bertrand et al., 1992), die mit vergleichbaren PPI-Konzentrationen (1-2 mM) durchgeführt wurden, zeigten einen ähnlichen Aktivitätsverlauf mit Hill-Koeffizienten zwischen 2 und 3. Der sigmoidale Kurvenverlauf der BSP2-Kinetik mit einem Hill-Koeffizienten von 2,9 weist auf einen kooperativen Effekt mehrerer Untereinheiten hin. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Enzyme, die metallische Kationen als Kofaktoren benötigen, Allosterie-ähnliches Verhalten auch ohne Interaktion von mehreren Untereinheiten zeigen können (London und Steck, 1969). So könnten beispielsweise - durch Bindung an einer Stelle außerhalb des katalytischen Zentrums -  $Mg^{2+}$ -Ionen aktivierend oder freies PPI hemmend wirken und so zu dem sigmoidalen Aktivitätsverlauf beitragen. Allerdings wurde eine regulatorische Bindungsstelle für freies PPI bei den Röntgenstrukturuntersuchungen der S-PPasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae* nicht identifiziert. Dagegen zeigen die Quartärstrukturen dieser Proteine, dass es sich tatsächlich um Oligomere handelt. Die mit BSP2 durchgeführte FPLC-Analyse, nach der  $Mg^{2+}$  eine Oligomerisierung des Proteins induziert, spricht dafür, dass die sigmoidalen Aktivitätskurven pflanzlicher S-PPasen ebenfalls durch Kooperativität bedingt sind.

Nach (Lambert und Watters, 1957) bilden  $Mg^{2+}$  und PPI in wässriger Lösung 3 Komplexe:  $MgP_2O_7^{2-}$ ,  $Mg_2P_2O_7$  und  $MgHP_2O_7^-$ , wobei letzteres bei einem pH-Wert von 8,0 zu



vernachlässigen ist. Die Aktivität von BSP2 stieg in Gegenwart von 1 mM PPI bis zu einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 2,5 mM an und veränderte sich dann praktisch nicht mehr (Abb. 3-22). Auch bei S-PPasen aus *Zea mays*, *Sesamum indicum*, *Capsicum annuum* und *Hevea brasiliensis* wurden bei vergleichbaren PPI-Konzentrationen (1-2,5 mM) maximale Aktivitäten bei einem  $Mg^{2+}$ /PPI-Verhältnis von über 2 gemessen, was als Indiz dafür gilt, dass  $Mg_2P_2O_7$  und nicht  $MgP_2O_7^{2-}$  das eigentliche Substrat darstellt (Jacob et al., 1989; Gama Brandao und Aoyama, 1992; Mortain-Bertrand et al., 1992; Hemalatha und Prasad, 2002).

#### 4.3.5.3 $Ca^{2+}$ hemmt S-PPasen aus *B. vulgaris*

Für die Aktivität aller Pyrophosphatasen sind zweiwertige Kationen essentiell. Während einige bakterielle S-PPasen  $Mn^{2+}$  benötigen (Avaeva et al., 2000; Rajagopal et al., 2003), war bei den bisher untersuchten pflanzlichen S-PPasen die Aktivität in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  am höchsten. Auch die beiden rekombinanten S-PPasen aus der Zuckerrübe zeigten bei einer PPI-Konzentration von 1 mM in Gegenwart von 2,5 mM  $MgCl_2$  die höchste Aktivität (100%). Wurde stattdessen  $MnCl_2$  in gleicher Konzentration eingesetzt, betrug die Aktivität 25% (BSP1) bzw. 44% (BSP2), mit 2,5 mM  $CoCl_2$  jeweils etwa 20%. Letzteres steht im Einklang mit dem Wert von 16%, der für eine cytosolische Isoform aus *Hevea brasiliensis* ermittelt wurde (Jacob et al., 1989). Hingegen war mit  $CaSO_4$  und  $CuCl_2$  keine Pyrophosphataseaktivität messbar (Abb. 3-17).

Die vergleichsweise hohen Aktivitäten mit  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  stehen im Einklang mit den Messungen bei S-PPasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae* (Cooperman et al., 1992), aber im Widerspruch zu zahlreichen Berichten über pflanzliche S-PPasen, nach denen  $Mg^{2+}$  durch keines der getesteten zweiwertigen Ionen ersetzt werden kann. Für S-PPasen aus *Typha latifolia*, *Hevea brasiliensis*, *Solanum tuberosum*, *Saccharum officinarium* und *Sesamum indicum* wurde zudem gezeigt, dass die  $Mg^{2+}$ -abhängige Pyrophosphataseaktivität mit steigender Konzentration von  $Co^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  stark absank (Hara et al., 1980; Jacob et al., 1989; du Jardin et al., 1995; Pwee und Ho, 1995; Hemalatha und Prasad, 2002). Daher muss in einem Wiederholungsexperiment mit variablen Konzentrationen geprüft werden, ob sich die S-PPasen der Zuckerrübe in der Sensitivität gegenüber  $Co^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  tatsächlich von den anderen pflanzlichen Orthologen unterscheiden.

Der inhibitorische Effekt von  $Ca^{2+}$  auf die Aktivität von BSP1 und BSP2 wurde in Messungen mit unterschiedlichen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Gegenwart von 2,5 mM  $Mg^{2+}$  genauer

untersucht: 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  bewirkte einen Aktivitätsverlust von 55-62%, mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  war praktisch keine Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 3-18). Die gemessenen Werte sind nahezu identisch mit denen, die unter vergleichbaren Bedingungen für eine cytosolische S-PPase-Isoform aus Kartoffel erhoben wurden (du Jardin et al., 1995). Auch für S-PPasen aus *Sesamum indicum* (Hemalatha und Prasad, 2002), *Saccharum officinarum* (Pwee und Ho, 1995) und *Hevea brasiliensis* (Jacob et al., 1989) ist der inhibitorische Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beschrieben worden. Vom Mechanismus her könnten  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  um das katalytische Zentrum und/oder regulatorische Bindestellen konkurrieren, aber auch eine eigene regulatorische Bindestelle für  $\text{Ca}^{2+}$  wäre möglich: Röntgenstrukturdaten an der bakteriellen S-PPase mit komplexiertem  $\text{Ca}^{2+}$  bewiesen, dass  $\text{Mg}^{2+}$  an der M2-Bindestelle durch  $\text{Ca}^{2+}$  verdrängt wird. Die resultierende Konformationsänderung ist dafür verantwortlich, dass ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf PPi nicht mehr aktiviert werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass das nicht hydrolysierbare CaPPi mit MgPPi um die katalytische M3-Bindungstelle konkurriert (Avaeva, 2000).

Dass die *in vitro* beobachtete Hemmung durch  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* eine regulatorische Funktion hat, ist eher unwahrscheinlich. Während die cytosolische  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration bei 2 mM liegt, beträgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration normalerweise 0,1  $\mu\text{M}$ , kann aber unter bestimmten Bedingungen auf bis zu 10  $\mu\text{M}$  ansteigen. Selbst unter diesen extremen Bedingungen wäre der inhibitorische Effekt nach den *in vitro* ermittelten Messwerten gering.

#### 4.3.5.4 Post-translationelle Regulation

Obwohl in Northernblot-Analysen kaum S-PPase-Transkripte nachweisbar waren, ließen sich im Immunoblot Proteine der erwarteten Größe detektieren. Dies könnte bedeuten, dass das Turnover pflanzlicher S-PPasen relativ gering ist und sie einer post-translationellen Regulation durch kovalente Modifikationen unterliegen. Um zu untersuchen, ob die vom Redoxzustand abhängige Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken einen Regulationsmechanismus darstellt, wurden die rekombinanten cytosolischen S-PPasen BSP1 und BSP2 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da die Laufstrecken identisch waren, scheint eine Regulation durch Dithiolbildung unwahrscheinlich (Abb. 3-24). Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen gestützt: Einerseits befindet sich unter den 17 Aminosäuren, die bei sämtlichen S-PPasen aus allen taxonomischen Gruppen gefunden wurden, kein einziges Cystein (Sivula et al., 1999). Andererseits wird die Aktivität einer cytosolischen S-PPase aus

Maisembryos durch Sulphydryl-Reagenzien wie NEM oder DTNB kaum beeinflusst (Gama Brandao und Aoyama, 1992). Demzufolge sind SH-Gruppen nicht in den Reaktionsmechanismus involviert.

Es gibt aber sowohl für bakterielle als auch für pflanzliche S-PPasen Hinweise darauf, dass Phosphorylierung durch Proteinkinasen stattfindet und dass diese zur Inaktivierung führt. So wird die Mangan-abhängige S-PPase aus *Streptococcus agalactiae* durch eine Serin/Threoninkinase phosphoryliert (Rajagopal et al., 2003). An Pollenschläuchen von *Papaver rhoeas* konnte gezeigt werden, dass es während der Selbstinkompatibilitätsreaktion, welche die Befruchtung von Eizellen durch Pollen derselben Pflanze verhindert, zur Phosphorylierung einer 26 kDa großen S-PPase durch eine calciumabhängige Proteinkinase kommt. Es wird spekuliert, ob der resultierende Verlust der Pyrophosphataseaktivität dazu führt, dass die zahlreichen Biosyntheseprozesse im schnell wachsenden Pollenschlauch durch PPi gehemmt werden und es so zum Stopp des Pollenschlauchwachstums kommt (Rudd und Franklin-Tong, 2003).

#### **4.3.5.5 Die Affinität von BSP1 und BSP2 zu Pyrophosphat ist niedriger als die von pflanzlichen V-PPasen sowie von S-PPasen aus Bakterien und Pilzen**

Die Aktivitätskurven von BSP1 und BSP2 zeigen bei steigender PPi-Konzentration den für einfache Michaelis-Menten-Kinetiken typischen hyperbolischen Verlauf. Die in Gegenwart von 2,5 mM  $Mg^{2+}$  ermittelten  $K_m$ -Werte für PPi, die mit Hilfe von Eadie-Hofstee-Diagrammen bestimmt wurden, betragen 51  $\mu M$  für BSP1 und 53  $\mu M$  für BSP2 (Abb. 3-21). Die S-PPasen aus *E. coli* und *S. cerevisiae* besitzen eine erheblich höhere Affinität zu PPi; so liegt der  $K_m$ -Wert für das *E. coli*-Enzym bei 3,5  $\mu M$  (Baykov et al., 1990) und für das Hefe-Enzym bei 1,5  $\mu M$  PPi (Salminen et al., 2002). Die  $K_m$ -Werte, die für S-PPasen anderer Pflanzenarten bestimmt wurden, liegen um mehr als Faktor 100 auseinander: Während (Simmons und Butler, 1969) für eine S-PPase aus Maisblättern einen Wert von 5,6  $\mu M$  bestimmten, sollen S-PPasen aus Zuckerrohrblättern oder Sesamkotyledonen  $K_m$ -Werte von 750 bzw. 767  $\mu M$  besitzen (Bucke, 1970; Hemalatha und Prasad, 2002). Wenngleich verschiedene Bedingungen bei der Extraktion oder beim Pyrophosphatase-Assay zu gewissen Unterschieden führen können, erscheinen die zuletzt genannten Werte doch sehr hoch, zumal bei einer späteren Untersuchung an Zuckerrohrblättern zwei S-PPasen mit  $K_m$ -Werten von 57  $\mu M$  und 72  $\mu M$  isoliert wurden (Pwee und Ho, 1995). Letztere stehen in Einklang mit den hier erstmals anhand von rekombinanten Proteinen ermittelten  $K_m$ -Werten von 51 und 53  $\mu M$

für BSP1 und BSP2. Auch für einige andere cytosolische S-PPasen aus Pflanzen wurden Km-Werte in diesem Bereich gemessen, während die plastidären Isoformen generell eine höhere Affinität zu PPi aufzuweisen scheinen: So stellten (Klemme und Jacobi, 1974) nach der Aufreinigung zweier S-PPasen aus Spinatblättern fest, dass der Km-Wert der cytosolischen Isoform 70  $\mu\text{M}$ , der der chloroplastidären hingegen 10  $\mu\text{M}$  betrug. Der Km-Wert einer S-PPase aus Chromoplasten der Paprika lag ebenfalls bei 10  $\mu\text{M}$  (Mortain-Bertrand et al., 1992), und auch die Affinität einer chloroplastidären Isoform aus Maisblättern war mit einem Km-Wert von 5,6  $\mu\text{M}$  deutlich höher als die einer cytosolischen Isoform aus Maisembryos mit einem Km-Wert von 47  $\mu\text{M}$  (Simmons und Butler, 1969; Gama Brandao und Aoyama, 1992). Um zu überprüfen, ob die hier aufgestellte Hypothese der höheren Affinität plastidärer Isoformen Allgemeingültigkeit hat, müsste die vermeintlich plastidären Isoform BSP4 ebenfalls in *E. coli* überexprimiert, der Km-Wert für PPi bestimmt und mit dem der cytosolischen Proteine BSP1 und BSP2 verglichen werden.

Bemerkenswerterweise haben andere pflanzliche Enzyme, die ebenfalls aus dem PPi-Pool des Cytosols schöpfen, eine höhere Affinität zu PPi als die cytosolischen S-PPasen: Die strukturell völlig verschiedenen V-PPasen haben Km-Werte von 2-5  $\mu\text{M}$  (Maeshima, 2000), und für die PPi-abhängige Phosphofruktokinase (PFK) von *Ricinus communis*, *Triticum aestivum* und *Solanum tuberosum* wurden Km-Werte um 10  $\mu\text{M}$  bestimmt (Kombrink et al., 1984; Yan und Tao, 1984; Rowntree und Kruger, 1992).

#### 4.3.6 Bedeutung der S-PPasen für die Regulation des cytosolischen PPi-Spiegels

Anorganisches Pyrophosphat (PPi) ist in pflanzlichen Zellen ein außergewöhnlicher Metabolit: Einerseits ist es ein inhibitorisches Nebenprodukt, das neben AMP bei zahlreichen Biosyntheseprozessen anfällt und dessen Hydrolyse eine thermodynamische Notwendigkeit dafür darstellt, dass die Reaktionen in Richtung Synthese ablaufen können. Andererseits stellt es – anders als in den meisten anderen biologischen Systemen – ein energiereiches Substrat dar, das von den drei Enzymen V-PPase, UGPase und PFK genutzt wird. Aus diesem Grunde muss der cytosolische PPi-Spiegel vor allem in wachsenden Geweben mit sich rasch teilenden Zellen, in denen es aufgrund von hoher und wechselhafter metabolischer Aktivität zu großen Schwankungen kommen kann, genau reguliert werden. In nicht-pflanzlichen Zellen wird PPi durch lösliche PPasen (S-PPasen) gespalten. Nach der Meinung zahlreicher Autoren ist aber in Pflanzenzellen die S-PPase-Aktivität auf die Plastiden beschränkt (Ferne et al., 2002), so dass die Hydrolyse von cytosolischem PPi durch andere Enzyme wie die V-PPase erfolgen

müsste. Nach den hier an *B. vulgaris* durchgeführten Untersuchungen lässt sich diese Hypothese nicht aufrechterhalten: Von den 4 klonierten S-PPasen sind drei im Cytosol lokalisiert, wie anhand von Reporterstudien (Abb. 3-13) und *in silico*-Analysen der Proteinsequenzen gezeigt werden konnte. Lediglich für die vierte Isoform ist eine plastidäre Lokalisierung aufgrund von Vergleichen mit S-PPasen anderer Arten und der Identifizierung eines Transitpeptids *in silico* wahrscheinlich.

Zahlreiche Aspekte sprechen dafür, dass gerade die S-PPasen für die Aufrechterhaltung des PPi-Fließgleichgewichts im Cytosol verantwortlich sind: Die V-PPase ist ein Membranprotein von 80 kDa mit zahlreichen Domänen, die ausschließlich der Verankerung in der Membran dienen. Der Prozess von der Proteinsynthese über den vesikulären Transport bis zum Einbau in die Endomembranen ist daher energetisch aufwendig und dauert lange. Zudem ist die Aktivität der V-PPase an Transportprozesse gekoppelt und kann – da die verfügbare Membranoberfläche begrenzt ist – nicht durch Erhöhung der Proteinmenge beliebig gesteigert werden. Bei den S-PPasen handelt es sich hingegen um lösliche, verhältnismäßig kleine Proteine mit einer Monomergröße von ca. 20 kDa, die bei Bedarf schnell synthetisiert werden können. Außerdem sind sie in der Lage, PPi direkt am Ort der Entstehung zu hydrolysieren und damit zu verhindern, dass PPi lokal akkumuliert und zur Hemmung von Biosynthesen führt. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, mit dem *yeast-two-hybrid*-System zu untersuchen, ob es zu einer direkten räumlichen Interaktion zwischen S-PPasen und PPi-bildenden Enzymen - wie beispielsweise Aminoacyl-tRNA-Synthetasen - kommt. Eine weitere zu untersuchende Frage lautet, ob S-PPasen die Kernhülle passieren, um das bei der Synthese von RNA und DNA im Kern entstehende PPi direkt zu beseitigen. Schließlich ist der verglichen mit der V-PPase 10mal höhere  $K_m$ -Wert ein Hinweis darauf, dass es sich bei den cytosolischen S-PPasen um regulatorisch relevante Enzyme handelt. Wie aus der Michaelis-Menten-Gleichung  $v = (v_{\max} [S]) / (K_m + [S])$  hervorgeht, ist die S-PPase-Aktivität bei niedrigen PPi-Spiegeln gering, steigt aber auch bei konstanter Enzymmenge ( $v_{\max}$ ) unmittelbar an, wenn sich die PPi-Spiegel z.B. aufgrund gesteigerter Biosyntheseaktivitäten erhöhen. Auf diese Weise ist es der Zelle möglich, auf schwankende PPi-Spiegel schnell zu reagieren und eine *steady state*-Konzentration einzustellen, bei der einerseits die Makromolekülsynthese nicht beeinträchtigt ist und andererseits PPi-utilisierende Enzyme wie V-PPase oder PFP mit  $K_m$ -Werten unter 10  $\mu$ M optimal arbeiten.

#### 4.4 Transgene Pflanzen mit Überexpression von vakuolärer und/oder löslicher Pyrophosphatase aus *B. vulgaris*

Ausgangspunkt bei der Herstellung transgener Pflanzen war die Frage, ob sich die Akkumulation von Metaboliten und Ionen, deren Transport in die Vakuole über Antiportsysteme erfolgt, durch eine Erhöhung der PMF steigern lässt. Dies könnte generell zu einer erhöhten NaCl-Toleranz führen, was beispielsweise den Anbau von Nutzpflanzen auf salzhaltigen oder trockenen Böden ermöglichen würde. Speziell für die Zuckerrübe ist zusätzlich eine gesteigerte Saccharoseakkumulation im Speicherwurzelparenchym denkbar. Die Energetisierung des Tonoplasten erfolgt durch V-ATPase und V-PPase. Zur Erhöhung der PMF bietet sich die Überexpression der V-PPase gegenüber der V-ATPase vor allem deswegen an, weil die Funktionseinheit der V-PPase aus mehreren Kopien derselben Untereinheit besteht, so dass nur ein Gen transformiert werden muss. Hingegen handelt es sich bei der V-ATPase um ein kompliziertes Heteromultimer.

Die Untersuchungen, welche an der V-PPase der Zuckerrübe zur Ermittlung der Ausgangsbedingungen durchgeführt wurden, brachten für den transgenen Ansatz drei wichtige Erkenntnisse:

- 1.) Im Speicherparenchym der Rübe herrschen, wie z.B. auch in der Kartoffelknolle, hypoxische Verhältnisse (Abb. 3-4). Dies bestätigt die Wahl der V-PPase für die Überexpression, denn der erhöhte ATP-Verbrauch bei ektopischer Expression einer V-ATPase könnte negative Auswirkungen auf den Energiehaushalt haben. Dies zeigte die Überexpression einer Invertase in der Kartoffelknolle: Die Steigerung des ATP-abhängigen Saccharoseabbaus in dem sauerstoffarmen Gewebe stimulierte die Atmung, was zu Anaerobiose mit Induktion von Alkohol- und Lactatdehydrogenase, verringertem Adenylat-Energiestatus und verminderter Stärkesynthese führte (Bologa et al., 2003).
- 2.) Die V-PPase kann einen  $H^+$ -Gradienten von gleicher Größe aufzubauen wie die V-ATPase (Abb. 3-6) und ist damit in der Lage, die PMF maßgeblich zu beeinflussen.
- 3.) Die Transkriptspiegel beider V-PPase-Isoformen im Speicherparenchym nehmen im Verlauf der Rübenentwicklung ab. Somit sollte der durch die Überexpression zu erwartende Effekt deutlicher ausfallen, als wenn die Transkriptspiegel ohnehin durchgängig auf hohem Niveau blieben.

Neben *B. vulgaris* wurde auch *A. thaliana* mit einem V-PPase-Gen in *Sense*-Orientierung transformiert, um mögliche Auswirkungen auf die Salztoleranz der *per se* salzsensitiven Modellpflanze zu untersuchen. Für die Überexpression wurde das Gen der V-PPase-Isoform 1 aus *B. vulgaris* (*BVPI*) ausgewählt. Nach Vervollständigung der 5'-UTR mittels RACE-Technik wurde die gesamte cDNA-Sequenz in den Pflanzentransformationsvektor pBinAR kloniert. Das Transgen stand nach der Integration in das Genom von *B. vulgaris* und *A. thaliana* jeweils unter der Kontrolle des konstitutiv starken CaMV35S-Promotors. Speziell im Hinblick auf die Saccharoseakkumulation in der Zuckerrübe wäre auch die Verwendung eines rübenspezifischen Promotors von Interesse gewesen, um mögliche Effekte in *Source*- und Leitgewebe auszuschließen. Es konnten jedoch bis dato keine Promotoren identifiziert werden, die ausschließlich im Rübengewebe aktiv sind. Der Promotor des SuSy-Gens *SBSSI* wäre aufgrund der von Hesse und Willmitzer (1996) erhobenen Expressionsdaten ebenfalls ein möglicher Kandidat, doch ist seine Isolierung – u. a. aufgrund eines großen Introns in der 5'-UTR – bis heute nicht gelungen.

Neben der Steigerung der PMF sollte die V-PPase-Überexpression auch zu einer erhöhten Hydrolyse von PPi führen, was sich positiv auf Makromolekülsynthesen auswirken würde. Bei konstitutiver Expression könnte dies insbesondere in Meristemen, die eine hohe metabolische Aktivität aufweisen, zu beschleunigtem und/oder extensiverem Wachstum führen.

Um die Effekte von gesteigerter PMF und erhöhter PPi-Hydrolyse voneinander trennen zu können, wurde ein zweites pBinAR-Konstrukt zur Überexpression einer löslichen Pyrophosphatase hergestellt. Da die konstitutive ektopische Expression einer bakteriellen S-PPase negative Auswirkungen auf die Verteilung der in den *Source*-Blättern gebildeten Assimilate gezeigt hatte (Jelitto et al., 1992; Sonnewald, 1992), wurde hierfür erstmals ein pflanzliches Gen verwendet, und zwar die kurz zuvor identifizierte und biochemisch charakterisierte S-PPase-Isoform 1 aus *B. vulgaris* (*BSP1*). Diese unterscheidet sich von der *E. coli*-PPase unter anderem in ihrer Affinität zu PPi: Während der Km-Wert für das *E. coli*-Enzym bei 3,5  $\mu\text{M}$  liegt, weist BSP1 einen Km-Wert  $>50 \mu\text{M}$  auf. Die Überexpression von BSP1 sollte im Optimalfall zu einer Abnahme des cytosolischen Pyrophosphats auf ein Niveau führen, das Syntheseprozesse begünstigt, die Aktivität PPi-utilisierender Enzyme wie der V-PPase (Km  $<5 \mu\text{M}$  PPi) oder der PFP (Km  $<10 \mu\text{M}$  PPi) aber nicht beeinflusst. Schließlich sollte überprüft werden, ob durch die gleichzeitige Überexpression von BVPI und

BSP1 sowohl Wachstums- als auch Membrantransportprozesse stimuliert werden können. Für die Transformation wurde ein pBinAR-Vektor derart modifiziert, dass sich die vollständigen Expressionskassetten beider Gene auf derselben T-DNA befanden.

#### **4.4.1 Überexpression der homologen V-PPase AVP1 führt zu erhöhter Salztoleranz und Meristemaktivität in *A. thaliana***

Gaxiola et al. (2001) stellten transgene *A. thaliana*-Pflanzen her, die das homologe V-PPase-Gen *AVP1* überexprimieren. Nach ihren Befunden vermittelt die ektopische Expression einer V-PPase tatsächlich eine erhöhte Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen (250 mM NaCl) und Wassermangel. Die resistenten Linien enthielten – bezogen auf das Trockengewicht – mehr  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , akkumulierten mehr lösliche Stoffe und hatten niedrigere Wasserpotentialwerte. Die Autoren gehen davon aus, dass die Überexpression von *AVP1* zu einem verstärkten Transport der Kationen in die Vakuole führte, wobei  $\text{K}^+$  möglicherweise im Symport mit  $\text{H}^+$  (Maeshima, 2000) oder wie  $\text{Na}^+$  durch den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter *AtNHX1* (AF106324) oder dessen Orthologe transportiert wird (Gaxiola et al., 1999; Venema et al., 2002). Parallel dazu kam es zum verstärkten passiven Einstrom von Anionen in die Vakuole. Auch unter normalen Bedingungen war das Wachstum der AVP1-Transformanten positiv beeinflusst: die Pflanzen hatten mehr und - aufgrund einer erhöhten Zellzahl - größere Blätter. Der Samenertrag war höher, und zudem war die Fähigkeit von Gewebeexplantaten, Sprosse zu bilden, gegenüber dem Wildtyp stark verbessert (Eckardt et al., 2001).

Da keine Kontrolltransformanten hergestellt wurden, die eine cytosolische S-PPase überexprimierten, lässt sich aufgrund der beschriebenen Ergebnisse nicht beurteilen, ob die veränderten Wachstumseigenschaften der AVP1-Transformanten unter Normalbedingungen der erhöhten Energetisierung des Tonoplasten oder dem gesteigerten Turnover von Pyrophosphat zuzuschreiben sind. Außerdem ist kritisch anzumerken, dass offenbar nur zwei von 30 AVP1-Linien ein verändertes Wachstumsverhalten zeigten (Gaxiola et al., 2001). Die heterologe Überexpression von BVP1 und/oder BSP1 in *Arabidopsis* wird zeigen, ob sich die von Gaxiola et al. (2001) beschriebenen phänotypischen Auswirkungen reproduzieren lassen und ob diese eher auf gesteigerter PPI-Hydrolyse oder zusätzlicher Membranenergetisierung beruhen.



#### 4.4.2 Aktueller Stand der Experimente zur Pflanzentransformation

Für *A. thaliana* wurden transgene Linien hergestellt, die das BVP1-Gen, das BSP1-Gen oder beide in Kombination ektopisch überexprimieren (s. 3.3.2). Dies beweist, dass es generell möglich ist, mit einem pBinAR-Derivat Doppeltransformationen vorzunehmen. Die Pflanzen der T1-Generation, die noch nicht homozygot im Bezug auf das Transgen sind, zeigten bei Anzucht auf Erde unter normalen Wachstumsbedingungen keine phänotypischen Besonderheiten. Insbesondere eine Verdopplung der Blattanzahl wie bei Pflanzen mit Überexpression des homologen *AVP1*-Gens (Eckardt et al., 2001) wurde bei BVP1-Transformanten nicht beobachtet. Anders als Tabakpflanzen, die bei konstitutiver Überexpression der S-PPase aus *E. coli* aufgrund von gestörter Phloembeladung ein Ausbleichen der *Source*-Blätter zeigten (s. 2.4.1), unterschieden sich die Arabidopsis-Transformanten mit konstitutiver Überexpression der S-PPase aus *B. vulgaris* (BSP1) äußerlich nicht vom Wildtyp. Auch die Überexpression von BVP1 oder beider PPase-Typen gleichzeitig führte nicht zu dem beschriebenen Phänotyp. Es wäre allerdings vorschnell daraus abzuleiten, dass die ektopische Expression pflanzlicher PPase-Gene generell andere Auswirkungen hat als die eines bakteriellen PPase-Gens, da zwei unterschiedliche Arten transformiert wurden. Die Analyse von Pflanzen der T2-Generation hinsichtlich Wachstumsraten, Inhaltsstoffen und Salztoleranz wird zeigen, wie sich die Transformation mit den verschiedenen Pyrophosphatase-Konstrukten auswirkt.

Bei *B. vulgaris* dauert der gesamte Prozess von der Transformation bis zur molekularphysiologischen Charakterisierung transgener Rüben sehr lange. Die Regeneration von Pflanzen aus transformierten Blattscheiben ist speziell bei der Zuckerrübe ein langwieriges Verfahren mit geringer Erfolgsrate (Dovzhenko und Koop, 2003). Da die Zuckerrübe ein zweijähriges Gewächs ist, müssen die regenerierten Transformanten nach Erreichen einer bestimmten Größe erst einer dreimonatigen Vernalisation unterzogen werden, um die Blütenbildung zu induzieren. Nach der Selbstung werden Samen gewonnen, aus denen mehrere Pflanzen einer Linie gezogen werden, die dann im Laufe von sechs Monaten Rübenkörper ausbilden. Im Zeitraum dieser Doktorarbeit gelangen die Klonierung der Konstrukte, die Transformation sowie die Identifizierung von Primärtransformanten mit deutlich erhöhter Expression von BVP1 oder BSP1 (s. 3.3.2). Derzeit erfolgt in Kooperation mit der KWS Saat AG (Einbeck) die Herstellung von Saatgut dieser Linien. An den transformierten Pflanzen sollen dann Langzeitanalysen durchgeführt werden, wobei die

Parameter Wachstumsrate, Salztoleranz sowie Saccharose- und Pyrophosphatgehalt die höchste Priorität erhalten.

## 5 Material und Methoden

Nicht aufgeführte Chemikalien waren vom Reinheitsgrad *pro analysi*. Bei Prozentangaben handelt es sich – wenn nicht anders vermerkt – um Massenprozent (w/v).

### 5.1 Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an der Zuckerrübe (Nutzpflanze) und *Arabidopsis thaliana* (Modellorganismus) durchgeführt.

#### 5.1.1 Zuckerrüben

##### 5.1.1.1 Freilandanzucht

Bei der Anzucht von Zuckerrüben wurde eine diploide Inzuchtlinie (Partie-Nr. VV-I/ZR 10676) der KWS Saat AG (Einbeck) verwendet. Die Aussaat im Freiland erfolgte Ende März auf den Versuchsflächen des Heidelberger Instituts für Pflanzenwissenschaften. Für Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Expression verschiedener Pyrophosphatase-Isoformen wurden bis Oktober im Abstand von 2-3 Wochen Proben von verschiedenen Geweben (Wurzel, Rübe, *Source*- und *Sink*-Blatt) genommen und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

##### 5.1.1.2 Suspensionszellkultur

Als Medium für die Beta-Suspensionszellkultur wurde steriles Gamborg B5-Medium (Serva) mit einem pH von 5,5 verwendet. Unter Standardbedingungen enthielt dieses zusätzlich 20 g/l Saccharose, 0,5 g/l Casein-Hydrolysat sowie folgende Phytohormone: 0,2 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 0,5 mg/l Indol-3-Essigsäure (IAA) und 2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)<sup>5</sup>. Für die Anzucht von Zellen unter Phosphatmangel wurden die Komponenten des Gamborg B5-Mediums einzeln eingewogen und nur dem Kontrollmedium 1,09 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> beigelegt. 50 ml-Aliquots des Mediums wurden in 300 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt und 20 min bei 120 °C autoklaviert. Die Zellen wurden auf einem Schüttler bei 24 °C und 100 Upm im Dauerdunkel angezogen und alle 5-7 Tage in frisches Medium umgesetzt. Hierfür wurde der Inhalt eines Kolbens an der Sterilbank durch Umschütten auf drei neue Kolben verteilt.

---

<sup>5</sup> Das so modifizierte Medium wird im Folgenden als Gamborg B5<sup>+</sup>-Medium bezeichnet.

### 5.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Es wurden ausschließlich Pflanzen der Varietät ‚Columbia‘ verwendet. Die Pflanzen wurden auf einem Erde-Sand-Gemisch aus 85% Torfkultursubstrat (Floragard), 5% Pelite und 10% Sand zwei Monate lang im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen angezogen (8 h Licht mit einer Intensität von  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  und 65% relativer Luftfeuchtigkeit, 16 h Dunkel bei  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  und 75% relativer Luftfeuchtigkeit). Durch die Umstellung auf Langtagbedingungen (16 h Licht) erfolgte die Blühinduktion.

## 5.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 5.2.1 Stämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind mit Eigenschaften und Verwendungszweck in Tab. 5-1 zusammengefasst.

Stamm	Hersteller	Genetische Besonderheiten	Resistenz	Verwendung
<b>XL1-Blue</b>	Stratagene	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)]</i>	Tet <sup>r</sup>	Plasmid-amplifikation
<b>Top 10</b>	Invitrogen	F <sup>-</sup> , <i>mcrA, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)(φ80dlacZΔ M15), ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG</i>	Sm <sup>r</sup>	Plasmid-amplifikation
<b>DH5α</b>		F <sup>-</sup> , <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, (φ80dlacZΔM15)</i>		Protein-überexpression

Tab. 5-1 Übersicht der verwendeten *E. coli*-Stämme.

### 5.2.2 Anzucht und Bestimmung der Zelldichte

Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen wurde steriles Luria-Bertani (LB)-Medium (1% Bactotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,0) verwendet. LB-Agarplatten enthielten zusätzlich 2% Agar. Zu Selektionszwecken enthielt das Medium in Abhängigkeit vom transformierten Plasmid Ampicillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in der Regel über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  auf Agarplatten oder in Flüssigkultur unter Schütteln bei 180 Upm. Routinemäßig wurde für die Gewinnung von Plasmiden 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte steril angeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte im Zweistrahlphotometer (U-2000, Hitachi) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Medium.

### 5.2.3 Glyzerolstocks

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterien wurden Stocks mit einem Gehalt von 28% (v/v) Glycerol hergestellt. Dazu wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit 400 µl sterilem Glycerol versetzt, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Stammkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

### 5.2.4 Herstellung elektrokompenter Zellen

Ausgehend von einem Glyzerolstock des gewünschten Bakterienstamms wurden die Bakterien mit Hilfe einer Impföse auf einer Agarplatte - ggf. mit Antibiotikum - ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. 10 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und die Zellen bei 37 °C über Nacht herangezogen. Am nächsten Tag wurde die 10 ml-Vorkultur in 500 ml LB-Medium überführt und die Zellen weiter kultiviert. Sobald sie eine OD<sub>600</sub> um 1 erreicht hatten, wurde die Kultur auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden in vorgekühlten Zentrifugenbechern 15 min bei 4000×g und 4 °C sedimentiert. Reste von Medium und Salzen wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 500 ml Aqua bidest. entfernt. Anschließend wurden die Bakterien in 25 ml sterilem 10%igem (v/v) Glycerol resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in 2 ml 10% (v/v) Glycerol aufgenommen. Nach Aufteilung in 50 µl-Aliquots wurden die kompetenten Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 5.2.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte mittels Elektroporation, bei der die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kurzes Anlegen eines Stroms vermittelt wird. Elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl Bakterienlösung wurde 0,5-1,2 µl Ligationsansatz oder reine Plasmidlösung hinzugegeben und das Gemisch 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde es in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und für mindestens 4 ms ein elektrisches Feld (200 Ω Widerstand, 1,8 kV Spannung und 25 µF Kapazität) angelegt. Danach wurde sofort 600 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose, pH 7,0) zu den Bakterien in die Küvette gegeben und gut gemischt. Die Suspension wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Je nach eingesetzter Plasmidmenge wurde 50-200 µl Bakteriensuspension auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht

bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden einige auf eine Masterplatte überimpft, wovon dann 5 ml-Übernachtskulturen für die Plasmidisolierung angesetzt wurden.

## 5.3 DNA-Techniken

### 5.3.1 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von cDNA wurde 3-5 µg Gesamt-RNA, die zuvor - wie unter 5.4.1 beschrieben - isoliert worden war, eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit 100 pmol Oligo-dT-Primer (18mer) versetzt und das Volumen mit Aqua bidest. auf 4 µl aufgefüllt. Danach erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 70 °C, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde 2 µl 5× Reaktionspuffer (Promega), 100 nmol DTT, 40 U RNase-Inhibitor (RNaseOUT™, Invitrogen) und 1 µl dNTP-Lösung, die jedes der vier Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP und TTP in einer Konzentration von 2,5 mM enthielt, hinzugegeben. Nach einer 2 minütigen Inkubation bei 42 °C wurde der Ansatz durch Zugabe von 200 U reverser Transkriptase (M-MLV, Promega) vervollständigt, der damit ein Gesamtvolumen von 10 µl aufwies. Nach einer Stunde bei 42 °C wurde das Enzym durch zehn minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Die Gesamt-cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert, nachdem zuvor 2 µl-Aliquots hergestellt worden waren, um einen Abbau durch häufiges Auftauen und Einfrieren zu verhindern.

Nach erfolgter Erststrangsynthese konnte das gesuchte Fragment mittels PCR (s. 5.3.2) amplifiziert werden. Dazu wurde von einer 1:10-Verdünnung der Gesamt-cDNA 1 µl als Templat eingesetzt.

### 5.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA mittels PCR wurde pro 50 µl-Ansatz 1 U einer hitzestabilen rekombinanten Polymerase aus *Thermus aquaticus* (PLATINUM® Taq DNA Polymerase, Invitrogen) verwendet. Die Konzentration jedes der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate betrug pro Ansatz 50 µM, die Magnesiumchloridkonzentration 2,5 mM. Von jedem Primer wurden 50 pmol eingesetzt. Für anschließende Ligationen oder Restriktionsspaltungen wurden die PCR-Ansätze – falls erforderlich - mit Hilfe eines PCR Purification Kits® (Qiagen) gereinigt. Die Elution der DNA von der Reinigungssäule erfolgte mit 40 µl Aqua bidest.

### 5.3.2.1 RACE-PCR

Zur Vervollständigung der 5'- und 3'-Enden von cDNAs wurde das GeneRacer™-Kit (Invitrogen) verwendet. Vorteilhaft für die Vervollständigung von 5'-Enden ist bei diesem System, dass die verwendete Gesamt-mRNA zunächst mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert wird, wobei alle intakten mRNAs aufgrund ihrer 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende unverändert bleiben und somit nur die 5'-Enden von degradierten mRNAs ohne Kappe dephosphoryliert werden. Nach Entfernung der Kappe mittels „Tobacco Acid Pyrophosphatase“ (TAP) wurde ein RNA-Oligonucleotid (Linker) ausschließlich an das phosphorylierte 5'-Ende von vollständigen mRNAs ligiert und danach eine reverse Transkription durchgeführt. Die so erhaltenen cDNAs dienten anschließend als Templat für eine PCR mit einem linkerspezifischen *Sense*- und einem degenerierten *Antisense*-Primer.

Da bei dieser ersten Runde oft auch unspezifische Amplifikate entstanden, wurde eine *nested* („verschachtelte“) PCR mit dem ersten PCR-Ansatz als Templat und einem Primerpaar, dessen Sequenzen zwischen den Primern der ersten Runde lagen, durchgeführt. Dabei war der *Sense*-Primer erneut Bestandteil des Linkers. Aufgrund des geschilderten Prinzips sollten die so ermittelten 5'-Enden vollständig sein und die Basen unmittelbar nach dem Linker dem tatsächlichen Transkriptionsstart entsprechen.

Die Bestimmung eines 3'-Endes erfolgte nach analogem Schema mit einem genspezifischen *Sense*- und einem unspezifischen Poly-T-*Antisense*-Primer. Die Template und Primer, die zur Vervollständigung der Sequenzen von *BVPI* sowie *BSP1*, *BSP2* und *BSP4* verwendet wurden, sind in Tab. 5-2 aufgelistet.

Zielgen	Gewebe für cDNA-Synthese	Primerbezeichnung	Primersequenz	Primerlänge (n)
<b>BVP1</b> 5'-RACE	Speicherwurzel	PPase-2R	5' -GATCCTCCAAGACCATAACC-3'	20
<b>BSP1</b> 5'-RACE	<i>hairy roots</i>	1. SPP1A	5' -CCAAACGATGAGGAGGAAGCTGGTT-3'	25
		2. SPP1Nested	5' -GGACGACTGGTTCCTGCATAAGCA-3'	24
<b>BSP1</b> 3'-RACE	<i>hairy roots</i>	SPP5'	5' -CGAGATTGGACCTAATGCCCCCTGAA-3'	25
<b>BSP2</b> 5'-RACE	Speicherwurzel, Blatt	1. 9283_A	5' -AGGGGTGAGCAGCCACAGATTG-3'	22
		2. 9283_Nested	5' -CGAGGAAACCCTAAATGACGTTGGCT-3'	26
<b>BSP4</b> 5'-RACE	Blatt	1. BSP-P_RR	5' -GG(G/T)ATCTTGTAGTCTCTAAACCAGTC-3'	26
		2. 5144_Race5'	5' -CGGTCGCAACCTCCATCTTAGCAC-3'	24

Tab. 5-2 Primer und Template zur Ermittlung der Vollängensequenzen von *BVP1* sowie *BSP1*, *BSP2* und *BSP4*.

### 5.3.3 Plasmide

#### 5.3.3.1 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Zunächst wurde 5 ml einer Bakterienübernachtskultur (s. 5.2.2) 5 min bei 4000×g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl GTE-Puffer (50 mM Glukose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0), der zusätzlich 50 µg RNase enthielt, resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl stark alkalischem Lysepuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) wurden genomische DNA und Proteine ausgefällt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 14.000×g und 4 °C wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte 15 min lang bei -20 °C. Anschließend wurde 15 min bei 14.000×g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach 5 minütiger Zentrifugation bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl Aqua bidest. rückgelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Für Sequenzierungen und andere Anwendungen, die Plasmide in reiner Form erforderten, wurden Aufreinigungskits mit Silicagel-Säulchen (QIAprep<sup>®</sup>, Qiagen) verwendet.

#### 5.3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde nach 300facher Verdünnung mit H<sub>2</sub>O eine Absorptionsmessung bei 260 nm gegen Aqua bidest. in einem Zweistrahlphotometer durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-



Beerschen Gesetzes  $c = A \cdot d^{-1} \cdot \epsilon^{-1}$ . Bei einer Schichtdicke ( $d$ ) von 1 cm und einem Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA von  $\epsilon = 20 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$  ergibt sich beispielsweise bei  $A_{260 \text{ nm}} = 1$  eine Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$  für eine unverdünnte DNA-Lösung.

### **5.3.4 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen**

#### **5.3.4.1 Restriktionsspaltungen**

Für das Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (NEB) verwendet. Für Analysen zur Überprüfung von Plasmidgrößen und einligierten Fragmenten wurde 1  $\mu\text{g}$ , im präparativen Maßstab 10-20  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Beim Verdau von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte (gereinigte) PCR-Ansatz (40  $\mu\text{l}$ ) verwendet. Jeder Spaltungsansatz enthielt neben dem entsprechenden Puffer 1-2 U Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA. Die Inkubation erfolgte für mehrere Stunden oder über Nacht bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur, meist 37 °C. Bei Verwendung mehrerer Enzyme wurden die Restriktionsspaltungen nacheinander durchgeführt (es sei denn, die Enzyme benötigten dieselben Reaktionsbedingungen). Dafür oder für anschließende Ligationen war es nötig, die geschnittene DNA zu reinigen, wofür entsprechende Reinigungskits (QIAprep<sup>®</sup>, Qiagen) verwendet wurden. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde standardmäßig mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels (vgl. 5.3.5.1) überprüft.

#### **5.3.4.2 Gelextraktion**

Um nach einem Restriktionsverdau ein bestimmtes DNA-Fragment zu isolieren, wurde die Probe direkt neben einem DNA-Marker auf ein Agarosegel (vgl. 5.3.5.1) aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel der Länge nach durchgeschnitten, wobei die Spur der Probe am äußersten Rand angeschnitten wurde. Dieses Gelstück wurde in Ethidiumbromid inkubiert, die gewünschte Bande unter UV-Licht anhand des Markers identifiziert und ausgeschnitten. Durch Anlegen des gefärbten Gelstücks an das der Probe konnte anhand der Markierung die benötigte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits (QIAquick Gel Extraction Kit<sup>®</sup>, Qiagen) isoliert werden. Der Vorteil dieses Verfahrens bestand darin, dass kein Ethidiumbromid, welches z.B. bei Ligationen hinderlich wirkt, in das DNA-Fragment interkalierte.

### 5.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Proben wurden vor dem Beladen der Gele mit 1/5 Volumen 5× DNA-Auftragspuffer (5× TAE (vgl. 5.3.5.1), 50% (v/v) Glycerol, 0,1% Orange G) versetzt.

#### 5.3.5.1 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente betrug die Konzentration der Agarose im Gel zwischen 0,7 und 1,4%. Für das Ansetzen der Gellösung sowie als Laufpuffer wurde 1× TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Natriumacetat, 1 mM Natrium-EDTA, pH 7,2) verwendet. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 80-100 V statt.

#### 5.3.5.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

DNA-Moleküle, die weniger als 1500bp aufwiesen (z.B. PCR-Amplifikate), wurden in 12-15%igen (v/v) Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Bei der Herstellung der Gele wurden eine 30%ige Fertiglösung (Rotiphorese, Roth) mit 29,2% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid sowie ein Tris-Puffer, pH 8,8 mit einer Endkonzentration von 375 mM verwendet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 30-50 µl einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfatlösung und 5 µl einer gebrauchsfertigen TEMED-Lösung (Roth) gestartet. Der Elektrophorese wurde mit nativem Laufpuffer (3,6 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, pH 8,6) bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt.

#### 5.3.5.3 Ethidiumbromid-Färbung

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) geschwenkt und anschließend 5 min in VE-Wasser entfärbt. Die Visualisierung der Banden erfolgte auf einem UV-Durchlichttisch bei 254 nm unter Verwendung eines Geldokumentationssystems (Herolab). Durch die Verwendung eines speziellen DNA-Größenmarkers (Smart Ladder, Eurogentec), dessen Markerbanden definierte DNA-Mengen enthielten, ließ sich neben der Größe auch die Konzentration der aufgetragenen DNA abschätzen.

### 5.3.6 DNA-Ligation

Pro Ligationsansatz wurde 50-100 ng Vektor-DNA verwendet. Standardmäßig wurde bei „Sticky end“-Ligationen das Insert im drei- bis fünffachen molaren Verhältnis eingesetzt. Als Enzym wurde eine T4-DNA-Ligase (Roche) verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 12 °C. Eine Ausnahme bildeten die Vektoren pGEM-T (Promega) sowie pCR<sup>®</sup>-TOPO 2.1

und 4 (Invitrogen), die abweichende Vektor-/Insertverhältnisse, Ligationszeiten und -temperaturen erforderten. Hier wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **5.3.7 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA**

#### **5.3.7.1 DNA-Extraktion**

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach dem Protokoll von (Murray und Thompson, 1980). Von voll expandierten Blättern der Zuckerrübe wurde nach Entfernen der Mittelrippe 6 g in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem eisgekühlten Mörser wurde das Material unter Zusatz von 30 ml sterilem DNA-Extraktionspuffer (350 mM Sorbitol, 100 mM Tris-Base, 25 mM EDTA, 0,05% (v/v) Triton X-100, pH 8,0) und etwas Seesand gemörsert und anschließend durch eine Lage 80 µm-Nylongaze filtriert. Das Homogenat wurde in autoklavierte Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 750×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Kernpellet in 1,2 ml Extraktionspuffer resuspendiert, wobei – wie auch bei den folgenden Schritten – abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet wurden, um Scherkräfte zu vermeiden. Daraufhin erfolgte die Lyse der Kerne durch Zugabe von einem Volumen des auf 65 °C erwärmten Lysepuffers (2 M NaCl, 200mM Tris-Base, 50 mM EDTA, 2% CTAB, pH 8,0) und 0,5 Volumen einer 5%igen N-Lauroylsarcosin-Lösung. Nach einer 35 minütigen Inkubation bei 65 °C im Wasserbad wurde das Lysat auf RT abgekühlt, mit 1 Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1, v:v) versetzt und 15 min bei 80 Upm auf einem Schüttler gemischt. Zur Phasentrennung wurde dann 15 min bei 4 °C und 5000×g zentrifugiert. Nachdem der wässrige Überstand erneut bei 5000×g zentrifugiert worden war, erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren bei RT nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,2). Nach 20 min wurde die DNA 15 min bei 20.000×g zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 70% (v/v), dann mit 100 % EtOH gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 330 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) gelöst.

#### **5.3.7.2 Cäsiumchlorid-Gradient**

Aufgrund Ihrer unterschiedlichen Dichte lassen sich RNA und niedermolekulare DNA-Fragmente mit Hilfe eines CsCl-Gradienten von hochmolekularer DNA trennen. Dazu wurde 330 µl DNA-Lösung mit 660 µl CsCl-Lösung sowie 10 µl EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) versetzt. Nachdem die Probe sehr gründlich durchmischt worden war, erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren während einer Zentrifugation über Nacht bei 500.000×g und

15 °C (Optima TLX Ultracentrifuge, Rotor TLA 120.2, Beckman). Die hochmolekulare DNA, die als distinkte, rot-fluoreszierende Bande erschien, wurde abgenommen (etwa 200 µl). Um das Ethidiumbromid restlos zu entfernen, wurde die Lösung mit 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) und 600 µl 1-Butanol versetzt, geschüttelt und 2 min bei 16.000×g zentrifugiert. Die Epiphase (EtBr in 1-Butanol) wurde verworfen. Diese Ausschüttlungsprozedur wurde 4mal wiederholt, bis die Hypophase farblos erschien. Die hochmolekulare DNA wurde mit 1 Volumen Isopropanol 45 min auf Eis gefällt, 15 min bei 16.000×g und 4 °C präzipitiert und anschließend 15 min mit 70% (v/v) EtOH gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung, die wie unter 5.3.3.2 beschrieben erfolgte, ergab einen Wert von 2 µg/µl.

### **5.3.8 Southernblot**

#### **5.3.8.1 Restriktionsverdau**

Die genomische DNA aus Zuckerrübenblättern wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III (New England Biolabs) geschnitten (s. 5.3.4.1). Dabei wurde pro Ansatz 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl 4 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde die DNA mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,2) über Nacht bei -20 °C gefällt, 15 min bei 16.000×g zentrifugiert, das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) gelöst.

#### **5.3.8.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die aus dem Restriktionsverdau resultierenden Fragmente wurden in einem 0,8%igen Agarosegel (vgl. 5.3.5.1) aufgetrennt. Zusätzlich zu der verdauten DNA (je 10 µg) wurden 1 µg unverdaute DNA und ein DNA-Marker zur Größenabschätzung aufgetragen. Der Gellauf erfolgte 4 h bei 70 V. Das Gel wurde anschließend 5 min in Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) gefärbt und ebenso lange entfärbt. Anschließend wurde es auf dem Transilluminator mit einem Lineal neben dem Größenmarker photographiert.

#### **5.3.8.3 Depurinierung und Denaturierung der DNA**

Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran musste die DNA zunächst depuriniert bzw. denaturiert werden. Dazu wurde das Gel 5 min in 0,25 N HCl inkubiert (Depurinierung), kurz mit Aqua bidest. abgespült, zweimal 15 min mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH,

1 M NaCl) behandelt und schließlich 10 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-Base, 1,5 M NaCl, pH 7,4) inkubiert.

#### **5.3.8.4 Kapillartransfer**

Entsprechend der Größe des Gels wurden 8 Filterpapiere (Whatman) und eine Nylonmembran (Duralon UV, Stratagene) zurechtgeschnitten. Membran und Gel wurden 10 min in Transferpuffer (5× SSC: 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat, pH 7,0) äquilibriert. Währenddessen wurde ein ca. 2 cm dicker Schaumgummischwamm in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale gelegt. Auf diesem wurden von unten nach oben 3 in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere, das Gel, die Membran, 3 weitere feuchte sowie 2 trockene Filterpapiere und schließlich Papierhandtücher etwa 3 cm hoch luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer erfolgte über Nacht mit einem Blotgewicht von 1 g/cm<sup>2</sup> Blotfläche. Danach wurde die Membran 5 min in Transferpuffer gewaschen, 2 min auf trockenem Filterpapier getrocknet und die DNA im UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

#### **5.3.8.5 Hybridisierung und Detektion**

Zum Nachweis von Isoformen löslicher Pyrophosphatasen in *Beta vulgaris* wurde eine biotinylierte Sonde gegen den kodierenden Bereich der Isoform 1 (*BSPI*) verwendet (s. 5.4.4.4). Die Detektion wurde analog zum Northernblot (5.4.4) nach (Löw und Rausch, 1996) durchgeführt. Das Waschen mit hoher Stringenz erfolgte bei 55 °C.

### **5.4 RNA-Techniken**

#### **5.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach (Logemann et al., 1987). Die verwendeten Lösungen wurden mit 0,1%igem DEPC-Wasser angesetzt und alle Schritte auf Eis durchgeführt, um Abbau durch RNasen zu verhindern. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Zugabe von β-Mercaptoethanol (Roth) zum Extraktionspuffer erfolgte erst unmittelbar vor Beginn der Extraktion.

Das Pflanzenmaterial (0,5 g bei Blättern) wurde in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Nach Zugabe von 2 ml/g Frischgewicht RNA-Extraktionspuffer (20 mM MES, 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM EDTA, pH 7,2) wurde das auftauende Material weiter homogenisiert. Je 1 ml

Homogenat wurde in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt, in die zuvor 0,6 ml PCI-Gemisch (50% (v/v) TE-gesättigtes Phenol (Roth), 48% (v/v) Chloroform, 2% (v/v) Isoamylalkohol) pipettiert worden war. Die Proben wurden gut durchmischt, so lange auf Eis gestellt, bis alle Ansätze fertig gemörsert waren, und dann in der Tischzentrifuge 10 min bei 16.000×g zentrifugiert. Die wässrige Phase befand sich im Überstand und enthielt die Nukleinsäuren. Sie wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß mit 0,7 Volumen 100% (v/v) EtOH und 0,05 Volumen 1 M Essigsäure überführt und gut gemischt. Die Fällungsreaktion erfolgte 15 min bei RT, da in der Kälte mehr genomische DNA mit ausfällt. Die gefällte RNA wurde anschließend 15 min bei 16.000×g abzentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 500 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) überschichtet, um co-präzipitierte DNA zu lösen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 16.000×g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen. Dann wurde erneut 10 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet bei 37 °C einige Minuten getrocknet, bis das restliche Ethanol verdunstet war. Schließlich wurde die RNA 10 min bei 65 °C in DEPC-Wasser gelöst. Die Ausbeuten lagen, je nach Material, bei 50-250 µg RNA/g Frischgewicht.

#### **5.4.2 Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen**

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden photometrisch bestimmt. Gemessen wurde die Absorption einer 1:300-Verdünnung in einem Spektrum von 240 bis 280 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für RNA,  $\epsilon=25 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Die Verunreinigung mit Proteinen wurde über den Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  bestimmt, der im Optimalfall bei 1,8 liegen sollte. Die RNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 1-2 µg/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### **5.4.3 Fällung von RNA**

Betrag die Konzentration weniger als 1 µg/µl, musste für Anwendungen wie z.B. Northernblot-Analysen eine Fällung durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die Probe mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde die gefällte RNA 15 min bei 16.000×g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss an einen Waschschrift mit 70% (v/v) Ethanol wurde das RNA-Pellet bei 37 °C getrocknet und anschließend in einem geringeren Volumen DEPC-Wasser als zuvor gelöst.

#### 5.4.4 Northernblot

##### 5.4.4.1 Qualitätskontrolle der RNA

Da durch photometrische Untersuchungen ein möglicher Abbau der RNA nicht ermittelt werden kann, wurde genau 3 µg RNA jeder Probe in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anders als bei DNA-Agarosegelelektrophorese (5.3.5.1) wurde hier bei der Herstellung des Gels und als Laufpuffer für die Elektrophorese ein TBE-Puffer (100 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 2,5 mM Natrium-EDTA, pH 8,4) verwendet. Waren die Banden der 25S und 18S rRNA deutlich zu erkennen, galt die RNA als nicht abgebaut. Des Weiteren ließ sich durch diese Testgele ermitteln, ob die photometrischen Konzentrationsbestimmungen korrekt und identische RNA-Mengen aufgetragen worden waren.

##### 5.4.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Standardmäßig wurde je Probe 15 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl geladen. Dazu wurde das entsprechende Volumen gelöster RNA mit DEPC-Wasser auf 13,6 µl gebracht. Dann wurde 6,4 µl Auftragspuffer hinzugegeben, bestehend aus 3,3 µl Formaldehyd (37% (v/v)), 1 µl 20× MOPS-Puffer (0,4 M MOPS, 0,1 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7,2), 2 µl 5× RNA-Auftragspuffer (50% (v/v) Glycerol, 5× MOPS-Puffer, 0,5% Bromphenolblau) und 0,1 µl EtBr-Stammlösung (1 mg/ml). Vor der Beladung des Gels wurden die Proben 10 min bei 65 °C denaturiert.

Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1,4%igen Agarosegel, das mit 1× MOPS-Puffer (vgl. Auftragspuffer) hergestellt worden war. Des Weiteren enthielt das Gel 6% (v/v) einer 37%igen (v/v) Formaldehydlösung zur Denaturierung der RNA, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Der Gellauf erfolgte mit 1× MOPS als Laufpuffer bei konstant 70 V im Abzug. Der RNA-Mengenabgleich wurde anschließend durch ein Photo des Gels unter UV-Licht auf dem Transilluminator dokumentiert.

##### 5.4.4.3 Kapillartransfer auf Nylonmembranen

Angewendet wurde das nicht-alkalische Blotverfahren über Nacht bei RT. Dazu wurden eine ungeladene Nylonmembran (Duralon-UV, Stratagene), 9 Filterpapiere (Whatman) und Papierhandtücher auf die Größe des Agarosegels zurechtgeschnitten. Das Gel wurde 10 min in Transferpuffer (10× SSC: 1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH 7,0) äquilibriert. Die Membran wurde zunächst 5 min in Aqua bidest. gelegt und dann ebenfalls 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Über eine mit Transferpuffer gefüllte Schale wurde eine Glasplatte

gelegt. Auf dieser befand sich ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier ('Brücke'), dessen Enden in die Flüssigkeit ragten, um den Kapillartransfer zu ermöglichen. Der weitere Aufbau war folgendermaßen (von unten nach oben): Auf 3 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurde das Agarose-Gel mit der unebeneren Oberseite nach unten und darauf die Nylonmembran gelegt. Als weitere Schichten kamen 3 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, 3 trockene Filterpapiere und ein 3-4 cm dicker Stapel Papierhandtücher hinzu. Abschließend wurde ein flächiges Gewicht ( $4 \text{ g/cm}^2$  Gelfläche) aufgelegt. Nach einer Blotdauer von etwa 14 h wurde die Membran 5 min zum Entfernen von Gelresten in Transferpuffer gewaschen, auf einem Filterpapier luftgetrocknet und die RNA auf der Membran im UV-Crosslinker fixiert. Anschließend konnte die trockene Membran bis zur Detektion aufbewahrt werden.

#### **5.4.4.4 Nicht-radioaktive Detektion**

Die Herstellung Biotin-markierter DNA-Sonden erfolgte mittels PCR unter Einsatz von Biotin-16-dUTP (Roche), welches bei der Polynukleotidsynthese anstelle von dTTP eingebaut wird. Dementsprechend wurde pro 50  $\mu\text{l}$ -Ansatz statt 50 nur 25  $\mu\text{M}$  dTTP und 25  $\mu\text{M}$  Biotin-16-dUTP eingesetzt. Parallel zu dieser Markierungsreaktion wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Laufstrecken der beiden Amplifikate im PAA-Gel konnte so ermittelt werden, ob die Markierung erfolgreich war. Im Anschluss wurde der Rest des biotinylierten PCR-Ansatzes (45  $\mu\text{l}$ ) in 20 ml Prähybridisierungslösung (30% (v/v) Formamid, 1% SDS, 1 M NaCl, 6% Polyethylenglycol 6000, 250  $\mu\text{g/ml}$  denaturierte und gescherte Lachsspermien-DNA) gelöst. Die Aufbewahrung der Sonden erfolgte bei 4 °C.

Zum spezifischen Nachweis von Isoformen wurden Primer verwendet, die gegen die wenig konservierten 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) gerichtet waren. Durch Sonden, die gegen die hoch konservierten kodierenden Bereiche der Pyrophosphatasen gerichtet waren, konnten hingegen mehrere Isoformen erfasst werden. Für die Herstellung dieser Sonden wurden degenerierte Konsensus-Primer synthetisiert. In Tab. 5-3 sind die Primer aufgelistet, die zur Herstellung der Sonden verwendet wurden.



Sonde	Primer-bezeichnung	Primersequenz	Primer-länge (n)	Sondenlänge (bp)
<b>BVP kodierend</b>	BVP_cod. L	5' -GGWGGHATTGCTGARATGGC-3'	20	569
	BVP_cod. R	5' -AGTAYTTCTTDGCRTTVTCCC-3'	21	
<b>BVP1 genspezifisch</b>	BVP1(S)-L	5' -ATGAATGATCGGCGCAAAATC-3'	21	448
	BVP1(S)-R	5' -TAGATCCAATCTGCAAAATGAG-3'	22	
<b>BVP2 genspezifisch</b>	BVP2L	5' -ACTTATTTTAAGAGGATGCC-3'	20	393
	BVP2R	5' -ACATCAAATCATCGATGTTAC-3'	21	
<b>BSP kodierend</b>	sol-L1	5' -TGCTGCTCATCCWTGGCA-3'	18	440
	sol-R1	5' -TCRTTYTTCTTGARTCYTCAA-3'	22	
<b>BSP1 genspezifisch</b>	bsp3'L	5' -GGCACTTTCAATTATTGTCATTC-3'	23	249
	bsp3'A	5' -AGCCTCCTAAACCAACATGA-3'	21	
<b>V-ATPase Untereinheit c<sub>1</sub></b>	BV16ISO-L	5' -GTGCTGGTCAATCAAGACCCG-3'	21	457
	BV16ISO1-R	5' -CATCAACACATTTAATTTATTGATCC-3'	26	

Tab. 5-3 Primer zur Herstellung Biotin-markierter Sonden. IUB-Abkürzungen: D=[A,T,G], H=[A,T,C], R=[A,G], W=[A,T], Y=[C,T].

Die Detektion erfolgte nach Löw und Rausch (1996) in Hybridisierungsröhen (Techne, GFL). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 42 °C durchgeführt. Für den Waschschrift mit hoher Stringenz (0,2× SSC, 0,5% SDS) wurde standardmäßig eine Temperatur von 55 °C gewählt. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde CDP-Star (Roche) verwendet. Die Expositionszeiten variierten je nach Sonde und Pflanzenmaterial; im Fall der V-PPase waren meist nach 2 h starke Signale zu erkennen, zur Detektion der S-PPase war oft eine Exposition über Nacht oder länger nötig.

## 5.5 Protein-Techniken

### 5.5.1 Proteinisolierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine isoliert. Sämtliche Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

#### 5.5.1.1 Gewinnung der cytoplasmatischen Proteinfraktion

Es wurde 0,5 g Blattmaterial von *A. thaliana* oder *B. vulgaris* unter Zugabe von 1 ml Extraktionspuffer (100 mM HEPES, 250 mM Sorbitol, 50 mM KCl, 20 mM Ascorbat, 3 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 8,0) homogenisiert. Der Rohextrakt wurde 15 min bei 5000×g

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX Ultracentrifuge, Rotor TLA 120.2, Beckman) 1 h bei 300.000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

#### **5.5.1.2 Isolierung von Tonoplastenvesikeln**

Tonoplastenvesikel aus Zuckerrüben wurden in Anlehnung an (Ratajczak et al., 1994) isoliert. 45 g Rübenmaterial (3 Monate bei 4 °C gelagert) wurde in 160 ml Homogenisierungsmedium (200 mM Tricin, 450 mM Mannitol, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM EGTA, 0,5% Polyvinylpyrrolidon (PVP), 1 mM DTT, pH 8,0) in einem Mixer zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 200 µM-Gaze filtriert und anschließend 5 min bei 4200×g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Gewinnung der mikrosomalen Fraktion 30 min bei 300.000×g in einem 50.2-Ti-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 ml Homogenisierungsmedium resuspendiert. Je 25 ml davon wurde mit 8 ml Gradientenmedium (5 mM HEPES, 2 mM DTT, 25% (w/w) Saccharose, pH 7,5) unterschichtet und 90 min bei 100.000×g zentrifugiert. Von beiden Gradienten wurde jeweils 1 ml Interphase, welche die Tonoplastenfraktion repräsentiert, mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit Verdünnungsmedium (50 mM HEPES, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, pH 7,0) gemischt. Anschließend wurden die Tonoplasten 30 min bei 300.000×g pelletiert, in 500 µl Lagermedium (10 mM HEPES, 40% (v/v) Glycerol, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, pH 7,0) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80° C.

#### **5.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung löslicher Proteine erfolgte nach (Bradford, 1976) unter Verwendung einer gebrauchsfertigen Lösung wie vom Hersteller (Biorad) angegeben: Ein Aliquot der Proteinproben wurde zu 1 ml der 1:5 verdünnten Assaylösung gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einem Zweistrahlphotometer gegen einen proteinfreien Blindwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade, angefertigt mit Rinderserumalbumin, bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung membrangebundener Proteine erfolgte nach der Methode von (Popov et al., 1975). Zur Herstellung der Stammlösung wurde 0,13 g Amidoschwarz 10B in 1 ml 100% (v/v) Essigsäure und 9 ml Ethanol unter Rühren über Nacht gelöst. Für die

Gebrauchslösung wurde 0,5 ml Stammlösung mit 2,5 ml Essigsäure und 22 ml Ethanol verdünnt. Ein Aliquot der Proteinlösung wurde 5 min mit 0,6 ml Gebrauchslösung inkubiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei 12.000×g wurde der Überstand dekantiert und das Pellet zweimal mit dem Gemisch aus Essigsäure und Ethanol (1:10, v:v) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet 15 min bei 40 °C in 300 µl 1 N NaOH gelöst und die Absorption bei 624 nm gegen einen proteinfreien Blindwert gemessen. Zur Konzentrationsberechnung wurden Standards mit 0-8 µg BSA gemessen.

### **5.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli (1970). Die Gele enthielten je nach Fragestellung zwischen 12 und 15% (v/v) Polyacrylamid. Die denaturierende unterschied sich von der nativen PAGE (5.3.5.2) in der Zusammensetzung von Sammelgelpuffer (0,125 M Tris-Base, 0,1% SDS, pH 6,8), Trenngelpuffer (0,375 mM Tris-Base, 0,1% SDS, pH 8,8) und Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 0,1% SDS, 200 mM Glycin, pH 8,6).

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit Auftragspuffer (Roti®Load) versetzt und 5 min bei 90 °C denaturiert. Beim immunologischen Nachweis der V-PPase wurde keine Hitzedenaturierung durchgeführt, da sonst - vermutlich aufgrund von Aggregatbildung - keine Immunosignale zu sehen waren. Zur Größenbestimmung wurde der LMW-Marker (Amersham Biosciences) mit vorgefärbten Proteinen im Bereich von 14,4-97 kDa verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einer anfänglichen Spannung von 100 V durchgeführt. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine entweder direkt im Gel mit Coomassie-Blue (s. 5.5.4) gefärbt, oder zum immunologischen Nachweis auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 5.5.5.2).

### **5.5.4 Coomassiefärbung und Konservierung von PAA-Gelen**

Die Coomassiefärbung wurde verwendet, um Proteine in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese 60 min unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue G250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Danach wurde das Gel in Entfärbelösung (Zusammensetzung wie die Färbelösung, nur ohne Coomassie Blue) unter mehrmaligem Lösungswechsel entfärbt, bis das Banden-Hintergrundverhältnis optimal war.

Die Gele wurden entweder bei 4 °C in Aufbewahrungslösung (45% (v/v) Methanol, 2,5% (v/v) Glycerol) gelagert oder getrocknet. Dazu wurden sie 5 min in Aufbewahrungslösung äquilibriert und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien in einen Gel trockenrahmen eingespannt.

### **5.5.5 Westernblot-Analyse**

#### **5.5.5.1 Antiseren**

Bei allen verwendeten Antikörpern handelte es sich um IgGs aus Kaninchen. Zum Nachweis der V-PPase-Proteine aus *Beta vulgaris* wurde ein gegen die V-PPase der Mungobohne (*Vigna radiata*) gerichtetes Antiserum verwendet (Maeshima und Yoshida, 1989). Zur Detektion der V-ATPase-Untereinheiten wurde ein gegen das Holoenzym der V-ATPase von *Kalanchoe daigremontiana* gerichteter Antikörper eingesetzt (Haschke et al., 1989). Im Fall der S-PPase wurden zwei polyklonale Antiseren benutzt, die bei Eurogentec (Herstal, Belgien) hergestellt worden waren. Für die Immunisierung wurde das rekombinante, über Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigte Protein BSP1 verwendet. Beide Antiseren führten bei Westernblot-Analysen zum gleichen Ergebnis. Standardmäßig wurden die Antiseren 1:2000 mit 1× TBST (20 mM Tris-Base, 100 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20, 1 mM EDTA, pH 7,5) unter Zusatz von 1% Magermilchpulver verdünnt. Zur Konservierung enthielten sie zudem 1 mM Natriumazid.

#### **5.5.5.2 Proteintransfer und Detektion**

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) erfolgte im Semi-dry-Verfahren nach Towbin et al. (1979) unter Verwendung einer Blotapparatur (Fast-Blot, Biometra). Die Detektion wurde wie bei (Weil et al., 1994) durchgeführt. Abweichend davon wurde zur Blockierung 5% Magermilchpulver statt 8% BSA eingesetzt. Als Substrat wurde "SuperSignal West Dura" (Pierce, Rockford, USA) verwendet.

#### **5.5.5.3 Amidoschwarzfärbung**

Nach dem immunologischen Nachweis wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit Amidoschwarz nachgewiesen, um die Proteinmengen der verschiedenen Proben vergleichen und anhand der Markerproteine eine Größenbestimmung der Banden auf dem Film (Hyperfilm-ECL, Amersham) vornehmen zu können. Dazu wurde die Membran 10 min in der Färbelösung (0,5% Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 8% (v/v) Essigsäure) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran in der Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Ethanol) so lange entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren und dann an der Luft getrocknet.

## 5.5.6 Aktivitätsassays

### 5.5.6.1 V-PPase und V-ATPase

Die Hydrolyseaktivität der beiden Protonenpumpen wurde über die Freisetzung von Pi nach (Ames, 1966) gemessen. Zur Bestimmung der Gesamt-Hydrolyseaktivität enthielt der Reaktionspuffer (50 mM BTP/MES, 50 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>, pH 7,5) neben 2 mM ATP bzw. 0,2 mM PPI zusätzlich 0,002% (v/v) Brij 58, um die katalytischen Zentren von ‚inside-out‘-orientierten Vesikeln für das Substrat zugänglich zu machen. Durch getrennte Messungen in Gegenwart und Abwesenheit des spezifischen Hemmstoffs Concanamycin A (5 nM) konnte die Aktivität der V-ATPase selektiv bestimmt werden. Zur Bestimmung der K<sup>+</sup>-sensitiven V-PPase-Aktivität wurde mit oder ohne 50 mM KCl gemessen. Die eingesetzte Menge an Tonoplastenprotein betrug jeweils 0,75 µg.

Die H<sup>+</sup>-Pumpaktivität von V-PPase und V-ATPase in angereicherten Tonoplastenvesikeln wurde nach der bei Palmgren (1990) beschriebenen photometrischen Methode unter Verwendung von Acridinorange (3,6-Bis[dimethylamino]acridin, Sigma) gemessen. Protonierte und unprotonierte Form dieser Verbindung stehen miteinander im Gleichgewicht. Das ungeladene (= unprotonierte) Molekül ist in der Lage, die Membran zu permeieren. Die Erzeugung eines Protonengradienten über die Membran führt zu einer Anreicherung der protonierten Form im Inneren der Vesikel, was wiederum einen verstärkten Einstrom von ungeladenen Molekülen bewirkt. Durch diese Konzentrierung kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den protonierten Acridinorangemolekülen in den Vesikeln. Dies führt zu einer Abnahme der Absorption bei 492 nm, die zur Bestimmung der Aktivität herangezogen wird. Das Reaktionsmedium (37,5 mM MOPS-BTP, 250 mM Saccharose, 112 mM KCl, 0,75 mM DTT, 2 mM ATP, 0,02 mM Acridinorange, pH 7,5) enthielt 1 mM Natrium-Azid und 0,1 mM Natrium-Vanadat, um Effekte durch F- bzw. P-ATPasen zu verhindern. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MgSO<sub>4</sub> (4 mM) gestartet und über einen Zeitraum von 30 min bei RT gemessen.

### 5.5.6.2 S-PPase

Zur Bestimmung der Pyrophosphataseaktivität rekombinanter S-PPasen (s. 5.8) wurde nach Rojas-Beltran et al. (1999) verfahren. Die hoch gereinigte Proteinlösung wurde mit

Elutionspuffer verdünnt, ein 50 µl-Aliquot mit 200 µl Reaktionspuffer versetzt und darin 15 min bei RT inkubiert. Dieser enthielt standardmäßig 50 mM Tris, 1 mM Tetranatriumpyrophosphat, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0. Zur Bestimmung des pH-Optimums oder bei der Messung von Kinetiken wurden die Parameter entsprechend geändert. Die Reaktion wurde mit 750 µl Färbelösung (3,4 mM Ammoniummolybdat in 0,5 M Schwefelsäure, 0,5 M SDS, 0,6 M Ascorbinsäure, 6:2:1, v:v:v) gestoppt und nach 20 min wurde die Absorption bei 820 nm gemessen.

### **5.5.7 FPLC-Analyse**

Bei der FPLC-Analyse wurde eine Superdex75-Säule verwendet. Der Laufpuffer enthielt 50 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl sowie 0 oder 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Die Fließrate betrug 1 ml/min, der Säulendruck 0,3 MPa und das Fraktionsvolumen 4 ml. Pro Lauf wurde etwa 100 µg rekombinantes BSP2-Protein geladen. Die Größenbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichgerade, die anhand der Proteine RNase A, Chymotrypsinogen, Ovalbumin und Albumin hergestellt worden war.

## **5.6 Messung der Sauerstoffkonzentration im Rübenewebe**

Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration erfolgte nach (Geigenberger et al., 2000). Eine O<sub>2</sub>-Microelektrode (Toepffer Lab Systems), deren Spitze einen Durchmesser von weniger als 1 mm aufwies, wurde senkrecht zur Oberfläche in die äußerste Schicht einer intakten Rübe eingeführt, und nach 5 min wurde die Sauerstoffkonzentration ermittelt. Dann wurde die Elektrode in 5 mm-Schritten immer weiter in das Gewebe geschoben, und an jeder Position wurde eine 5 minütige Sauerstoffmessung durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Sauerstoffkonzentration im Blattstiel ermittelt. Als Referenz diente gut durchlüftetes Wasser, das bei RT eine O<sub>2</sub>-Konzentration von 21% (etwa 150 µM) aufweist.

## **5.7 Ballistische Transformation**

Mit einer Partikelkanone lassen sich pflanzliche Zellen aus Suspensionskultur oder sogar ausdifferenzierte Gewebe transient transformieren. Bei diesem direkten Gentransfer wird die DNA an Wolframpartikel gebunden und nach lokaler Zerstörung der Zellwand in die pflanzliche Zelle gebracht, wo die Transkription z. B. eines Reportergens erfolgt (Sanford et al., 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Partikelkanone einerseits verwendet, um die Stärke der beiden BVP-Promotoren in *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen in Abhängigkeit

von der Phosphatversorgung mittels Luciferasekonstrukten zu testen (s. 5.7.5). Andererseits wurden Versuche zur subzellulären Lokalisierung der löslichen PPase BSP1 mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins durchgeführt (s. 5.7.4). Genau genommen handelte es sich in beiden Fällen um Kotransformationen, da entsprechende Kontrollplasmide im gleichen Ansatz mitbeschossen wurden. Das Protokoll, nach dem die Beschüsse durchgeführt wurden, variierte leicht in Abhängigkeit davon, ob GFP/RFP- oder Luciferase/GUS-Konstrukte verwendet wurden.

### 5.7.1 Funktionsprinzip der Partikelkanone

Die Partikelkanone („Biolistic<sup>®</sup> PDS-1000/He“, BioRad) enthält eine Überdruckkammer, welche mit Heliumgas gefüllt werden kann (Abb. 5-1). Diese wird von der evakuierbaren Unterdruckkammer durch eine Berstscheibe getrennt, unterhalb derer sich ein so genannter Makrocarrier mit den DNA-beladenen Wolframpartikeln (Mikrocarrier) sowie ein Stoppnetz befinden. Bei einer definierten Druckdifferenz kommt es zum Reißen der Berstscheibe, so dass eine Heliumdruckwelle in die Unterdruckkammer strömt und dabei den Makrocarrier beschleunigt. Dieser wird am Stoppnetz aufgehalten, während die Mikrocarrier mit der DNA ungebremst auf die sich in der Unterdruckkammer befindlichen Zellen treffen.

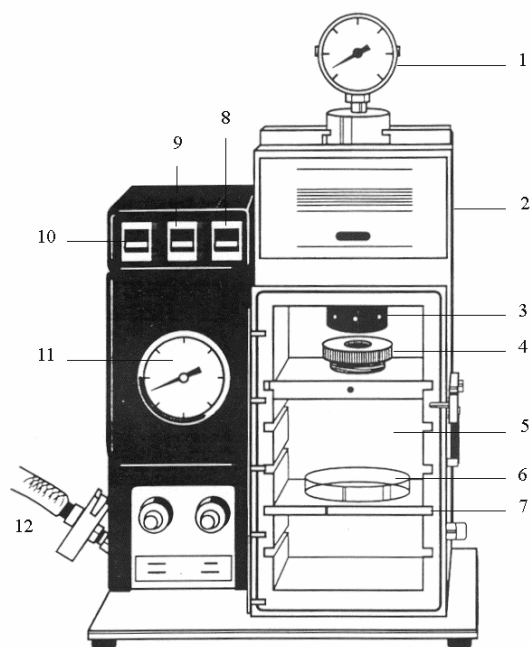


Abb. 5-1 Aufbau der Partikelkanone Biolistic<sup>®</sup> PDS-1000/He (BioRad). 1. Helium-Manometer, 2. Überdruckkammer, 3. Berstscheiben-Halterung, 4. Halterung für Makrocarrier und Stoppnetz, 5. evakuierbare Unterdruckkammer, 6. Probe, 7. Proben-Halterung, 8. Feuerknopf, 9. Vakuumschalter, 10. AN/AUS-Schalter, 11. Vakuumanometer

### 5.7.2 Vorbereitung des Zellmaterials

Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde das Flüssigmedium von *Beta vulgaris*-Zellen abgenutscht und je ca. 1 g Zellen auf einem sterilen Rundfilter gleichmäßig verteilt, welcher dann auf eine B5<sup>+</sup>-Agarplatte (Ø 5,3 cm) gelegt wurde. Diese Platten waren zuvor mit Gamborg B5<sup>+</sup>-Medium hergestellt (s. 5.1.1.2) worden, welches zusätzlich jeweils 125 mM Mannitol und Sorbitol sowie 0,9% Pflanzenagar (Duchefa) enthielt. Nach dem Transfer der Zellen auf die Platten wurden diese drei Stunden stehen gelassen, um durch den osmotischen Stress - hervorgerufen durch die hoch konzentrierten Zuckeralkohole - die Transformations-effizienz der Zellen zu steigern.

### 5.7.3 Partikelpräparation

Die verwendeten Wolframpartikel (M-20 Microcarriers, BioRad) hatten eine durchschnittliche Partikelgröße von 1,318 µm. Es wurden 30 mg Wolframpartikel in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol versetzt und 20 s lang auf dem Vortexer geschüttelt. Nach 10 minütiger Inkubation wurden die Partikel 30 s bei 4000×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 500 µl steriles Aqua bidest. hinzugegeben und die Partikel wie zuvor mit Ethanol behandelt. Nach Entfernen des Wassers wurden die sedimentierten Partikel in 500 µl sterilem 50% (v/v) Glycerol aufgenommen und durch Vortexen gemischt. Die Partikel konnten so bei -20 °C gelagert oder direkt mit DNA beladen werden (s. 5.7.5.2).

### 5.7.4 Beschüsse mit GFP/RFP-Konstrukten zur Lokalisierung von BSP1

#### 5.7.4.1 Klonierung des GFP-Konstrukts

Für die Herstellung des GFP-Reportergenkonstrukts wurde ein modifizierter pFF19-Vektor (Timmermans et al., 1990) verwendet, in den das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP; (Sheen et al., 1995)) kloniert worden war (Wachter et al., 2004). Diese wird flankiert von der CaMV35S-Polyadenylierungsregion und dem konstitutiv exprimierten starken CaMV35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), welcher durch die Verdopplung einer internen 'Enhancer'-Region (35S enh) noch zusätzlich verstärkt wird (Odell et al., 1988).

Der für die Amplifikation der kodierenden Region von *BSP1* verwendete *Sense*-Primer enthielt neben einer *Bam*HI-Schnittstelle (fett) unmittelbar vor dem Start-ATG eine „Kozak-



Sequenz“ (unterstrichen), um eine optimale Translation zu gewährleisten (Kozak, 1991). Der *Antisense*-Primer enthielt sowohl eine *Pst*I- als auch eine *Sal*I-Schnittstelle (fett):

*Sense*-Primer:                   GTCGGGATCCGCCACCATGGATGAGGAGATGAATGCTG

*Antisense*-Primer:           GAAGCTGCAGGTCGACTCTCCTCAATGTCTGTAGGATG

Nachdem sowohl das *BSP1*-Amplifikat als auch der pFF19GFP-Vektor mit *Bam*HI und *Pst*I geschnitten worden waren, erfolgte die Ligation, wobei die *BSP1*-Sequenz unmittelbar vor das Startcodon des GFP kloniert wurde.

#### 5.7.4.2 Transformation von *Beta vulgaris*-Suspensionskulturzellen

Bei den Versuchen zur subzellulären Lokalisierung von BSP1 wurde bei jedem Beschuss insgesamt 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt: 2 µg des Fusionskonstrukts pFF19GFP-BSP1 (s. 5.7.4.1) und 2 µg eines Kontrollkonstrukts, das die Sequenz für ein Fusionsprotein, bestehend aus dem 81 Aminosäuren langen Transitpeptid der plastidären  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS) aus *Brassica juncea* (Wachter et al., 2004) und dem rot fluoreszierenden Protein aus *Discosoma spec.* (dsRED), enthielt (Jach et al., 2001). Die Beladung der Wolframpartikel erfolgte analog zu den Promotorkonstrukten (vgl. 5.7.5.1). Auch die Prozedur beim Beschießen der Zellen war ähnlich mit dem einzigen Unterschied, dass jede Platte zweimal beschossen wurde, um die Zahl transformierter Zellen zu steigern.

#### 5.7.4.3 Protoplastierung

Um am Mikroskop eine bessere Auflösung der zellulären Strukturen zu erzielen, wurden die Zellwände 24 h nach dem Beschuss mit Hilfe von Pektinasen und anderen lytischen Enzymen aufgelöst. Dazu wurden die Zellen von den Agarplatten in 500 µl Protoplastierungslösung (5 mM MES-Puffer, 3,8% CaCl<sub>2</sub>, 9% (v/v) Mannitol, 2% Cellulase, 0,1% Driselase, 1% Pectinase, pH 5,8) transferiert und darin weitere 24 h bei RT unter Schütteln inkubiert.

#### 5.7.4.4 Mikroskopische Auswertung

Die Protoplasten wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit etwas Glycerol gemischt. Die transiente Expression der beiden Fusionsproteine in den Protoplasten wurde fluoreszenzmikroskopisch an einem Inverslichtmikroskop (Leitz DMIL, Leica) untersucht. Die Analyse des GFP-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines FITC-Filters (Anregung: 450-490 nm, Emission: 515 nm Langpass); im Fall des dsRED-Fusionsproteins wurde ein XF137-2-Filter (Anregung: 540 ± 30 nm, Emission: 585 nm Langpass) verwendet. Die mit

einer Digitalkamera aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe der Software ‚analySIS‘ (Soft Imaging System) verarbeitet.

## **5.7.5 Beschüsse mit Promotor-Reportergenkonstrukten**

### **5.7.5.1 Promotor-Reportergenkonstrukte**

Die Aktivität der Promotoren von *BVP1* und *BVP2* in Abhängigkeit von der Phosphatversorgung wurde mit Hilfe der von Moes und Wang klonierten Promotor-Luciferase-Konstrukte untersucht (Moes, 2002). Dabei handelt es sich um pBluescript II SK<sup>+</sup>-Vektoren, bei denen das 1,8 kb große cDNA-Fragment des Luciferase-Strukturgens (LUC) aus *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1987) unter der Kontrolle des entsprechenden Promotors steht (Lehr et al., 1999). Als Vergleich diente das Plasmid pCLN mit dem dem Luciferase-Strukturgen unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten CaMV35S-Promotors und der 3'-Polyadenylierungsregion des Nopalinsynthase-Gens (Callis et al., 1987).

Die Anzahl der Transformationsereignisse aus den einzelnen Beschüssen und damit auch die Expression des jeweiligen Reportergens kann von Probe zu Probe stark schwanken, so dass ein interner Standard bei allen Beschüssen notwendig ist, der die Transformationseffizienz der einzelnen Beschüsse widerspiegelt. Daher erfolgte ein Cobombardement mit dem Kontrollplasmid pFF19G (Timmermans et al., 1990), das das  $\beta$ -Glucuronidase-Strukturgen (GUS) aus *E. coli* (Jefferson et al., 1986) unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors enthält.

### **5.7.5.2 Beladung der Partikel mit Plasmid-DNA**

Für jedes Promotorkonstrukt bzw. für jede Bedingung wurden Partikel für 12 Beschüsse vorbereitet, standardmäßig wurden anschließend je 10 Platten beschossen. Die Beladung der Partikel mit der Plasmid-DNA erfolgte für alle 12 Proben gemeinsam in einem Eppendorfgesäß. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Beladung für einen Schuss: Je 9  $\mu$ l Wolframpartikel-Suspension (s. 5.7.3) wurden unter Vortexen mit 1  $\mu$ g Plasmid-DNA versetzt, die sich aus 0,7  $\mu$ g des jeweiligen LUC-Konstrukts und 0,3  $\mu$ g des Kontrollplasmids pFF19G zusammensetzte (s. 5.7.5.1). Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde unter Vortexen 9  $\mu$ l einer sterilen 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 3,6  $\mu$ l einer 1,2 mM Spermidinlösung (steril filtriert) und 18,2  $\mu$ l Ethanol zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min auf Eis wurden die beladenen Partikel 10 s bei 4 °C und 1000 $\times$ g pelletiert und der Überstand

vorsichtig abgenommen. Die Partikel wurden in 6,4 µl Ethanol resuspendiert und bis zum Beschuss auf Eis gelagert.

### **5.7.5.3 Transformation**

Die folgenden Schritte wurden - nach Oberflächensterilisation der benötigten Teile mit Ethanol - an der Sterilbank durchgeführt. Die resuspendierte Partikelsuspension wurde 7 s bei maximaler Einstellung sonifiziert (Labsonic U, Braun, USA). Anschließend wurde je 5 µl - der Rest der ursprünglich 6,4 µl Suspension verdunstete beim Sonifizieren - in die Mitte der bereitgelegten Macrocarrier pipettiert und mit der Pipettenspitze im zentralen Bereich gleichmäßig verteilt, um eine gute Streuung der Partikel beim Beschuss zu erreichen.

Für jeden Beschuss wurde ein beladener Macrocarrier, eine Berstscheibe und ein Stoppnetz in die entsprechenden Halterungen der Partikelkanone eingesetzt und die Petrischale mit den Zellen in die dritte Position von oben gestellt. In der Unterdruckkammer wurde ein Vakuum von 167 mbar erzeugt und anschließend Heliumgas in die Überdruckkammer eingeleitet, bis es bei 1350 psi zum Reißen der Berstscheibe und somit zum Beschuss der Zellen kam. Die beschossenen Zellen wurden bis zur Herstellung der Proteinextrakte etwa 20 h lang bei RT im Dunkeln aufbewahrt.

### **5.7.5.4 Blindwerte**

Viele Pflanzen weisen eine geringe endogene Glucuronidase-Aktivität auf (Alwen et al., 1992). Daher wurden zusätzlich 5 Gamborg B5<sup>+</sup>-Platten mit *Beta vulgaris*-Zellen präpariert, die nicht beschossen wurden. Sie wurden im Folgenden behandelt wie die beschossenen Zellen und ebenfalls auf Enzymaktivität getestet. Mit diesen Negativkontrollen wurde die Hintergrundaktivität bestimmt, die von den Messwerten der transformierten Zellen abgezogen wurde.

### **5.7.5.5 Herstellung von Proteinextrakten**

Es wurde das 'Luciferase Assay System' der Firma Promega verwendet. Je 1 g Zellen aus einer Petrischale wurde in einen Mörser eingewogen, mit 0,5 ml 1× Extraktionspuffer (Promega) versetzt und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert. Das Homogenisat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß dekantiert und anschließend 5 min bei 4 °C und 16.000×g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Aktivitätstest auf Eis gelagert.

#### 5.7.5.6 Bestimmung der Reporterprotein-Aktivitäten

Durch Quantifizierung der Aktivitäten der beiden Reportergene Luciferase und  $\beta$ -Glucuronidase können Rückschlüsse auf die Stärke der verwendeten Promotoren gezogen werden. Da das Luciferase-Protein natürlicherweise in Pflanzenzellen nicht vorkommt, wird bei diesem Aktivitätstest ausschließlich die Luciferase-Aktivität von transformierten Zellen erfasst. Dabei wird das Substrat Luciferin in Gegenwart von ATP,  $Mg^{2+}$  und Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Das im Reaktionspuffer (Promega) enthaltene Coenzym A sorgt für einen erhöhten Substrat-Umsatz, womit eine höhere Lichtintensität entsteht, die für mindestens eine Minute stabil bleibt.

Aliquots der Proteinextrakte und der Reaktionspuffer wurden vor der Messung auf RT gebracht. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde 20  $\mu$ l Proteinextrakt von jeder Probe in ein 5 ml-Glasröhrchen pipettiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l Luciferase-Reaktionspuffer (Promega) wurde die Oxidation des Luciferins gestartet und die Intensität des dabei emittierten Lichts in einem Luminometer (Lumat 9501, Berthold) bei 560 nm unmittelbar gemessen.

Zur Messung der durch das Kalibrierplasmid pFF19G vermittelten GUS-Aktivität wurde das Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoronid (4-MUG) verwendet, das in Glucuronsäure und ein fluoreszierendes Produkt, 7-Hydroxy-4-Methylcoumarin (4-MU), gespalten wird. Die Intensität der Fluoreszenz von 4-MU bei 450 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 355 nm kann im Fluorometer quantifiziert werden und ist somit ein Maß für die GUS-Aktivität.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Proteinextrakt zu 1,9 ml Reaktionspuffer (50 mM Natrium(di)hydrogenphosphat, 1 mM 4-MUG, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton-X-100, 0,1% SDS, pH 7,0) gestartet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach 5 h Reaktion bei RT an einem Spektralfluorometer (FP-777, Jasco). Zur Ermittlung der endogenen Glucuronidase-Aktivität (Alwen et al., 1992) wurde die GUS-Aktivität nicht transformierter Zellen gemessen und der Mittelwert von den Werten der transformierten Proben abgezogen, so dass bei der Berechnung der Promotoraktivität allein die GUS-Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidase berücksichtigt wurde.

## 5.8 Überexpression von BSP1 und BSP2 in *E. coli*

### 5.8.1 Klonierung der Konstrukte

Die kodierenden Sequenzen der beiden S-PPase Isoformen aus *Beta vulgaris* *BSP1* und *BSP2* wurden mittels PCR amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer waren im Fall von *BSP1* dieselben wie bei der Amplifikation für das pFF<sub>19</sub>-GFP-Konstrukt (s. 5.7.4.1). Auch bei der Amplifikation von *BSP2* enthielt der *Sense*-Primer am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle, der *Antisense*-Primer sowohl eine *Pst*I- als auch eine *Sal*I-Schnittstelle (fett):

*Sense*-Primer: 5'-GTCC**GGATCC**CCACCATGTTGAAGAATGAAGGAGAGGA-3'

*Antisense*-Primer: 5'-GAAG**CTGCAGGTCGAC**CTTCTCAAGCCCTCAACAATG-3'

Die Klonierung in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) erfolgte jeweils über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I. Das Konstrukt wurde zusammen mit dem pUBS520-Plasmid, das u. a. die Sequenz für die bei *E. coli* oft limitierende tRNA<sup>Arg</sup><sub>AGA/AGG</sub> sowie das *lacI*<sup>q</sup>-Gen des *Lac*-Repressors trägt (Brinkmann et al., 1989), in DH5 $\alpha$ -*E. coli*-Zellen transformiert.

### 5.8.2 Induktion und Aufreinigung

Die heterologe Überexpression wurde mittels 1 mM IPTG induziert, nachdem die Bakterien eine OD<sub>600</sub> von 0,9 erreicht hatten. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37 °C in Gegenwart von 100 mg/l Ampicillin (pQE-30) und 30 mg/l Kanamycin (pUBS520). Die Aufreinigung wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Lysozym (1 mg/ml) oder einer French Press. Der dabei verwendete Lysepuffer enthielt 50 mM MOPS (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach der durch die 6 N-terminalen Histine vermittelten Bindung an eine Nickel-NTA-Agarosematrix (Qiagen) erfolgten mehrere Waschschrte mit steigender Imidazol-Konzentration (20-75 mM) unter sonst gleichen Pufferbedingungen. Die Elution erfolgte analog mittels 100-250 mM Imidazol.

## 5.9 Herstellung stabil transformierter Pflanzen

Zur Klärung der Rolle vakuolärer und löslicher Pyrophosphatasen für den pflanzlichen Stoffwechsel wurden transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und *Beta vulgaris* hergestellt, die eine Beta-V-PPase (BVP1), eine Beta-S-PPase (BSP1) oder beide (BVP1/BSP1) überexprimieren. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen in den

Pflanzentransformationsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) kloniert und die Pflanzen durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer transformiert. Während die Transformation von *A. thaliana* mit der *Floral dip*-Methode eigenständig durchgeführt wurde, erfolgte die Transformation durch Blattscheibentransformation und Regeneration von Zuckerrüben bei der KWS Saat AG (Einbeck). Nach Zusendung von Blattmaterial wurden positive Beta-Transformanten durch Northernblot-Analysen identifiziert.

### 5.9.1 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer

Mit Hilfe des Gram-negativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* ist es möglich, Gene stabil in das Genom zahlreicher Pflanzenspecies zu integrieren. Die phytopathogene Wirkung von *A. tumefaciens* beruht auf dem Vorhandensein eines Plasmids, das als „tumor-inducing plasmid“ (Ti-Plasmid) bezeichnet wird. Ein Teil des Plasmids, die sogenannte Transfer-DNA (T-DNA), wird während des Infektionsprozesses in den Kern der Pflanzenzelle eingeschleust und an einer zufälligen Stelle im Genom (Chilton et al., 1977) integriert. Aus den heute für die Pflanzentransformation verwendeten Ti-Plasmiden wurden die natürlicherweise vorhandenen Phyto-Onkogene sowie die Gene zur Opinsynthese entfernt, so dass eine ungestörte Entwicklung transformierter Pflanzen ohne Tumorwachstum möglich ist (Willmitzer et al., 1983).

In dieser Arbeit kam ein binäres Vektorsystem zur Anwendung, das auf dem Zusammenspiel zweier Plasmide, dem Helferplasmid und dem Vektorplasmid, basiert (Hoekema et al., 1983). Auf dem Helferplasmid befinden sich die *vir*-Gene, deren Funktion in der Koordination und Durchführung des T-DNA-Transfers in die Pflanzenzelle besteht (Zupan und Zambryski, 1995; Zhu et al., 2000). Das Vektorplasmid (pBinAR, s. 5.9.2) enthält die zu übertragenden Gene, flankiert von Grenzsequenzen, die 25bp lange, fast identische Sequenzwiederholungen darstellen und als *right border* (RB) und *left border* (LB) bezeichnet werden.

### 5.9.2 Der Pflanzentransformationsvektor pBinAR

Dieses pBin19-Derivat hat eine Größe von 12,5kb (Höfgen und Willmitzer, 1990). Zur Selektion trägt der Vektor sowohl ein bakterielles (*nptII*) als auch ein pflanzliches Kanamycin-Resistenzgen (*nptIII*). Letzteres befindet sich ebenso auf der T-DNA wie die Klonierungsstelle, die vom CaMV35S-Promotor und dem OCS-Terminator flankiert wird und das Einfügen des Transgens ermöglicht.

### 5.9.3 Herstellung der Konstrukte

Die Klonierung der Konstrukte erfolgte zunächst in *E. coli*. Nach Identifizierung positiver Klone mit Hilfe von Restriktionsspaltungen wurden die Plasmide sequenziert und anschließend durch Elektroporation in kompetente *A. tumefaciens*-Zellen transformiert.

#### 5.9.3.1 Klonierung von *BSP1* in pBinAR

Anhand von cDNA aus Suspensionskulturzellen und der im Folgenden genannten Primer wurde die *BSP1*-Sequenz nahezu in Volllänge (1041bp) mittels PCR amplifiziert. Die 5'-Enden der Primer waren mit *KpnI*- (*Sense*-Primer) bzw. *XbaI*- (*Antisense*-Primer) Schnittstellen (fett markiert) versehen, um das Amplifikat nach Restriktionsverdau in den Transformationsvektor pBinAR zu ligieren:

*Sense*-Primer: 5'-CCGG**GGTACCA**AAGGAATTTGTAGATCTCCGA-3'

*Antisense*-Primer: 5'-CTAG**TCTAGA**AAGCCTCCTAAACCAAACATGA-3'

#### 5.9.3.2 Klonierung von *BVPI* in pBinAR

Es wurden Primer generiert, welche zu Beginn der 5'-UTR und am Ende der 3'-UTR der Isoform I der V-PPase aus Zuckerrübe binden (Kim et al., 1994):

*Sense*-Primer: 5'-ACACTCTTCCTCTCCCTCTCTTCCAAACCC-3'

*Antisense*-Primer: 5'-TAGATCCAATCTGCAAAATGAGATAAATTCC-3'

Mit Hilfe dieser Primer wurde die V-PPase mittels PCR aus Gesamt-cDNA von Beta-Suspensionskulturzellen amplifiziert. Das 2860bp lange Amplifikat wurde anschließend in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogen) zwischenkloniert. Die links und rechts der Insertionsstelle befindlichen Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* des Vektors wurden dazu genutzt, die Sequenz der V-PPase auszuschneiden und anschließend in die multiple Klonierungsstelle des ebenfalls *KpnI/XbaI*-geschnittenen Pflanzentransformationsvektors pBinAR zu ligieren.

#### 5.9.3.3 Herstellung des Doppelkonstrukts: Klonierung der Sequenzen von V-PPase und S-PPase in pBinAR

Für die Überexpression beider S-PPase-Gene wurde zunächst die gesamte Expressionskassette aus dem pBinAR-BSP1-Konstrukt (s. 5.9.3.1) über PCR amplifiziert. Sie enthält neben der Vollängen-cDNA der C-PPase den CaMV35S-Promotor (540 bp) sowie den OCS-Terminator (196 bp). Der für die Amplifikation benutzte *Sense*-Primer bindet am

5'-Ende des CaMV35S-Promotors und besitzt eine *ApaI*-Schnittstelle, der *Antisense*-Primer greift am 3'-Ende des OCS-Terminators und verfügt über eine *PstI*-Schnittstelle (Schnittstellen fett markiert):

*Sense*-Primer:                    5' -AAGTCG**GGGCC**CGAATTC~~CC~~ATGGAGTCAAAGAT-3'  
*Antisense*-Primer:                5' -GAAGCC**ATCGATA**AAGCTTGGACAATCAGTAAATTG-3'

Das mittels dieser Primer gewonnene Amplifikat wurde mit *ApaI* und *ClaI* verdaut und anschließend in das ebenfalls *ApaI* und *PstI* verdaute pBinAR-BVP1-Konstrukt (s. 5.9.3.2) kloniert. Diese beiden Schnittstellen befinden sich hier zwischen dem OCS-Terminator und der rechten Grenzregion der T-DNA. Aufgrund der Position der Schnittstellen *ApaI* und *PstI* befinden sich die beiden Expressionskassetten damit in umgekehrter Orientierung im pBinAR-Doppelkonstrukt.

#### 5.9.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *floral dip*

Die Methode des *floral dip* ermöglicht es, *Arabidopsis thaliana* einfach und schnell stabil zu transformieren (Clough und Bent, 1998). Die resultierenden transformierten Samen werden auf Selektionsmarker-haltigem MS-Agar ausgesät, was die direkte Selektion positiver Transformaten ermöglicht. Damit entfällt bei dieser Methode die Regeneration von Pflanzen aus Gewebekultur.

##### 5.9.4.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Für die Transformation wurden pro Konstrukt ca. 60 Pflanzen der Varietät ‚Columbia‘ benötigt. Je 4 Pflanzen wurden in einem Topf (9×9 cm<sup>2</sup>) im Gewächshaus angezogen (s. 5.1.2). Durch Entfernen der ersten Infloreszenz wurde die Apikaldominanz aufgehoben und die Bildung von Sekundärinfloreszenzen angeregt, wodurch die Anzahl der Blüten erheblich gesteigert wurde. Die Effizienz der Transformation war besonders hoch, wenn die Pflanzen zum Zeitpunkt der Transformation möglichst viele noch geschlossene Blüten aufwiesen, welche sich im Laufe der sich über mehrere Tage erstreckenden Behandlung mit Agrobakterien öffneten.

##### 5.9.4.2 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Agrobakterien-Stamm C58C1 mit dem Helferplasmid pGV2260-Plasmid verwendet, auf dem sich neben den Vir-Genen ein Carbenicillin-Resistenzgen befindet. Zusätzlich hat der Stamm eine chromosomal kodierte Rifampicin-



Resistenz (Deblaere et al., 1985). Daher enthielten alle Medien sowohl 100 mg/l Rifampicin und 50 mg/l Carbenicillin.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde 10 ml YEB-Medium (1% Hefeextrakt, 0,5% Rinderextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,5) mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 190 Upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 3 ml der Übernachtskultur in 200 ml YEB-Medium überimpft und 8 h bis zu einer OD<sub>560 nm</sub> von 1 angezogen. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4 °C und 2000×g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit einer eiskalten Lösung aus 10% (v/v) Glycerol und 1 mM HEPES, pH 7,0 gewaschen und schließlich in 2 ml dieser Lösung aufgenommen. Je 50 µl der kompetenten Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **5.9.4.3 Transformation der Agrobakterien durch Elektroporation**

Die Transformation der Agrobakterien mit den pBinAR-Konstrukten (s. 5.9.3) erfolgte auf die gleiche Weise wie die Transformation von *E. coli* Bakterien (s. 5.2.5). Die transformierten Bakterien wurden 1 h bei 28 °C und 180 Upm in SOC-Medium inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit 50 mg/l Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden 1-2 Tage bei 28 °C inkubiert. Von einzelnen Kolonien wurden 50 ml-Übernachtskulturen angesetzt und daraus Plasmide isoliert, welche anschließend sequenziert wurden.

#### **5.9.4.4 Transformation von Arabidopsis-Blüten durch *floral dip***

Eine Vorkultur von 50 ml YEB-Medium mit den Antibiotika Rifampicin, Carbenicillin und Kanamycin wurde mit einem rekombinanten *A. tumefaciens*-Klon angeimpft und ÜN bei 28 °C und 190 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 750 ml antibiotikahaltiges YEB-Medium in 2l-Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml Vorkultur angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 28 °C und 190 Upm bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,8 inkubiert. Dann wurden die Bakterien 5 min bei 4000×g zentrifugiert. Das Sediment wurde in Dip-Medium (½ MS-Medium, 5% Saccharose, pH 5,8) so resuspendiert, dass die OD<sub>600 nm</sub> etwa 0,9 betrug. Diese Suspension wurde in Plastikschaalen gefüllt und die Pflanzen-Infloreszenzen 20 s komplett eingetaucht. Zusätzlich wurde die Agrobakterien-Suspension mit einer Pipette auf einzelne Blüten getropft. Die Pflanzen wurden über Nacht mit einer Plastikhaube bedeckt, um die Verdunstung des Flüssigkeitsfilms auf den Blüten zu verhindern. Diese Transformationsprozedur wurde in Abständen von drei Tagen zweimal identisch wiederholt,

so dass auch Zellen transformiert werden konnten, die sich erst dann im optimalen Entwicklungsstadium für die Transformation befanden.

#### **5.9.4.5 Ernte und Stratifikation der Samen aus den transformierten Pflanzen**

Etwa 3 Wochen nach der letzten Transformation bildeten die transformierten Pflanzen (T0-Generation) Schoten. Sie wurden daraufhin nicht mehr gegossen und die Blütenstände in Papiertüten verpackt, in denen sich die abfallenden Schoten und Samen sammelten.

#### **5.9.4.6 Selektion transformierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen in Sterilkultur**

Zur Sterilisation wurde 50-100 mg der geernteten *A. thaliana*-Samen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 1,5 ml einer 6%igen (v/v) Hypochloritlösung versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation unter starkem Schütteln wurde die Hypochloritlösung gewechselt und die Probe erneut geschüttelt. Nachdem diese Prozedur ein weiteres Mal wiederholt worden war, wurden die Samen dreimal in sterilem VE-Wasser gewaschen. Dann wurden die Samen in einer sterilen 0,1%igen Agarose-Lösung aufgenommen und mit einer abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze auf Selektionsplatten pipettiert ( $\frac{1}{2}$  konz. MS-Medium, 2% Saccharose, 0,8% Agar, 50 mg/l Kanamycin, pH 5,8). Wildtyp-Samen wurden auf Agarplatten mit (Negativkontrolle) und ohne (Positivkontrolle) Kanamycin ausgebracht. Anschließend wurden die Platten in eine Klimakammer gestellt (8 h Licht bei 24 °C, 16 h Dunkelheit bei 18 °C). Nachdem die Pflanzen der T1-Generation das Vierblattstadium erreicht hatten, wurden sie in ein Erde/Sandgemisch pikiert und im Gewächshaus angezogen (s. 5.1.2). Jede dieser Pflanzen stellte eine eigene Linie dar. Die Expressionshöhe der Transgene in diesen Linien wurde mit Hilfe von Northern- und Westernblot-Analysen überprüft.

#### **5.9.4.7 Analyse der T2-Generation**

Die Samen der Linien wurden gesammelt und erneut auf Agarplatten ausgesät. Im Falle einer Einfachinsertion waren theoretisch 50% der Pflanzen heterozygot und 25% homozygot im Hinblick auf das Transgen; 25% entsprachen wieder dem Wildtyp. Da Mehrfachinsertionen aber häufiger vorkamen, enthielten fast alle Nachkommen das Transgen.

## **5.10 Computergestützte Sequenzanalysen**

Vergleichende Sequenzanalysen wurden mit dem Wisconsin-Paket (Version 10.2) der Genetics Computer Group (Madison, Wisconsin) auf dem HUSAR 5.0-Server am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt. Die Untersuchung von Proteinsequenzen hinsichtlich möglicher Transitpeptide erfolgte mit dem Programm TargetP v1.01, das die Vorhersage der subzellulären Lokalisierung aufgrund der Primärstruktur ermöglicht (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2000).

## 6 Literaturverzeichnis

- Alwen A, Benito Moreno RM, Vicente O, Heberle-Bors E** (1992) Plant endogenous beta-glucuronidase activity: how to avoid interference with the use of the *E. coli* beta-glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants. *Transgenic Res* **1**: 63-70
- Ames BN** (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**: 115-118
- Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas L** (1997) Developmental changes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberization of potato. *Planta* **202**: 220-226
- Avaeva SM, Vorobyeva NN, Kurilova SA, Nazarova TI, Polyakov KM, Rodina EV, Samygina VR** (2000) Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry (Mosc)* **65**: 373-387
- Banks NH** (1983) Evaluation of methods for determining internal gases in banana fruit. *J Exp Bot* **34**: 871-879
- Baykov AA, Shestakov AS, Kasho VN, Vener AV, Ivanov AH** (1990) Kinetics and thermodynamics of catalysis by the inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* in both directions. *Eur J Biochem* **194**: 879-887
- Birnboim HC und Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**: 2058-2072
- Boorer KJ, Loo DD, Frommer WB, Wright EM** (1996) Transport mechanism of the cloned potato  $\text{H}^+$ /sucrose cotransporter StSUT1. *J Biol Chem* **271**: 25139-25144
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brauer D, Uknalis J, Triana R, Shachar-Hill Y, Tu SI** (1997) Effects of Bafilomycin A1 and Metabolic Inhibitors on the Maintenance of Vacuolar Acidity in Maize Root Hair Cells. *Plant Physiol* **113**: 809-816
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P** (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**: 109-114
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE** (1985) Membrane transport in isolated vesicles from sugarbeet taproot: evidence for a sucrose/  $\text{H}^+$ -antiport. *Plant Physiol* **78**: 871-875
- Bucke C** (1970) The distribution and properties of alkaline pyrophosphatase from higher plants. *Phytochemistry* **9**: 1303-1309
- Callis J, Fromm M, Walbot V** (1987) Expression of mRNA electroporated into plant and animal cells. *Nucleic Acids Res* **15**: 5823-5831

- Carystinos GD, MacDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS, Poole RJ** (1995) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol* **108**: 641-649
- Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW** (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**: 263-271
- Clough SJ und Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R** (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* **17**: 262-266
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S** (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**: 725-737
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**: 4777-4788
- Dovzhenko A und Koop HU** (2003) Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. *Planta* **217**: 374-381
- Drew MC** (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* **48**: 223-250
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA** (2000) AVP2, a sequence-divergent, K<sup>+</sup>-insensitive H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **123**: 353-362
- du Jardin P, Rojas-Beltran J, Gebhardt C, Brasseur R** (1995) Molecular cloning and characterization of a soluble inorganic pyrophosphatase in potato. *Plant Physiol* **109**: 853-860
- Echeverria E und Gonzalez PC** (2000) ATP-induced sucrose efflux from red-beet tonoplast vesicles. *Planta* **211**: 77-84
- Eckardt NA, Cho H-T, Perrin RM, Willmann MR** (2001) Meeting report: Plant Biology 2001. *Plant Cell* **13**: 1360-1385
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016
- Farre EM, Geigenberger P, Willmitzer L, Trethewey RN** (2000) A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiol* **123**: 681-688
- Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN** (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci* **7**: 35-41
- Fieuw S und Willenbrink J** (1990) Sugar transport and sugar-metabolizing enzymes in sugar beet storage roots (*Beta vulgaris* ssp. *altissima*). *J Plant Physiol* **137**: 216-223
- Flügge U-I und Heldt HW** (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* **42**: 129-144
- Franke W** (1997) *Nutzpflanzenkunde*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Gama Brandao ME und Aoyama H** (1992) Kinetic properties of maize germ cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Plant Physiol Biochem* **30**: 753-760
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR** (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11444-11449
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR** (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1480-1485
- Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 247-256
- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* **381**: 723-740
- Geigenberger P, Hajirezaei M, Geiger M, Deiting U, Sonnewald U, Stitt M** (1998) Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers. *Planta* **205**: 428-437
- Geigenberger P, Langenberger S, Wilke I, Heineke D, Heldt HW, Stitt M** (1993) Sucrose is metabolised by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* **190**: 446-453
- Geigenberger P, Lerchl J, Stitt M, Sonnewald U** (1996) Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long-distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* **19**: 43-55
- Giaquinta RT** (1979) Sucrose translocation and storage in the sugar beet. *Plant Physiol* **63**: 828-832
- Gross P und ap Rees T** (1986) Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* **167**: 140-145
- Hajirezaei M, Sonnewald U, Viola R, Carlisle S, Dennis D, Stitt M** (1994) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphatase:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* **192**: 16-30
- Hara A, Kawamoto K, Funaguma T** (1980) Inorganic pyrophosphatase from pollen of *Typha latifolia*. *Plant Cell Physiol* **21**: 1475-1482
- Haschke H-P, Bremberger C, Lüttge U** (1989) Transport proteins in plants with crassulacean acid metabolism: Immunological characterization of ATPase subunits. *In* J Dainty, MI DeMichelis, E Marré, F Rasi-Caldogno, eds, *Plants and Membrane Transport*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, New York, Oxford, S. 149-154
- Hemalatha KP und Prasad DS** (2002) Purification, physicochemical properties, and subcellular location of alkaline inorganic pyrophosphatase from sesame (*Sesamum indicum* L.) cotyledons. *Biochem Cell Biol* **80**: 215-224
- Hesse H und Willmitzer L** (1996) Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* **30**: 863-872
- Ho K-K** (1984) Inorganic pyrophosphatase from *Spirulina maxima*. *Plant Cell Physiol* **25**: 851-854

- Hoekema A, Hirsh P, Hooykaas PJ, Schilperoort R** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- Höfgen R und Willmitzer L** (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci* **66**: 221-230
- Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K, Schell J** (2001) Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *Plant J* **28**: 483-491
- Jacob J-L, Prevot J-C, Clement-Vidal A, d'Auzac J** (1989) Inorganic pyrophosphate metabolism in *Hevea brasiliensis* latex. Characteristics of cytosolic alkaline inorganic pyrophosphatase. *Plant Physiol Biochem* **27**: 355-364
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D** (1986) Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8447-8451
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezaei MR, Stitt M** (1992) Inorganic pyrophosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta* **188**: 238-244
- Kammerer B, Fischer K, Hilpert B, Schubert S, Gutensohn M, Weber A, Flügge U-I** (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**: 105-117
- Kankare J, Salminen T, Lahti R, Cooperman BS, Baykov AA, Goldman A** (1996) Crystallographic identification of metal-binding sites in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* **35**: 4670-4677
- Ke D, Yahia E, Hess B, Zhou L, Kader AA** (1995) Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. *J Am Soc Hortic Sci* **120**: 481-490
- Kieber JJ und Signer ER** (1991) Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **16**: 345-348
- Kim EJ, Zhen RG, Rea PA** (1994) Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6128-6132
- Kim Y, Kim EJ, Rea PA** (1994) Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **106**: 375-382
- Klemme B und Jacobi G** (1974) Separation and characterization of two inorganic pyrophosphatases from spinach leaves. *Planta* **120**: 147-153
- Kombrink E, Kruger NJ, Beevers H** (1984) Kinetic properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* **74**: 395-401
- Kornberg A** (1962) On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In M Kasha, E Pullman, eds, *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York, S. 251-287
- Kozak M** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**: 19867-19870

- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lahti R, Pitkaranta T, Valve E, Ilta I, Kukko-Kalske E, Heinonen J** (1988) Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**: 5901-5907
- Lambert SM und Watters JI** (1957) The complexes of magnesium ion with pyrophosphate and triphosphate ions. *J Am Chem Soc* **79**: 5606-5608
- Lehr A, Kirsch M, Viereck R, Schiemann J, Rausch T** (1999) cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol Biol* **39**: 463-475
- Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U** (1995) Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* **7**: 259-270
- Lerchl J, König S, Zrenner R, Sonnewald U** (1995) Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Mol Biol* **29**: 833-840
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- London WP und Steck TL** (1969) Kinetics of enzyme reactions with interaction between a substrate and a (metal) modifier. *Biochemistry* **8**: 1767-1779
- Löw R und Rausch T** (1996) Nonradioactive detection of nucleic acids with biotinylated probes. *In* T Meier, F Fahrenholz, eds, *Biomethods; A laboratory guide to biotin-labelling in biomolecule analysis*. Birkhäuser Verlag, Basel, S. 201-213
- Lyons JM und Raison JK** (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol* **45**: 386-389
- Maeshima M** (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 37-51
- Maeshima M und Yoshida S** (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J Biol Chem* **264**: 20068-20073
- Magness JR** (1920) Composition of gases in intercellular spaces of apples and potatoes. *Bot Gaz* **70**: 308-316
- Matsuoka K, Higuchi T, Maeshima M, Nakamura K** (1997) A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* **9**: 533-546
- Mertens E, Larondelle Y, Hers H-G** (1990) Induction of pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiol* **93**: 584-587
- Meyer W, Moll R, Kath T, Schäfer G** (1995) Purification, cloning and sequencing of archaeobacterial pyrophosphatase from the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Arch Biochem Biophys* **319**: 149-156



- Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH** (2001) Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* **488**: 29-33
- Mitsuda N, Takeyasu K, Sato MH** (2001) Pollen-specific regulation of vacuolar H<sup>+</sup>-PPase expression by multiple cis-acting elements. *Plant Mol Biol* **46**: 185-192
- Moes DS** (2002) Pyrophosphatasen aus *Beta vulgaris*: Promotoranalysen und Überexpression. Diplomarbeit. Universität Heidelberg
- Mohanty B, Wilson PM, ap Rees T** (1993) Effects of anoxia on growth and carbohydrate metabolism in suspension cultures of soybean and rice. *Phytochemistry* **34**: 75-82
- Mortain-Bertrand A, El Amrani A, Davail S, Rey P, Suire C, Lamant A** (1996) Purification and characterization of the plastidial inorganic pyrophosphatase from *Dunaliella salina*. *Plant Physiol Biochem* **34**: 343-352
- Mortain-Bertrand A, Uteau F, Enault N, d'Harlingue A, Schaeffer J, Lamant A** (1992) Characterization of alkaline inorganic pyrophosphatase from *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant Physiol Biochem* **30**: 779-788
- Münch E** (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer Verlag, Jena
- Murray MG und Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Nakanishi Y und Maeshima M** (1998) Molecular cloning of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiol* **116**: 589-597
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Eng* **10**: 1-6
- Ober E und Sharp R** (1996) A microsensor for direct measurements of O<sub>2</sub> partial pressure within plant tissues. *J Exp Bot* **47**
- Oberbeck K, Drucker M, Robinson DG** (1994) V-ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots. *J Exp Bot* **45**: 235-244
- Palmgren MG** (1990) An H<sup>+</sup>-ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol*. **94**: 882-886
- Perez-Castineira JR, Alvar J, Ruiz-Perez LM, Serrano A** (2002) Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 567-573
- Popov N, Schmitt M, Schulzek S, Matthies H** (1975) Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biol Med Ger* **34**: 1441-1446
- Pwee K-H und Ho K-K** (1995) Identification and characterisation of two isoforms of soluble alkaline inorganic pyrophosphatase from sugar cane leaves. *Plant Physiol Biochem* **33**: 39-46
- Rajagopal L, Clancy A, Rubens CE** (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem* **278**: 14429-14441

- Ratajczak R, Hinz G, Robinson DG** (1999) Localization of pyrophosphatase in membranes of cauliflower inflorescence cells. *Planta* **208**: 205-211
- Ratajczak R, Kemna I, Luetzge U** (1994) Characteristics, partial purification and reconstitution of the vacuolar malate transporter of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perrier de la Bathie. *Planta* **195**: 226-236
- Rojas-Beltran JA, Dubois F, Mortiaux F, Portetelle D, Gebhardt C, Sangwan RS, du Jardin P** (1999) Identification of cytosolic Mg<sup>2+</sup>-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis. *Plant Mol Biol* **39**: 449-461
- Rolletscheck H, Borisjuk L, Koschorreck M, Wobus U, Weber H** (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J Exp Bot* **53**: 1-9
- Rosenkranz H, Vogel R, Greiner S, Rausch T** (2001) In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *J Exp Bot* **52**: 2381-2385
- Rowntree EG und Kruger NJ** (1992) Inhibition of pyrophosphate:Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase by imidodiphosphate. *Plant Sci* **86**: 183-189
- Rudd JJ und Franklin-Tong VE** (2003) Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J Exp Bot* **54**: 141-148
- Salminen A, Parfenyev AN, Salli K, Efimova IS, Magretova NN, Goldman A, Baykov AA, Lahti R** (2002) Modulation of dimer stability in yeast pyrophosphatase by mutations at the subunit interface and ligand binding to the active site. *J Biol Chem* **277**: 15465-15471
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N** (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Particulate Science and Technology* **5**: 27-37
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA** (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1775-1779
- Sarafian V und Poole RJ** (1989) Purification of an H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuolar membranes of red beet. *Plant Physiol* **91**: 34-38
- Schirmer MC** (1998) Zur Expression der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase und H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in *Beta vulgaris* L. und *Nicotiana tabacum*: Auswirkungen von Wachstum, Verwundung und Transformation. Diplomarbeit. Universität Heidelberg
- Schneider K, Borchardt DC, Schäfer-Pregl R, Nagl N, Glass C, Jeppsson A, Gebhardt C, Salamini F** (1999) PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol Gen Genet* **262**: 515-524
- Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith DW** (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* **8**: 777-784
- Simmons S und Butler LG** (1969) Alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves. *Biochim Biophys Acta* **172**: 150-157
- Sivula T, Salminen A, Parfenyev AN, Pohjanjoki P, Goldman A, Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R** (1999) Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett* **454**: 75-80

- Sonnewald U** (1992) Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant J* **2**: 571-581
- Stein M und Willenbrink J** (1976) On accumulation of sucrose in the growing sugar beet. *Z Pflanzenphysiologie* **79**: 310-322
- Stitt M** (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot Acta* **111**: 167-175
- Takasu A, Nakanishi Y, Yamauchi T, Maeshima M** (1997) Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *J Biochem (Tokyo)* **122**: 883-889
- Takeshige K und Tazawa M** (1989) Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. *J Biol Chem* **264**: 3262-3266
- Theodorou ME, Cornel FA, Duff SM, Plaxton WC** (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J Biol Chem* **267**: 21901-21905
- Timmermans MCP, Maliga P, Vieira J, Messing J** (1990) The Pff plasmids cassettes utilizing CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J Biotechnol* **14**: 333-344
- Tsai CY, Salamini F, Nelson OE** (1970) Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol* **46**: 299-306
- Vainonen Iu P, Kurilova SA, Awaeva SM** (2002) Hexameric, trimeric, dimeric, and monomeric forms of inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*. *Bioorg Khim* **28**: 426-433
- van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P** (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* **131**: 1529-1543
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP** (2002) The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem* **277**: 2413-2418
- Viereck R, Kirsch M, Loew R, Rausch T** (1996) Down-regulation of plant V-type H<sup>+</sup>-ATPase genes after light-induced inhibition of growth. *FEBS Lett* **384**: 285-288
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ** (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* **13**: 385-398
- von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L** (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J* **9**: 3033-3044
- Wachter A, Steininger H, Rausch T, Bogs J** (2004) Compartmentation of GSH synthesis in plants: In *Arabidopsis thaliana* and in *Brassica juncea*,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GSH1), the key enzyme of glutathione synthesis, is exclusively localized in plastids. Submitted
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (1997) Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci* **2**: 169-174

- Weil M, Krausgrill S, Schuster A, Rausch T** (1994) A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* **193**: 438-445
- Weiner H, Stitt M, Heldt HW** (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* **893**: 13-21
- Willenbrink J, Doll S, Getz HP, Meyer S** (1984) Zuckeraufnahme in isolierten Vakuolen und Protoplasten aus dem Speichergewebe von Beta-Rüben. *Ber Deutsch Bot Ges* **97**: 27-39
- Willmitzer L, Depicker A, Dhaese P, De Greve H, Hernalsteens JP, Holsters M, Leemans J, Otten L, Schroder J, Schroder G, Zambryski P, van Montagu M, Schell J** (1983) The use of Ti-plasmids as plant-directed gene vectors. *Folia Biol (Praha)* **29**: 106-114
- Wobus U und Weber H** (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem* **380**: 937-944
- Yan TF und Tao M** (1984) Multiple forms of pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. Regulation by fructose 2,6- bisphosphate. *J Biol Chem* **259**: 5087-5092
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE** (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol* **116**: 1573-1583
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE** (1999) Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol* **121**: 599-608
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC** (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**: 3885-3895
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **7**: 97-107
- Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U** (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphoglucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense mRNA. *Planta* **190**: 247-252
- Zupan JR und Zambryski P** (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol* **107**: 1041-1047