

**Isoprenoidbiosynthese in mykorrhizierten Maiswurzeln: Klonierung,
Charakterisierung und Lokalisierung einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-
phosphat-Reduktoisomerase (DXR)**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grads

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

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

von Joachim Hans

geb. am 16.07.1971 in Ottweiler/Saar

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Strack
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. J. Gershenzon

Halle (Saale), den 24.02.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006323

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006323>]

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Zeitschriftenartikel:

Hans J., Hause B., Strack D., Walter M.H. (2004) Cloning, characterization and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) in arbuscule-containing cells of *Zea mays*. *Plant Physiology* **134**: 614-624

Vorträge:

Hans J. Transcript and protein accumulation of a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) in mycorrhizal maize roots. 4. Kurt-Mothes Workshop; 3.-5. Oktober 2002, Jena

Hans J. Isoprenoid biosynthesis in mycorrhizal maize roots: cloning, characterization and immunolocalization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. Institute of Biological Chemistry, Washington State University, 16. September 2003, Pullman WA, USA

Hans J. Characterization and localization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) in mycorrhizal maize roots. Centre for Forest Biology, University of Victoria, 18. September 2003, Victoria BC, Canada

Poster:

Hans, J., Strack, D., Walter, M.H. Characterization of a maize cDNA coding for a deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) and its induction in mycorrhizal roots. 5. Terpnet Meeting, 14.-16. März 2001, Bonn

Hans J., Strack D., Walter M.H. Isoprenoid biosynthesis in mycorrhizal maize roots: transcript and protein accumulation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR). 19th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology (ISCE), 3.-7. August 2002, Hamburg

Hans J., Strack D., Walter M.H. A mycorrhiza-induced deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from maize: cloning, heterologous expression and immunolocalization. Botanikertagung, 22.-27. September 2002, Freiburg

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Sekundärstoffwechsel unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Strack angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dieter Strack und Herrn Dr. Michael H. Walter danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die Betreuung der Arbeiten. Besonders hervorzuheben ist dabei die Förderung des selbständigen und eigenverantwortlichen Arbeitens.

Bei Frau Dr. Bettina Hause bedanke ich mich ganz herzlich für die sehr gründliche und engagierte Einarbeitung in zellbiologische Arbeitstechniken und für ihre große Geduld und ständige Hilfsbereitschaft beim Umgang mit dem Konfokalmikroskop.

Herrn Dr. Thomas Vogt danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie sowie die ständige Hilfsbereitschaft bei proteinbiochemischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Zimmer (Fraunhofer-Institut für atmosphärische Umweltforschung, Garmisch-Partenkirchen) für die Bereitstellung der DXS- und DXR-Klone aus *Synechococcus leopoliensis*, Herrn Prof. Dr. Meinhard H. Zenk (Biozentrum der Martin-Luther-Universität, Halle) für die Überlassung von [1,2]-¹⁴C₂-DXP als authentischen Standard, sowie Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) für die Bereitstellung von Fosmidomycin.

Judith Hans, Dr. Thomas Fester und Dr. Torsten Grothe danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen.

Bei Alexander Röhrig bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung und für die Durchführung von vielen Routinearbeiten.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Sekundärstoffwechsel, besonders Frau Kerstin Manke, möchte ich ganz herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danken.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1084 (Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen) durch die DFG finanziell unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die arbuskuläre Mykorrhiza.....	1
1.2	Apocarotinoidakkumulation in mykorrhizierten Wurzeln	3
1.3	Der Methylerythritolphosphatweg der Isoprenoidbiosynthese	5
1.4	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR).....	8
1.5	Zielstellung der Arbeit	9
2.	MATERIAL & METHODEN.....	11
2.1	Material	11
2.1.1	Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung	11
2.1.2	Bakterienstämme	11
2.1.3	Oligonukleotide.....	12
2.1.4	Vektoren	12
2.1.5	Chemikalien und Enzyme	12
2.1.6	Geräte	13
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	13
2.2.1.1	Isolierung von RNA	13
2.2.1.2	Isolierung von genomischer DNA.....	14
2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	14
2.2.1.4	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	14
2.2.2	Isolierung von cDNA-Klonen	15
2.2.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	15
2.2.3.1	Restriktionsanalysen.....	15
2.2.3.2	Ligationen.....	15
2.2.3.3	Radioaktive Markierung von DNA	16
2.2.3.4	Anhängen von 3'-A-Überhängen (A-tailing).....	16
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	16

2.2.4.1	Standard-PCR.....	16
2.2.4.2	PCR mit genomischer DNA.....	17
2.2.5	Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse.....	18
2.2.6	Extraktion von Proteinen.....	18
2.2.6.1	Herstellung von löslichen Proteinextrakten aus Bakterienkulturen.....	18
2.2.6.2	Extraktion der unlöslichen Proteinfraction aus <i>E. coli</i>	19
2.2.6.3	Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus pflanzlichen Geweben.....	19
2.2.7	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	19
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	20
2.2.9	Gelelektrophoresen.....	20
2.2.9.1	Elektrophorese von Nukleinsäuren.....	20
2.2.9.2	Elektrophorese von Proteinen.....	21
2.2.10	Blots.....	21
2.2.10.1	Blotten und Hybridisieren von Nukleinsäuren.....	21
2.2.10.2	Blotten und Detektion von Proteinen.....	22
2.2.11	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	23
2.2.11.1	Klonierung in pQE30.....	23
2.2.11.2	Expression der rekombinanten ZmDXR.....	24
2.2.11.3	Überexpression der rekombinanten ZmDXR.....	24
2.2.12	Aufreinigung von Proteinextrakten durch Metallaffinitäts-Chromatographie.....	24
2.2.12.1	Auftrennung löslicher Extrakte am Talon-Harz.....	24
2.2.12.2	Auftrennung der unlöslichen Fraktion an Ni-NTA-Agarose.....	25
2.2.13	Aktivitätstests mit der angereinigten rekombinanten ZmDXR.....	25
2.2.13.1	Substratherstellung.....	25
2.2.13.2	DXR-Enzymassays.....	26
2.2.14	Herstellung und Test eines polyklonalen Antiserums gegen ZmDXR.....	26
2.2.14.1	Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antiserums.....	26
2.2.14.2	Spezifitäts- und Sensitivitätstests.....	26
2.2.15	Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums.....	27
2.2.16	Immunlokalisation.....	27
2.2.16.1	Fixierung/Einbettung des Materials.....	27
2.2.16.2	Schneiden und Immunmarkierung.....	28
2.2.16.3	Gegenfärbungen der Schnitte.....	29
2.2.16.4	Analyse der Schnitte am Konfokalmikroskop und Bildverarbeitung.....	29

3.	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Klonierung einer DXR-cDNA aus Maiswurzeln	30
3.2	Heterologe Expression von ZmDXR in <i>E. coli</i>	34
3.2.1	Ermittlung der optimalen Induktionsbedingungen.....	35
3.2.2	Partielle Aufreinigung an Talon-Harz.....	36
3.2.3	Aktivitätstests	39
3.2.4	Anreinigung aus der unlöslichen Fraktion	40
3.2.5	Herstellung und Aufreinigung des polyklonalen Antiserums	42
3.3	Charakterisierung der Mais-DXR	46
3.3.1	Differentielle Transkriptakkumulation.....	46
3.3.2	Differentielle Akkumulation von DXR-Protein.....	47
3.3.3	Genomische DNA-Blot-Analyse.....	48
3.4	Immunlokalisierung der Mais-DXR in Wurzelkortexzellen.....	50
3.4.1	Etablierung der Markierungsbedingungen	50
3.4.2	Differentielle Lokalisation der Mais-DXR in kolonisierten und nichtkolonisierten Zellen	51
3.4.3	Färbung der pilzlichen Zellwand mit WGA-TRITC.....	52
3.4.4	Räumliche Rekonstruktion durch Projektion gestapelter optischer Schnitte	55
3.4.5	DXR-Akkumulation in Abhängigkeit vom arbuskulären Lebenszyklus	57
4.	DISKUSSION.....	61
4.1	Klonierung und molekulare Charakterisierung der Mais-DXR cDNA.....	61
4.2	Heterologe Expression der Mais-DXR cDNA	62
4.3	Regulation und genomische Organisation der frühen Schritte des MEP-Wegs.....	63
4.4	Lokalisation von DXR-Protein in Maiswurzeln.....	67
4.5	Korrelation zwischen Arbuskelentwicklung und DXR-Akkumulation	69
4.6	Rolle der DXR-Induktion und der Apocarotinoidakkumulation.....	70
4.7	Weiterführende Arbeiten.....	71

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6. SUMMARY	75
7. LITERATUR.....	77

Abkürzungen:

ABA	Abscisinsäure
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Coomassie Brilliantblau
CCD	Carotinoid-spaltende Dioxygenase
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Laserscanningmikroskop
cM	Centimorgan
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IgG ₁	Immunglobulin G ₁
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
K _i	inhibitorische Konstante
K _m	Michaelis-Menten Konstante
KP _i	Kaliumphosphatpuffer

MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDS	Phytoendesaturase
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIS	Präimmunserum
PVDF	Polyvinylidifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
STD	Plastidenimportsequenz (stroma targeting domain)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TC	Tentative Consensus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumeneinheiten

w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	Weizenkeimagglutinin
x g	Einheit der Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza

Die arbuskuläre Mykorrhiza ist eine der am weitesten verbreiteten mutualistischen Symbiosen im Pflanzenreich. Der Begriff Mykorrhiza (= Pilzwurzel) wurde von Frank (1885) für das Zusammenleben von Pilzen und Pflanzenwurzeln geprägt. Über 80 % aller rezenten Landpflanzen sind in der Lage, eine solche Verbindung mit Pilzen aus der Ordnung *Glomales* (*Zygomycota*; Morton & Benny, 1990) einzugehen. Im Gegensatz zum breiten pflanzlichen Wirtsspektrum ist die Anzahl der pilzlichen Mikrosymbionten eher gering: nur etwa 150 Arten aus der oben genannten Ordnung sind zur Ausbildung der Symbiose befähigt.

Beide Symbiosepartner profitieren von dem Zusammenleben. Der Hauptvorteil für Pflanze und Pilz liegt in der gegenseitigen Versorgung mit Nährstoffen (Smith & Read, 1997). So liefert der Pilz über sein ausgedehntes extraradikales Mycel vor allem mineralische Nährstoffe (insbesondere Phosphate), aber auch Wasser, an die Pflanze. Im Gegenzug wird er dafür mit photosynthetischen Kohlenhydraten in Form von Monosacchariden versorgt. Weitere Vorteile der Symbiose liegen in einer Mykorrhiza-vermittelten erhöhten Resistenz der Pflanze gegenüber Wurzelpathogenen (Cordier et al., 1998) oder Trockenstress (Augé, 2001). Die ökologische Fitness der Pflanze wird durch diese Symbiose generell erhöht.

Die arbuskuläre Mykorrhiza ist eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Symbiose. Dies ist durch fossile Hinweise auf Mykorrhiza-ähnliche Strukturen in Wurzeln von Pflanzen aus dem Ordoviciem (vor ca. 480-460 Mio. Jahren) belegt (Redecker et al., 2000). Es wird diskutiert, dass die Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza die dauerhafte Besiedlung des Festlandes durch Pflanzen überhaupt erst ermöglicht hat (Wilkinson, 2001). Ein weiteres Argument für das hohe Alter der Symbiose ist die Tatsache, dass die pilzlichen Mikrosymbionten sich zu obligat biotrophen Organismen entwickelt haben. Ohne einen pflanzlichen Partner sind die *Glomales* nicht in der Lage, ihren Lebenszyklus zu durchlaufen.

Die namensgebende Struktur der Symbiose ist die sog. Arbuskel („Bäumchen“), eine dichotom hochverzweigte pilzliche Struktur, die sich nach Durchdringen der pflanzlichen Zellwand in Wurzelcortezellen ausbildet (Abbildung 1.1). Die Wirtszelle bildet eine periarbuskuläre Membran aus, durch welche die pilzliche Struktur vom Protoplasten der Zelle getrennt bleibt. Zwischen Pilz und Pflanze entsteht somit ein neues apoplastisches Kompartiment, der periarbuskuläre Raum, der als Kontakt- und Austauschzone zwischen

beiden Partnern angesehen wird (Bonfante, 2001). Die Arbuskel ist der Ort des Nährstofftransports zwischen beiden Partnern, was zumindest für den Transport mineralischer Nährstoffe vom Pilz zur Pflanze nachgewiesen wurde (Harrison, 1999, Harrison et al., 2002).



Abbildung 1.1 Arbuskel von *Glomus mosseae* in einer Wurzelcortexzelle von *Allium porrum*. Abbildung aus Brundrett et al., 1984.

Arbuskeln sind dynamische Gebilde, die in relativ kurzen Zeitspannen entstehen und auch wieder abgebaut werden. Für Mais und andere Gräser wurde eine „Generationszeit“ von 7-10 Tagen ermittelt (Alexander et al., 1988). Die Kolonisierung durch den Pilz führt zu weitreichenden cytologischen Veränderungen in der Pflanzenzelle (Gianinazzi-Pearson, 1996). Der Zellkern wandert von einer randständigen in eine zentrale Position und zeigt Chromatindekondensation (Lingua et al., 2001). Die Vakuole fragmentiert und Organellen wie Plastiden und Mitochondrien proliferieren. Diese Veränderungen sind mit einer Umorganisation des Cytoskeletts der kolonisierten Zelle verbunden (Blancaflor et al., 2001), die auch mit einer verstärkten Transkriptionsaktivität für Cytoskelettkomponenten einhergeht (Bonfante et al., 1996). Chemische Signale und Komponenten, die bei der Ausbildung der Symbiose oder bei der Steuerung der komplexen Interaktion während der Kolonisierung einer Zelle durch den Pilz eine Rolle spielen, sind bislang unbekannt.

1.2 Apocarotinoidakkumulation in mykorrhizierten Wurzeln

Bereits seit längerer Zeit ist bekannt, dass Wurzeln bestimmter Pflanzen nach Kolonisierung durch AM-Pilze ein „gelbes Pigment“ enthalten (Abbildung 1.2; Jones, 1924). Erst 71 Jahre später gelang die Isolierung und Identifizierung der farbgebenden Komponente dieses Pigmentes (Klingner et al., 1995). Die als Mycorradicin bezeichnete Substanz ist in ihrer freien Form eine C₁₄-Dicarbonsäure mit einem konjugierten Doppelbindungssystem ([*] in Abbildung 1.3 B), die vermutlich durch oxidative Spaltung eines Carotinoids entsteht. Mycorradicin liegt in der Wurzel allerdings nicht frei, sondern in einer als „gelber Pigmentkomplex“ (Abbildung 1.3 A) bezeichneten Form vor (Fester et al., 2002a). Durch alkalische Hydrolyse lässt sich dieser Komplex in seine Komponenten zerlegen. Dabei finden sich neben Mycorradicin als Hauptkomponente weitere Verbindungen, wie Cyclohexenonderivate, die vermutlich über Zuckerreste mit dem Mycorradicin verestert sind.



Abbildung 1.2 Gelbfärbung von Maiswurzeln durch Mykorrhizierung. Sechs Wochen alte Maispflanzen zeigen nach Kolonisierung durch *Glomus intraradices* eine deutliche Gelbfärbung im Vergleich zu nichtkolonisierten Wurzeln; Abbildung aus Walter et al., 2000.

Zeitgleich mit der Identifizierung des Mycorradicins wurde die Mykorrhiza-spezifische Akkumulation von löslichen C₁₃-Cyclohexenonglycosiden ([1-6] in Abbildung 1.3) beschrieben (Maier et al., 1995). Diese ursprünglich als Sesquiterpene klassifizierten Verbindungen akkumulieren nach Mykorrhizierung in zahlreichen Species der Poaceae (Maier et al., 1997), sowie in Tabak (Maier et al., 1999) und Tomate (Maier et al., 2000).

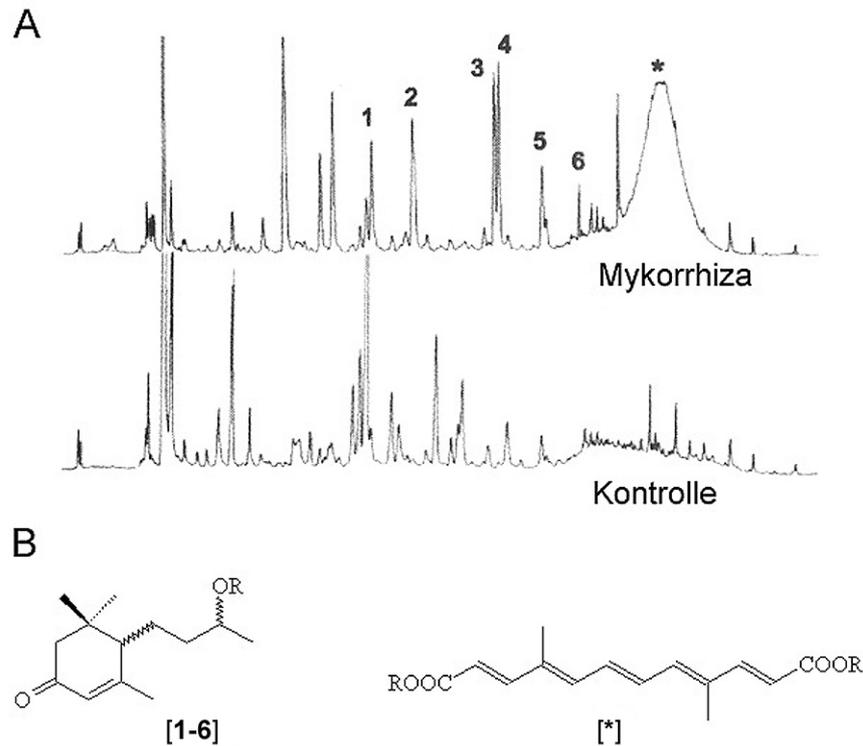


Abbildung 1.3 A: HPLC-Chromatogramme von Maiswurzelextrakten (80 % (v/v) Methanol); Detektion bei 244 nm. Abbildung verändert nach Walter et al. (2000). **B:** Strukturen der hauptsächlich akkumulierenden Verbindungen. [1-6]: Cyclohexenonderivate (R: Glycosylreste); [*]: Mycorradicin (Klingner et al., 1995), Hauptbestandteil des gelben Pigmentkomplexes; R:H (als freie Säure nach alkalischer Hydrolyse des Pigmentkomplexes).

Sowohl Mycorradicin als auch die Cyclohexenonderivate sind inzwischen als putative Apocarotinoide, d.h. als Abbauprodukte von Carotinoiden, beschrieben worden. Zum Beispiel sind die in mykorrhizierten Wurzeln akkumulierenden Cyclohexenonderivate (C_{13}) strukturell sehr eng mit Abscisinsäure (ABA, C_{15}), einem gut untersuchten Apocarotinoid, verwandt. ABA entsteht nach oxidativer Spaltung an der 11-12-Position von 9-*cis*-Violaxanthin. In Mais wird diese Reaktion von VP14, einer positions- und konfigurations-spezifischen Dioxygenase katalysiert, die nur Substrate mit 9-*cis*-Konfiguration akzeptiert (Schwartz et al., 1997).

Ausgehend von einem ähnlichen Biosyntheseschema für die Cyclohexenone müsste die oxidative Spaltung eines Carotinoide hier allerdings an der 9-10-Position erfolgen. Ein entsprechendes Enzym, das *trans*-konfigurierte Carotinoide in 9-10, 9'-10'-Position spaltet, wurde kürzlich aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und charakterisiert (Schwartz et al., 2001). Eine solche Umsetzung würde in ein von Walter et al. (2000) postuliertes hypothetisches Biosyntheseschema für die akkumulierenden Apocarotinoide passen (Abbildung 1.4). Für die Cyclohexenonderivate wurde durch Fütterungsversuche bereits gezeigt, dass

ihre Biosynthese über den Methylerythritolphosphat- (MEP-) Weg (s. 1.3) verläuft, womit Carotinoide als direkte Vorstufen wahrscheinlich sind (Maier et al., 1998).

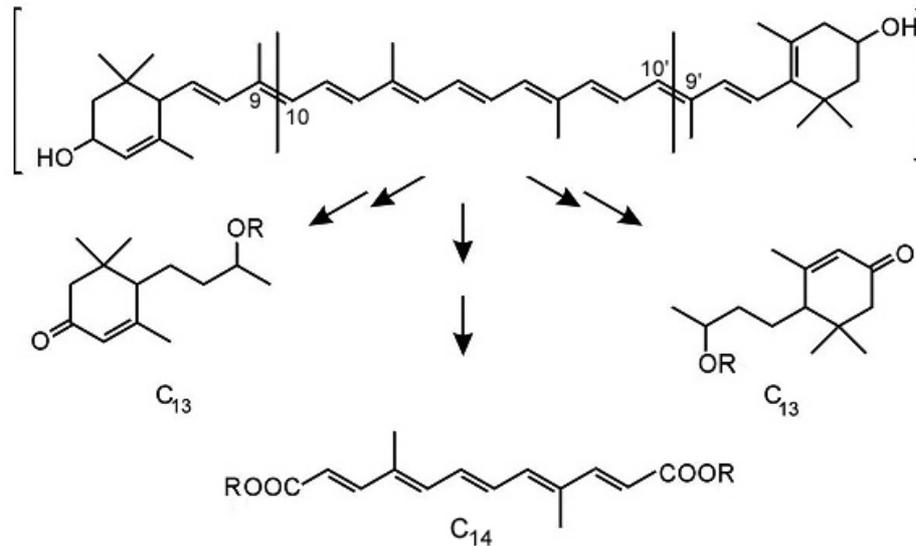


Abbildung 1.4 Hypothetisches Schema zur Biosynthese der akkumulierenden Apocarotinoide aus einem gemeinsamen Vorläufer. Die oxidative Spaltung eines Carotinoids an den Positionen 9-10 bzw. 9'-10' und anschließende Modifikationen könnten zur Entstehung der Cyclohexenone und des Mycorradicins führen.

1.3 Der Methylerythritolphosphatweg der Isoprenoidbiosynthese

Die in mykorrhizierten Maiswurzeln akkumulierenden Apocarotinoide sind, wie alle Terpene, aus den Grundbausteinen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut. Deren Biosynthese kann durch zwei unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen. Der klassische Mevalonat-Weg im Cytosol wurde lange Zeit als einziger Biosyntheseweg angesehen. Fütterungsversuche mit markierten Verbindungen ergaben jedoch Markierungsmuster in Terpenoiden, die sich mit dem Mevalonat-Weg nicht vereinbaren ließen (Rohmer et al., 1993; Schwarz, 1994). Diese und weitere Befunde führten schließlich zur Entdeckung eines alternativen Biosyntheseweges für IPP und DMAPP in Bakterien und Pflanzen, der heute nach seinem ersten spezifischen Intermediat als Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) bezeichnet wird. Dieser Stoffwechselweg ist in Pflanzen plastidenlokalisiert und alle plastidären Isoprenoide, wie Mono- und Diterpene, Carotinoide, Tocopherole, Plastochinone oder der Phytolrest der Chlorophylle, werden über diesen Weg synthetisiert (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001). Beide Stoffwechselwege arbeiten in Pflanzen parallel und können in gewissen Mengen auch Intermediate oder Endprodukte austauschen (Hemmerlin et al., 2003; Laule et al., 2003).

Während Pflanzen sowohl über den Mevalonatweg als auch über den MEP-Weg verfügen, scheint in den meisten Eubakterien ausschließlich der MEP-Weg aktiv zu sein. Tiere und Pilze hingegen verfügen, soweit bislang bekannt, nur über den Mevalonatweg. Die einzige bekannte Ausnahme bilden hier Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die ein grünes, plastidenähnliches Organell, den Apicoplasten, besitzen, in dem ebenfalls der MEP-Weg zur Isoprenoidbiosynthese abläuft (Jomaa et al., 1999).

Die Biosynthese von IPP und DMAPP über den MEP-Weg beginnt mit der Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat unter Abspaltung von CO₂ in einer Transketolase-ähnlichen Reaktion. Diese wird durch das thiaminabhängige Enzym 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) katalysiert (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998). Das gebildete Intermediat 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) ist nicht nur Vorstufe für IPP und DMAPP, sondern kann auch in die Biosynthese von Thiamin (Vitamin B₁) und Pyridoxol (Vitamin B₆) eingehen. Daher wird der nachfolgende Schritt des MEP-Wegs als der erste spezifische Schritt in Richtung Isoprenoide bezeichnet. DXP wird dabei in einer NADPH-abhängigen Reaktion reduziert und gleichzeitig durch intramolekulare Umlagerung zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) isomerisiert (Kuzuyama et al., 1998b; Takahashi et al., 1998; s. 1.4). Die weiteren Reaktionsschritte führen über eine Cytidylierung und anschließende Phosphorylierung und Abspaltung eines Cytidinmonophosphats zur Bildung einer ungewöhnlichen Cyclodiphosphatverbindung. Die Aufspaltung dieses Ringes liefert Hydroxymethylbutenyldiphosphat, das anschließend durch die IPP/DMAPP-Synthase in einem Schritt in beide Isoprenoidmonomere überführt wird (vgl. Abbildung 1.5). Die Aufklärung des gesamten Stoffwechselwegs in *Escherichia coli* gelang durch eine Kombination biochemischer und genomischer Techniken in einem sehr kurzem Zeitraum (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). Orthologe der Gene aller am Stoffwechselweg in *E. coli* beteiligten Enzyme lassen sich in den Organismen finden, die über einen MEP-Weg verfügen.

1.4 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR)

Wie oben beschrieben, stellt der zweite Reaktionsschritt des MEP-Wegs die erste spezifische Umsetzung der Isoprenoidbiosynthese dar. Katalysiert wird die Reduktion und intramolekulare Umlagerung von DXP zu MEP durch die DXR (EC 1.1.1.267). Die Identifizierung des *dxr*-Gens erfolgte zunächst in *E. coli* (Kuzuyama et al., 1998b; Takahashi et al., 1998). Inzwischen sind auch Kristallstrukturen des DXR-Proteins aus diesem Bakterium verfügbar (Reuter et al., 2002; Yajima et al., 2002). Zusammen mit Mutagenese-Experimenten (Kuzuyama et al., 2000) und mechanistischen Untersuchungen (Radykewicz et al., 2000; Hoeffler et al., 2002) bilden diese Strukturen die Grundlage für die Analyse des komplexen Reaktionsmechanismus des Enzyms, der bislang nicht zweifelsfrei belegt werden konnte. Das Enzym zeigt eine Abhängigkeit von NADPH, die Affinität zum nichtphosphorylierten NADH ist deutlich geringer. Weiterhin sind divalente Kationen für die Reaktion essentiell; dabei ist Mangan der bevorzugte Cofaktor.

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung der DXR-Reaktion sowie des kompletten MEP-Wegs ist der spezifische Inhibitor Fosmidomycin (Abbildung 1.6; Kuzuyama et al., 1998a), ein Struktur analogon eines postulierten Intermediates in der Umsetzung von DXP zu MEP. Fosmidomycin hemmt die Reaktion in einer Mischung aus kompetitiver und nichtkompetitiver Inhibition mit einem berechneten K_i -Wert von 38 nM für das Enzym aus *E. coli*. Die Substanz ist auch pharmakologisch von großer Bedeutung. Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* besitzt ebenfalls den MEP-Weg zur Isoprenoidbiosynthese, während Menschen auf den Mevalonatweg beschränkt sind. Daher sind Inhibitoren des MEP-Wegs potentielle Kandidaten für Malariamedikamente. Fosmidomycin selbst wird bereits in klinischen Studien zur Malariabekämpfung eingesetzt und zeigt als Mischpräparat mit anderen Wirkstoffen gute Ergebnisse (Wiesner et al., 2003).

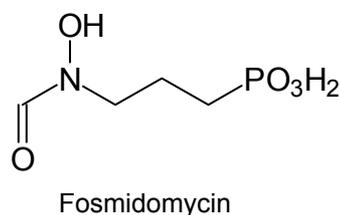


Abbildung 1.6 Struktur des spezifischen DXR-Inhibitors Fosmidomycin (nach Kuzuyama et al., 1998a).

Die von der DXR katalysierte Reaktion hat biochemisch nur eine Entsprechung in der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäure Valin. Dort setzt eine Reduktoisomerase 2-Acetolactat in 2,3-Dihydroxyisovalerat um. Auch diese Reaktion ist durch ein Struktur-

analogon eines Intermediates, 2-Oxo-3-hydroxyisovalerat, hemmbar (Kuzuyama et al., 1998a).

Neben bakteriellen *dxr*-Genen bzw. Enzymen ist inzwischen auch eine Reihe pflanzlicher Gene kloniert und teilweise charakterisiert. So wurden Gene bzw. cDNAs aus *Arabidopsis thaliana* (Schwender et al., 1999; Carretero-Paulet et al., 2002), *Mentha x piperita* (Lange & Croteau, 1999), *Catharanthus roseus* (Veau et al., 2000) und *Lycopersicon esculentum* (Rodríguez-Concepción et al., 2001) isoliert. Andere Klone stammen aus EST-Projekten, wie z.B. die DXR-Sequenz aus *Stevia rebaudiana* (Brandle et al., 2002).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die DXR-Reaktion stellt als erster spezifischer Biosyntheseschritt in Richtung IPP und DMAPP einen potentiellen Regulierungspunkt im frühen Isoprenoidstoffwechsel dar. Bislang sind nur einige wenige biologische Systeme auf entsprechende Regulationsmechanismen untersucht worden. Die dabei erzielten Ergebnisse ergeben jedoch kein einheitliches Bild. In *A. thaliana* ist die DXR offensichtlich einer direkten Lichtregulation unterworfen und zeigt außerdem entwicklungsabhängige Modulationen (Carretero-Paulet et al., 2002). In Zellkulturen von *C. roseus* ist eine starke Zunahme von *DXS*- und *DXR*-Transkripten nach Induktion der Produktion von Monoterpen-Indolalkaloiden zu beobachten (Veau et al., 2000). In einem transgenen Ansatz in *M. piperita* konnte durch Überexpression der homologen DXR eine Steigerung der Produktion von etherischen Ölen um etwa 50% erreicht werden, was auf eine geschwindigkeits- und durchsatzbegrenzende Rolle der DXR in diesem System hinweist (Mahmoud & Croteau, 2001). Im Gegensatz dazu konnte in *L. esculentum* selbst während der massiven Akkumulation von Carotinoiden im Verlauf der Fruchtreifung keine Induktion von DXR nachgewiesen werden (Rodríguez-Concepción et al., 2001).

Anfängliche Untersuchungen mit heterologen Sonden an Maiswurzeln zeigten eine Erhöhung der Transkriptmengen von *DXS* und *DXR*, die mit der Akkumulation der Apocarotinoide während der Mykorrhizierung einhergeht (Walter et al., 2000). Da die *DXS*-katalysierte Reaktion auch als Ausgangspunkt der Biosynthesen von Pyridoxol und Thiamin dient, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der genaueren Untersuchung der DXR, die den ersten spezifischen Reaktionsschritt in Richtung IPP und DMAPP katalysiert. Ziel der Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung einer Mykorrhiza-induzierten DXR aus Maiswurzeln. Durch die Analyse der Regulation auf Transkript- und Proteinebene,

sowie der räumlichen Verteilung des DXR-Proteins in mykorrhizierten Maiswurzeln, sollten Erkenntnisse über Ort und Zeitpunkt der Isoprenoidbiosynthese und damit letztlich auch über mögliche Funktionen der akkumulierenden Metabolite oder ihrer Vorläufer in der Symbiose gewonnen werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung

Die hier beschriebenen Versuche wurden mit *Zea mays* L. cv. Garant bzw. *Zea mays* L. dwarf1 (Schneider et al., 1992) durchgeführt. Das Saatgut wurde von der hauseigenen Gärtnerei aus der eigenen Nachzucht zur Verfügung gestellt. Je 4 Maiskörner wurden in Blähton (LecaTon, 2-5 mm Partikelgröße, Fibo Exclay, Pinneberg) in Plastiktöpfen ausgelegt und zur Keimung gebracht. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einer Phytokammer bei 16 h Licht ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) und 20 °C. Die arbuskulären Mykorrhizapilze *Glomus intraradices* Schenk & Smith (Isolat 49, H. von Alten, Universität Hannover) und *Glomus mosseae* (Nicholson & Gerdemann) Gerd. & Trappe wurden an Lauchpflanzen (*Allium porrum* L.) vermehrt und standen als Inokula in Blähton zur Verfügung. Mykorrhizierungsansätze wurden durch Anzucht von Maispflanzen für mindestens 4 Wochen in einem Gemisch aus Inokulum und sterilem Blähton (1:9 bis 2:8 (v/v)) durchgeführt.

2.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2.1 listet die verwendeten Bakterienstämme auf. Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in Luria-Bertani-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37 °C, sofern nicht anders angegeben. Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zusatz des entsprechenden Antibiotikums.

Tabelle 2.1 Bakterienstämme, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

Stamm	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5 α (Clontech)	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , ($r_k^- m_k^+$), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, <i>thi-1</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$
<i>E.coli</i> XL1 Blue (Stratagene)	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ['] <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]
<i>E.coli</i> M15 [pREP4] (Qiagen)	Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺

2.1.3 Oligonukleotide

Für Sequenzierungsreaktionen bzw. PCR-Amplifikationen benötigte Oligonukleotide wurden von den Firmen TopLab (Martinsried), Medigenomix (Martinsried), bzw. MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.1.4 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

pBlueScript[®] S/K (+/-) (Stratagene, LaJolla CA, USA): Ein ca. 2,9 kb großes Klonierungsphagemid, das bei der „in vivo excision“ der λ -ZAP-Phagen einer cDNA-Bank entsteht. Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz und ermöglicht Blau-/Weiß-Selektion durch α -Komplementierung des β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*).

pGEM[®] T Easy (Promega, Madison WI, USA): Ein 3 kb großes Klonierungsplasmid aus dem pGEM[®] T Easy-Klonierungskit. Es liegt im Kit als linearisiertes Plasmid mit 3'-T-Überhängen vor und kann somit zur T/A-Klonierung von PCR-Produkten genutzt werden. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz und erlaubt Blau-/Weiß-Selektion.

pQE30-32 (Qiagen, Hilden): Ca. 3,5 kb große Expressionsplasmide für die heterologe rekombinante Proteinexpression in *E. coli*. Die multiple Klonierungsstelle wird flankiert von der kodierenden Sequenz für einen 6xHistidin-Tag (in 5'-Richtung), sowie vom t_0 -Terminator des Phagen λ . Das Plasmid vermittelt Ampicillin-Resistenz. Die einzelnen Vektoren unterscheiden sich jeweils um eine Base vor der multiplen Klonierungsstelle, was eine Auswahl des passenden Vektors für die Klonierung im Leserahmen des His-Tags erlaubt.

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma und Merck bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, von Roche (Mannheim) bzw. von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert.

Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

2.1.6 Geräte

Sofern nicht gesondert aufgeführt, kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Zentrifugen:	Eppendorf 5417R-Tischzentrifuge Sorvall Super T21 (Kendro) Hettich Universal 30 RF
Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient
Elektrophoresen:	Hoefer Mighty Small II SE250 MBT20EL, MBT30EL (MicroBioTecBrand)
Geldokumentationssystem:	GelPrint 2000i (MWG-Biotech, Ebersberg)
Phosphor Imager:	Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA)
Ultraschall:	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Blotkammer:	Mini-PROTEAN II (BioRAD, München)
Spektrophotometer:	Beckman DU 640 GeneQuantPro (Amersham, Freiburg)
Mikrotom:	HM335E (Microm, Walldorf)
Mikroskop:	Zeiss LSM 410, Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus *Z. mays* wurde nach einer Guanidinthiocyanat-Methode isoliert. In flüssigem Stickstoff gemörsertes Gewebe wurde in Extraktionspuffer suspendiert [4 M Guanidinthiocyanat, 20 mM EDTA, 20 mM MES, 0.5 % (w/v) N-Laurylsarcosin, 5 % (w/v) PVPP, 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 7,0] und anschließend mit Phenol-Chloroform extrahiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (15 min 17.000 x g bei RT) wurden die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/20 Vol. 1M Essigsäure und 0,7 Vol. Ethanol (auf -20 °C vorgekühlt) präzipitiert. Das Nukleinsäurepellet wurde nach einem Waschschrift mit 3 M Kaliumacetat, pH 4,8, in sterilem H₂O resuspendiert und die enthaltene RNA in 2 M LiCl über Nacht selektiv ausgefällt. Das RNA-Pellet wurde erneut mit 2 M LiCl gewaschen und in sterilem H₂O aufgenommen. Nach photometri-

scher Quantifizierung und Qualitätskontrolle auf einem 1 % (w/v)-Agarosegel wurde die isolierte RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.2 *Isolierung von genomischer DNA*

Genomische DNA von *Z. mays* wurde aus jungen Blättern isoliert. Unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Material wurde in Extraktionspuffer [100 mM TrisHCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1,5 % (w/v) SDS, 10 mM 2-Mercaptoethanol] resuspendiert und 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zugabe von 3 M Kaliumacetat, pH 5,2, wurde 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit 23.000 x g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterworfen. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min 17.000 x g) wurde die DNA mit Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Das erhaltene Pellet wurde gewaschen, getrocknet und anschließend in 5 mM TrisHCl, pH 8,5, mit $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ RNaseA resuspendiert. Die isolierte DNA wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Alternativ zur oben beschriebenen Methode kam das Qiagen DNeasy Mini- bzw. Midi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller zum Einsatz.

2.2.1.3 *Isolierung von Plasmid-DNA*

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Suspensionskulturen wurde mit dem Nucleospin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) isoliert. Es kamen die mitgelieferten Puffer und Lösungen des Herstellers zum Einsatz. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt dabei prinzipiell durch Bindung an eine Kieselgelmatrix in Spinsäulchen.

2.2.1.4 *Isolation von DNA aus Agarosegelen*

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde auf einem UV-Leuchttisch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QiaExII-Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert. Die Quantifizierung der eluierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung und Vergleich der Bandenintensität mit dem mitgeführten Größenmarker (SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Belgien).

2.2.2 Isolierung von cDNA-Klonen

Eine λ -ZAP cDNA-Bank (Stratagene, LaJolla CA, USA) aus mykorrhizierten Maiswurzeln (*Z. mays dwarf1*) stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Für den Primärscreen wurden ca. 360.000 Klone dieser Bank nach Herstellerangaben ausplattiert und auf Amersham Hybond-Nylonrundfilter (Durchmesser 100 mm) übertragen. Die Filter wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) weiterbehandelt und die DNA durch UV-Crosslinken (UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene), 120 mJ Energieleistung) fixiert. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiven DNA-Sonde (s. 2.2.10.1) wurde unspezifisch gebundene Radioaktivität durch zwei Waschschriffe mit 2 x SSC [SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0], 0,1 % (w/v) SDS bei 60 °C entfernt; anschließend wurden die Filter mit Röntgenfilm (Amersham) bei -80 °C in einer lichtdichten Kassette mit Verstärkerfolie exponiert. Nach Filmentwicklung konnten die Phagen mit positivem Signal (Primärklone) identifiziert und isoliert werden. Sie wurden aus den Platten ausgestochen, in 0,5 ml SM-Puffer [50 mM TrisHCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01 % (w/v) Gelatine] suspendiert und erneut ausplattiert. Der zweite Isolierungsschritt verlief analog zum ersten, jedoch wurden hier kleine Petrischalen (82 mm) und die entsprechend kleineren Nylonfilter verwendet. Die so isolierten Sekundärklone wurden gemäß der Stratagene-Anleitung durch *in vivo excision* in pBlueScript-Phagemide überführt und durch Restriktionsanalysen und Teilsequenzierungen charakterisiert.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Restriktionsanalysen

Für Restriktionsanalysen wurden 0,5-1 μ g DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 μ l eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei der angegebenen optimalen Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms. Bei präparativen Verdaus wurden entsprechend größere Mengen DNA eingesetzt (2-5 μ g).

Restriktionsverdaus mit genomischer DNA wurden über Nacht durchgeführt. 10 μ g DNA wurden mit 50 U des jeweiligen Enzyms inkubiert.

2.2.3.2 Ligationen

Ligationen wurden entweder mit der im pGEM® T Easy-Kit (Promega) enthaltenen T4 Ligase oder mit einer T4 Ligase von Roche (Mannheim) durchgeführt. Ein typischer Liga-

tionsansatz wurde in einem Endvolumen von 10 μ l mit 2-10 U Ligase (je nach verwendetem Enzym) über Nacht bei 14 °C durchgeführt.

2.2.3.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Molekülen, die als Sonden in Hybridisierungsexperimenten verwendet wurden, erfolgte mit dem MegaPrime™-Kit der Firma Amersham (Freiburg). 20 ng des DNA-Fragments wurden dabei nach Anlagerung von Hexanukleotiden als Zufallsprimer durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit α -³²P-dATP (3000 Ci/mmol, ICN, Eschwege) markiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 10 min. Die radioaktive Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.3.4 Anhängen von 3'-A-Überhängen (A-tailing)

Um DNA-Fragmente mit glatten Enden (z.B. nach Amplifikation mit *Pfu*-DNA-Polymerase) in den pGEM® T Easy-Vektor ligieren zu können, müssen diesen Fragmenten zunächst 3'-A-Überhänge angefügt werden, die dann komplementär zu den 3'-T-Überhängen des Vektors sind. Dazu wurden Aliquots der entsprechenden Fragmente mit 0,2 mM ATP und 5 U *Taq* DNA-Polymerase (Qbiogene, Heidelberg) für 30 min bei 70 °C inkubiert. Danach konnten die Fragmente für die unter 2.2.3.2 beschriebenen Ligationsreaktionen verwendet werden.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.4.1 Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Technik zur gezielten Amplifikation eines DNA-Fragments mittels zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Ein Prozess bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation wird 25-30 mal zyklisch durchlaufen. Im Standardansatz (Endvolumen 50 μ l) wurden 0,1-50 ng DNA-Matrize mit jeweils 100 pg der spezifischen Primer im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2 Generelles Schema für PCR-Programme. Die Annealingtemperatur in Schritt 3 liegt typischerweise 3-4 °C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer.

1	Initiale Denaturierung	1 – 5 min	95 °C
2	Denaturierung	30 – 45 sec	95 °C
3	Annealing	45 – 60 sec	Annealingtemperatur
4	Elongation	1 – 3 min	72 °C
5	20 – 35 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6	End-Elongation	5 – 15 min	72 °C
7	Abkühlen		4 °C

Als DNA-Polymerase wurde standardmäßig eine *Taq*-DNA Polymerase (Qbiogene) eingesetzt. Für Anwendungen, bei denen eine besonders geringe Fehlerrate der Amplifikation erforderlich war (z. B. Expressionsklonierungen), kam eine *Pfu*-DNA Polymerase (Promega) mit *proofreading*-Aktivität zum Einsatz.

2.2.4.2 PCR mit genomischer DNA

Zur Amplifikation eines genomischen *DXR*-Fragments aus Mais wurde eine spezielle Touchdown-PCR verwendet. Das verwendete Programm ist im folgenden dargestellt (Tabelle 2.3). Die PCR wurde mit genomischer DNA von Mais (s. 2.2.1.2) als Matrize durchgeführt. Als DNA-Polymerase kam ein Mix aus 2,5 U *Taq* DNA Polymerase (Qbiogene) und 1,5 U *Pfu* DNA-Polymerase (Promega) zum Einsatz. Die getesteten Primer sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.3 PCR-Programm zur Amplifikation eines genomischen *DXR*-Fragments. In Schritt 6 wird pro Zyklus die Temperatur um 0,5 °C abgesenkt.

1	Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2	Denaturierung	30 sec	94 °C
3	Annealing / Elongation	10 min	72 °C
4	10 Zyklen der Schritte 2 und 3		
5	Denaturierung	30 sec	94 °C
6	Annealing/Elongation	10 min	72 °C – 0,5 °C
7	35 Zyklen der Schritte 5 und 6		
8	End-Elongation	20 min	72 °C
9	Abkühlen		4 °C

Tabelle 2.4 Sequenzen der für die Klonierung des genomischen DXR-Fragments getesteten Primer. Die Bindungsstellen der jeweils mit 1 und 2 bezeichneten Primer liegen weiter außerhalb in der cDNA-Sequenz als die der mit 3 und 4 bezeichneten Oligonukleotide.

Primer	Sequenz (5' – 3')
DXRfw1	GTC GCC AGC ATC GCT TCC ACT TCG
DXRfw2	CAT CGC TTC CAC TTC GGT CTC AGC G
DXRfw3	CAG CGG CAA TTA CCA CAG CCT CC
DXRfw4	GGC AAT TAC CAC AGC CTC CCC AG
DXRre1	GCA TTT TAT TCA TGT GGA GGC CTG
DXRre2	GGA GGC CTG AAA ATT GAA CAT GG
DXRre3	AAC TCC TGC TGT ACA ACG TTG TC
DXRre4	CAC AAA CAC ATC ATA TCT TAG AAC TCC TGC

2.2.5 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die Firmen TopLab (Martinsried) bzw. Medigenomix (Martinsried). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen DNASTar LaserGene (DNASTar Inc., Madison WI, USA) und BioEdit (Hall, 1999) analysiert. Datenbankabfragen mit BLAST (Altschul et al., 1997) erfolgten über die Internetseite der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit den Standardeinstellungen des Programms. Die Vorhersage möglicher plastidärer Transitpeptide und ihrer wahrscheinlichen Prozessierungsstellen wurde mit ChloroP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson et al., 1999) durchgeführt.

2.2.6 Extraktion von Proteinen

2.2.6.1 Herstellung von löslichen Proteinextrakten aus Bakterienkulturen

Frisch geerntete bzw. pelletierte und bei -80 °C gelagerte Bakterienkulturen wurden in Extraktionspuffer [100 mM TrisHCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 2,5 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] resuspendiert. Dabei wurde ein Volumenverhältnis von ca. 1:50 bzw. 1:100 (bezogen auf das Originalkulturvolumen vor der Ernte) eingehalten. Die resuspendierten Zellen wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallaufschluss (3 x 45 sec 60 % Duty 65 % Po-

wer) auf Eis lysiert. Der durch Zentrifugation (23.000 x g bei 4 °C) gewonnene Überstand wurde als löslicher Rohextrakt verwendet.

2.2.6.2 *Extraktion der unlöslichen Proteinfraction aus E. coli*

Zur Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet bzw. der Rückstand nach der löslichen Proteinextraktion in einem denaturierenden Extraktionspuffer [8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM Imidazol, 0,2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0] resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (3 x 45 sec 60 % Duty 65 % Power) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min 20.000 x g bei RT) und der Überstand als denaturierter Extrakt verwendet.

2.2.6.3 *Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus pflanzlichen Geweben*

Pflanzliche Gesamtproteinextrakte für die SDS-PAGE bzw. Western-Blotanalyse wurden durch eine phenolische Extraktion (Meyer et al., 1988) gewonnen. In flüssigem Stickstoff gemörserteres Pflanzenmaterial wurde mit 3 ml Tris-gesättigtem Phenol (pH 8,0) und 3 ml Phenol-gesättigtem 10 mM TrisHCl, pH 8,0, resuspendiert und anschließend 30 min gerührt. Die Phasentrennung wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000 x g bei Raumtemperatur erreicht. Die wässrige Oberphase wurde samt Interphase verworfen. Anschließend wurde das Protein aus der Phenolphase durch Zugabe von 4 Vol. 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol ausgefällt (mindestens 4 h bei -20 °C). Das durch Zentrifugation (10 min 3000 x g 4 °C) erhaltene Pellet wurde dreimal mit 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde es in Probenpuffer [68 mM TrisHCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 0,7 M 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin] durch dreiminütiges Kochen gelöst.

2.2.7 **Aufkonzentrierung von Proteinlösungen**

Verdünnte Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit Amicon Ultra-4-Filtrationseinheiten (Ausschlußgröße 10.000 Da, Millipore, Schwalbach) aufkonzentriert. Verdünnte Proben für die SDS-PAGE wurden durch Bindung der Proteine an eine Matrix (StrataClean, Stratagene) und anschließende Elution durch SDS-PAGE-Probenpuffer aufkonzentriert (Ziegler et al., 1999)

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im allgemeinen nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Standard. Zwischen 5 und 20 µl der Probe wurden mit 1 ml Bradford-Lösung [0,065 % (w/v) Coomassie G-250 in 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) H₃PO₄] gemischt, und nach kurzer Inkubationszeit bei 595 nm photometrisch gegen einen entsprechenden Leerwert vermessen.

Der Proteingehalt SDS-haltiger Lösung wurde nach Esen (1978) bestimmt. Dazu wurden je 5 µl Proteinlösungen auf Filterscheiben FN7 getüpfelt, getrocknet und anschließend 20 min in Färbelösung [0,05 % (w/v) Coomassie G-250 in 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure] gefärbt. Die Filterscheiben wurden mehrmals in kochendem H₂O gewaschen. Anschließend wurde der Farbstoff durch Inkubation in 0,5 % (w/v) SDS eluiert und die Extinktion der Lösung bei 578 nm im Photometer bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Bezug der Messwerte auf den mitgeführten Standard (2 mg/ml BSA).

2.2.9 Gelelektrophoresen

2.2.9.1 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in 1 % (w/v) Agarosegelen in TBE-Puffer [0,45 M TrisHCl, pH 8,0, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA]. Der aufgeschmolzenen Gellösung wurde vor dem Gießen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10x Probenpuffer [20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF] versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80-120 V in TBE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem unter UV-Anregung fotografiert.

Zur Auftrennung von RNA kamen denaturierende Agarosegele zum Einsatz [1 % (w/v) Agarose in 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 0,74 % (v/v) Formaldehyd, pH 7,0]. Die RNA-Proben wurden vor der Beladung in 5x RNA-Ladepuffer [80 mM MOPS, 20 mM Natriumacetat, 8 mM EDTA, 2,6 % (v/v) Formaldehyd, 30 % (v/v) Formamid, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,0] mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und 5 min bei 65° C denaturiert.

2.2.9.2 *Elektrophorese von Proteinen*

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Die Herstellung der Gele erfolgte mit Hilfe der konzentrierten Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth), die 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid enthält. Sofern nicht anders angegeben, wurden 10 %-ige Gele verwendet.

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit Proteinprobenpuffer [0,125 M TrisHCl, pH 6,8, 5 mM EDTA, 15 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol] im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei konstant 25 mA Stromstärke.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder zum Blotten weiterverwendet (s. 2.2.10.2) oder mit Coomassie-Lösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] durch Kochen für 2-3 min in der Mikrowelle gefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrunds durch mehrmaliges Aufkochen in 7 % (v/v) Essigsäure wurden die Gele im Geldokumentationssystem unter Weißlicht fotografiert.

2.2.10 Blots

2.2.10.1 *Blotten und Hybridisieren von Nukleinsäuren*

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Amersham Hybond N) erfolgte nach einem Semi-Dry-Verfahren. Das Agarosegel wurde vor dem Blotten für 15 min mit 0,25 M HCl behandelt, mit Wasser gewaschen und anschließend denaturiert (15 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), neutralisiert (15 min in 0,5 M TrisHCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl) und abschließend kurz in 2 x SSC gewaschen. Das Blotten auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht mit 2 x SSC als Transferpuffer.

RNA wurde mit Hilfe eines inversen alkalischen Kapillarblots auf Hybond N-Membran transferiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel ohne weitere Vorbehandlung in den Blotaufbau eingebaut. Der RNA-Transfer erfolgte für ca. 2 h mit 10 mM NaOH; 5xSSC als Puffer.

Nach Abbau der Blots wurden die Nukleinsäuren durch UV-Crosslinken (UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) mit 120 mJ Energieleistung) auf den Membranen fixiert. Die Vorhybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei 60 °C in Hybridisierungspuffer [7 % (w/v) SDS, 250 mM NaPi, pH 7,0, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA]. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und bei 60 °C über Nacht hybridisiert.

Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch mehrfaches Waschen der Membran in absteigenden SSC-Konzentrationen bei 60-65 °C entfernt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms oder durch PhosphorImager-Detektion.

2.2.10.2 Blotten und Detektion von Proteinen

Elektrophoretisch getrennte Proteine wurden nach einem Nass-Blotverfahren auf PVDF- bzw. Nitrocellulosemembranen übertragen. Dazu wurden die SDS-PAGE-Gele kurz in Transfer-Puffer [Towbin-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH ca. 8,1–8,5; für PVDF mit 20 % (v/v) Methanol] gespült und anschließend zusammen mit der in Transferpuffer äquilibrierten Membran in die Blotkassette eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte für ca. 1 h bei konstant 100 V. Nach Ende des Transfers wurde das Gel zur Überprüfung der Bloteffizienz in Coomassie gefärbt. Die Membran wurde kurz in TBS [100 mM TrisHCl, pH 7,5, 150 mM NaCl] gespült und anschließend für 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (in 5 % (w/v) Trockenmilchpulver/TBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Die typischerweise verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper und ihre typischen Verdünnungen. Abweichungen sind im Text angegeben.

	Verdünnung
Primärantikörper	
Anti-His-Tag (monoklonal, aus Maus, Novagen)	1: 2000
Anti-ZmDXR (polyklonal, aus Kaninchen, Eurogentec)	1: 2000
Sekundärantikörper (AP-Konjugate)	
Anti-Maus-IgG ₁ -AP (Novagen)	1: 5000-1:10.000
Anti-Kaninchen-IgG ₁ -AP (Chemicon, Temecula CA, USA)	1: 3000-1:5000

Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS [TBS pH 7,5 mit 0,05 % (v/v) Tween-20] entfernt. Nach Spülen der Membran in TBS (3 x 5 min) wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 5 % (w/v) Trockenmilchpulver inkubiert (1 h bei RT). Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um Anti-IgG₁-Konjugate mit alkalischer Phosphatase (AP) zur enzymati-

schen kolorimetrischen Detektion. Nach erneutem Waschen mit TTBS (3 x 5min) wurde die Membran in TBS pH 9,5 inkubiert (2 x 5 min) und mit AP-Substratpuffer [TBS, pH 9,5, mit 50 mM MgCl₂] äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und 0,32 mg/ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in TE [10 mM TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA] bzw. Wasser gestoppt. Die Membran wurde dann in der Geldokumentation unter weißem Auflicht fotografiert bzw. direkt mit einem Scanner eingelesen.

2.2.11 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

2.2.11.1 Klonierung in pQE30

Zur bakteriellen Expression von ZmDXR wurde das pQE30-Vektorsystem (Qiagen) verwendet, welches die Sequenz für einen N-terminalen 6xHistidin-Tag (His-Tag) enthält. Der kodierende Teil der *ZmDXR33*-cDNA ohne das berechnete Transitpeptid wurde mit der Primerkombination KpnDXR/PstDXR mit Hilfe einer *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, so dass am 5'-Ende der Sequenz eine neue *KpnI*- und am 3'-Ende eine neue *PstI*-Schnittstelle angefügt wurden.

Tabelle 2.6 Sequenzen der Primer, die für die Amplifikation des kodierenden Teils der *ZmDXR33* cDNA eingesetzt wurden. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte kennzeichnen die neu eingefügten *KpnI*- bzw. *PstI*-Schnittstellen.

Primer	Sequenz (5' – 3')
KpnDXR	CAG <u>GTA CCC</u> AAC AGG CTC CAC C
PstDXR	CAC <u>TGC AGT</u> TAT GCA GGG ACA GG

Das resultierende Amplikon wurde nach Anhängen eines 3'-A-Überhangs (s. 2.2.3.4) in den Klonierungsvektor pGEM[®] T Easy (Promega, Madison WI, USA) kloniert. Die ligierten Vektoren wurden in *E. coli* DH5 α transformiert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Restriktionsverdau mit *KpnI* und *PstI* überprüft. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden aus dem Agarosegel isoliert (s. 2.2.1.4) und anschließend in den ebenfalls mit *KpnI* und *PstI* linearisierten Expressionvektor pQE30 ligiert. Die Klonierung in den korrekten Leserahmen hinter den N-terminalen His-Tag des Vektors wurde durch Ansequenzierung bes-

tätigt. Anschließend wurden die fertigen Expressionskonstrukte in den Expressionsstamm M15 [pREP4] (Qiagen) transformiert.

2.2.11.2 Expression der rekombinanten ZmDXR

3,6 Liter einer Kultur von *E. coli* M15 [pREP4] pQEdxr wurden bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht war. Nach Induktion der Expression durch 0,2 mM IPTG wurde die Kultur weitere 4,5 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Nach der Ernte der Bakterien (15 min 5000 x g bei 4 °C) wurden die Zellpellets in 72 ml Extraktionspuffer (s. 2.2.6.1) resuspendiert und die löslichen Proteine wie in 2.2.6.1 beschrieben extrahiert. Der so gewonnene lösliche Proteinextrakt wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.11.3 Überexpression der rekombinanten ZmDXR

Für die Überexpression der rekombinanten ZmDXR wurden 800 ml einer Kultur von *E. coli* M15 [pREP4] pQEdxr bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, und dann mit 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde weiter bei 37 °C über Nacht (16 h) geschüttelt, durch Zentrifugation geerntet (15 min 5000 x g 4 °C) und in denaturierendem Extraktionspuffer (s. 2.2.6.2) resuspendiert. Nach der Extraktion (Durchführung wie in 2.2.6.2 beschrieben) wurde die solubilisierete Proteinfraction bei RT gelagert.

2.2.12 Aufreinigung von Proteinextrakten durch Metallaffinitäts-Chromatographie

2.2.12.1 Auftrennung löslicher Extrakte am Talon-Harz

Lösliche bakterielle Proteinextrakte mit rekombinanter ZmDXR wurden mit 2 ml 50 % (v/v) Talon-Matrix (Clontech, Palo Alto CA, USA) gemischt, die zuvor in Extraktionspuffer (s. 2.2.6.1) äquilibriert worden war. Die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach mehrmaligem Spülen mit Extraktionspuffer wurde das Material komplett in eine 2 ml-Säule (Clontech) gepackt. Die Säule wurde mit Waschpuffer [100 mM TrisHCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] gespült. Anschließend wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer [100 mM TrisHCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 150 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] von der Säule eluiert.

2.2.12.2 Auftrennung der unlöslichen Fraktion an Ni-NTA-Agarose

Solubilisierete Extrakte der unlöslichen Proteinfraction wurden mit 2 ml einer 50 % (v/v) Suspension von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gemischt und über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung der kompletten Suspension in eine 2 ml-Säule wurde die Elution analog zu 2.2.12.1, jedoch unter denaturierenden Bedingungen, durchgeführt. Durch den Einsatz von Ni-NTA-Agarose waren höhere Konzentrationen an Imidazol für die Elution notwendig. Der Waschschrift wurde mit 30 mM durchgeführt, die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte mit 250 mM Imidazol in denaturierendem Puffer.

2.2.13 Aktivitätstests mit der angereinigten rekombinanten ZmDXR

2.2.13.1 Substratherstellung

DXP als spezifisches Substrat der DXR-Reaktion ist nicht kommerziell verfügbar. Daher wurde es in einem enzymatischen Produktionsassay aus den Vorstufen Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat mit einer angereinigten rekombinanten DXS aus *Synechococcus leopoliensis* (zur Verfügung gestellt von W. Zimmer, Garmisch-Partenkirchen) hergestellt. Die grundlegende Methode wurde von Miller et al. (2000) übernommen und adaptiert. 33 mM Fructose-1,6-diphosphat und 66 mM Pyruvat wurden mit 1 U Aldolase (Roche), 50 U Triosephosphat-Isomerase (Roche) und 25-50 µg *S. leopoliensis* DXS in Reaktionspuffer [100 mM KP_i , pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Thiamindiphosphat, 10 % (v/v) Glycerin] über Nacht bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min gestoppt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert (5 min 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde aliquotiert und direkt für DXR-Enzymtests eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Radioaktive Ansätze zur Abschätzung der Reaktionsausbeute wurden wie oben beschrieben durchgeführt; jedoch wurde zusätzlich [$2-^{14}C$]-Pyruvat (666 MBq/mmol, NEN Life Sciences, Boston, USA) eingesetzt. Pro Ansatz wurden 1,85 kBq Radioaktivität verwendet. Nach Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen wurden die Reaktionsprodukte durch Dünnschichtchromatographie getrennt [Silicagel 60 F₂₅₄ 20x20-Platten (Merck) mit n-Propanol:Ethylacetat:H₂O (6:1:3 (v/v)) als Laufmittel]. Nach Entwicklung und Trocknung der Platten wurde die Radioaktivität durch Exposition mit einem PhosphorImager Low Energy Screen visualisiert. Das Reaktionsprodukt DXP wurde durch Cochromatographie mit einem authentischen Standard ([1, 2- $^{14}C_2$]-DXP, 18,5 kBq in 6 µl; zur Verfügung ge-

stellt von M.H. Zenk, Biozentrum Halle) identifiziert. Die erzielten Ausbeuten lagen bei ca. 13-20 %.

2.2.13.2 DXR-Enzymassays

Fraktionen der Talonsäule, die entsprechende Mengen an rekombinanter ZmDXR aufwiesen, wurden für Tests auf DXR-Enzymaktivität eingesetzt. Die Assays wurden in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt (modifiziert, nach Miller et al., 2000). 20–50 µl einer Talonfraktion wurden mit 20 µl frisch hergestelltem DXP (s. 2.2.13.1) in einem Reaktionsmix [50 mM TrisHCl, pH 7,5, 1 mM MnCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol] inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 0,125 mM NADPH gestartet und an einem UV/VIS-Photometer (Beckmann DU 640) bei 340 nm über 5 min verfolgt. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm wurde zur Bestimmung der Reaktionsrate durch lineare Regression verwendet. Mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon_{340} = 0,0063 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnten Umsatzraten für NADPH und spezifische Enzymaktivitäten bestimmt werden.

2.2.14 Herstellung und Test eines polyklonalen Antiserums gegen ZmDXR

2.2.14.1 Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antiserums

Zur Gewinnung des Antigens für ein polyklonales Antiserum gegen die rekombinante ZmDXR wurden die Eluatfraktionen aus der Aufreinigung der unlöslichen Proteinfraction verwendet. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert (s. 2.2.7). Anschließend wurde das so gewonnene Antigen zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums in 2 Kaninchen verwendet (durch Firma Eurogentec, Seraing, Belgien). Es wurde eine mehrstufige Immunisierung der Tiere mit insgesamt 4 Boost-Injektionen über einen Zeitraum von 3 Monaten durchgeführt.

2.2.14.2 Spezifitäts- und Sensitivitätstests

Die während der Antiserumproduktion erhaltenen Testseren wurden mit Hilfe von Western Blot-Analysen (s. 2.2.10.2) auf ihre Spezifität hin überprüft. Zur Bestimmung der Sensitivität der Seren wurde eine Dot Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde eine serielle Verdünnung des angereinigten Antigens auf eine PVDF-Membran getüpfelt, die anschließend nach dem in 2.2.10.2 beschriebenen Verfahren weiterbehandelt wurde. Nach

dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurden die zu testenden Seren in Verdünnungen von 1: 1000 und 1: 2000 eingesetzt.

2.2.15 Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums

Die Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums wurde mit immobilisiertem Antigen nach einer Methode von T. Vogt (IPB Halle, pers. Mitteilung) durchgeführt. 70 µg des angereinigten rekombinanten Proteins wurden auf einem präparativen SDS-Page-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach dem Transfer wurde ein schmaler Streifen von der Membran abgeschnitten und mit einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nach teilweiser Entfärbung des Membranstreifens und Visualisierung der Proteinbande wurde die Region mit der Antigenbande aus der Membranfläche ausgeschnitten. Dieser Membranabschnitt wurde anschließend mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. 6 ml des rohen Antiserums wurden dann für mehrere Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln mit dem Membranstreifen inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit TBS wurden die spezifisch gebundenen Antikörper durch Inkubation mit 100 mM Glycin, pH 2,5, eluiert. Das Eluat wurde sofort durch Zugabe von 1 M Tris HCl, pH 8,0, neutralisiert, um eine Denaturierung der Antikörper zu vermeiden.

2.2.16 Immunlokalisation

2.2.16.1 Fixierung/Einbettung des Materials

Frisch geerntetes Wurzelmaterial von *Z. mays* wurde kurz in destilliertem Wasser gewaschen, sofort in Fixativ [3 % (w/v) Paraformaldehyd; 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS (135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,0)] überführt und in kleine Stücke geschnitten. Das Material wurde anschließend für 5-10 min im Exsikkator vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Proben für 2 h bei RT fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS (jeweils 15 min) wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe [jeweils 30 min 10 % (v/v), 30 % (v/v), 50 % (v/v), 70 % (v/v), 90 % (v/v) und 100 % (v/v) Ethanol] bei Raumtemperatur dehydratisiert. Alle weiteren Schritte wurden in einem Inkubationsschrank bei 55 °C durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation in 100 % (v/v) Ethanol wurde mit der Infiltrierung des Probenmaterials mit Polyethylengly-

col [PEG; Mischung aus PEG 1500 und PEG 4000 im Verhältnis 2:1 (w/w)] begonnen. Der Ablauf ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

Tabelle 2.7 Ablauf der Infiltration von fixiertem Wurzelmaterial mit PEG. Alle Schritte wurden bei 55 °C im Inkubationsschrank durchgeführt.

PEG : Ethanol (v/v)	Inkubationszeit bei 55 °C
1 : 3	1 h
1 : 1	1 h
3 : 1	1,5 h
reines PEG	2 h

Das Material wurde anschließend in Einbettungsformen überführt und in PEG eingebettet. Nach langsamer Abkühlung (über Nacht) wurden die Einbettungen aus den Formen gelöst und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.16.2 Schneiden und Immunmarkierung

Am Rotationsmikrotom wurden von den eingebetteten Proben 16–20 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden in Zellkultureinsätze mit 8 µm Nylonnetz (Nunc, Wiesbaden) überführt. Alle weiteren Schritte wurden in 24-well-Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Das Einbettungsmedium (PEG) wurde durch zweimaliges Waschen der Schnitte mit PBS entfernt. Anschließend wurden die pflanzlichen Zellwände durch eine 15-minütige Inkubation mit 1 % (w/v) Cellulase, 0,1 % (w/v) Pectolyase, 0,1 % (w/v) BSA in PBS verdaut. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit PBS wurden freie Aldehydgruppen durch Behandlung mit 0,1 M NH₄Cl in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 5 % (w/v) BSA in PBS. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper [Anti-6xHis-ZmDXR; 1:1000 in 5 % (w/v) BSA/PBS] inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % (w/v) BSA in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper [Anti-Kaninchen-IgG₁-Alexa488-Konjugat (MolecularProbes, Eugene OR, USA); 1:500 in 0,1 % (w/v) BSA/PBS] für 60 min bei 37 °C. Dieser und alle folgenden Schritte wurden unter Lichtabschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte entweder direkt auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger überführt und mit

SlowFade[®]-Antifading-Reagenz (Molecular Probes) eingedeckelt oder für Gegenfärbungen weiterverwendet.

2.2.16.3 Gegenfärbungen der Schnitte

Die immunmarkierten Schnitte wurden mit Weizenkeimagglutinin (WGA)-Konjugaten gefärbt, um pilzliche Strukturen innerhalb der Schnitte zu visualisieren (Harrison et al., 2002). Dazu wurden die Schnitte für 30 min bei RT in 0,05 mg/ml WGA-Tetramethylrhodaminisothiocyanat (WGA-TRITC, Molecular Probes) in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS folgte eine Gegenfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, 0,1 µg/ml in PBS) zur Sichtbarmachung von DNA. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS wurden die Schnitte auf Poly-L-Lysin-Objektträger überführt und mit SlowFade[®] Antifading Reagenz eingedeckelt.

2.2.16.4 Analyse der Schnitte am Konfokalmikroskop und Bildverarbeitung

Die immunmarkierten und gefärbten Schnitte wurden an einem Zeiss LSM 410 bzw. Zeiss LSM 510 Meta Konfokalmikroskop ausgewertet. Die Geräte wurden im Multitrack-Modus mit den in Tabelle 2.8 dargestellten Kanaleinstellungen betrieben

Tabelle 2.8 Kanaleinstellungen am LSM 410 bzw. LSM 510 Meta bei der Auswertung der immunmarkierten und gefärbten Wurzelschnitte. LP: Langpassfilter; BP: Bandpassfilter

Kanal	Anregungswellenlänge	Emissionsfilter	Fluoreszenzsignal
1	488 nm	BP505-530	Alexa488
2	543 nm	LP560	TRITC
3	350 nm	LP385	DAPI

Zur Analyse räumlicher Strukturen wurde am Mikroskop LSM 510 Meta die Möglichkeit der Erstellung von optischen Schnittserien in z-Richtung verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden Stapel von 25 einzelnen optischen Schnitten mit einem durchschnittlichen Abstand in z-Richtung von 0,5 µm zwischen den einzelnen Schnitten angefertigt.

Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Meta-Software sowie dem LSMIX-Programm (Zeiss). Die Projektionen der z-Serien wurden mit einem Projektionswinkel von 0-3° (in y-Richtung) zwischen den einzelnen optischen Schnitten berechnet. Weitergehende Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 5.5.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung einer DXR-cDNA aus Maiswurzeln

Ausgangsmaterial für die Klonierungsarbeiten war eine λ -ZAP cDNA-Bank aus mykorrhizierten Maiswurzeln (*Z. mays* dwarf1 kolonisiert mit *G. intraradices*). Ein Aliquot der Bank (ca. 360.000 Klone) wurde ausplattiert und die Phagen-DNA anschließend auf Nylonfilter übertragen. Als Sonde für die Hybridisierung kam ein 1,8 kb großes *NotI/SalI*-Fragment des *Oryza sativa*-EST-Klons S11168 (Genbank Nr. D46469, zur Verfügung gestellt von Dr. T. Sasaki, MAAF Genbank, Japan) zum Einsatz, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu bekannten pflanzlichen DXR-Sequenzen aufwies. Mittlerweile konnte durch Datenbankvergleiche sichergestellt werden, dass S11168 eine Teilsequenz der DXR aus *Oryza sativa* darstellt.

Nach zweistufiger Aufreinigung wurden 45 positive Klone isoliert und durch die sogenannte „in vivo excision“-Methode in pBlueScript-Phagemide überführt. Eine erste Charakterisierung der erhaltenen Klone erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI*, wobei idealerweise die komplette cDNA aus dem Plasmid herausgeschnitten wird. Dieser Verdau wurde zur Abschätzung der Größen der klonierten cDNAs eingesetzt. Die isolierten Klone zeigten eine Länge von etwa 1,7-1,9 kb. Weitere Restriktionsverdaus und Ansequenzierungen wurden durchgeführt, um grobe Kartierungen der Klone vorzunehmen. Dabei lieferte vor allem der Einsatz der Enzymkombination *BamHI/XhoI* Ergebnisse, die zur Klassifizierung der Klone in drei Hauptgruppen genutzt werden konnten. Die jeweils längsten Klone jeder Gruppe wurden komplett doppelsträngig sequenziert. Tabelle 3.1 zeigt die Haupteigenschaften der so erhaltenen Gruppen.

Die Klongruppen ZmDXR64 und ZmDXR88 weisen Sequenzinsertionen auf, die das durchgängige offene Leseraster an verschiedenen Stellen unterbrechen: bei ZmDXR64 liegt die Insertion an Position 1487–1592 der cDNA (106 bp), bei ZmDXR88 reicht sie von Position 450–498 (49 bp). Somit dürften die Klone beider Gruppen keine funktionellen DXR-Proteine kodieren. Abfragen der öffentlich zugänglichen Maisdatenbank (ZmDB, verfügbar unter <http://www.zmdb.iastate.edu/>; Dong et al., 2003) mit beiden Klonen lieferten nur Sequenzen als Ergebnis, die identisch mit Teilsequenzen von ZmDXR33 waren.

Tabelle 3.1 Eigenschaften der drei Gruppen DXR-ähnlicher Klone. Die Benennung der Gruppen erfolgt nach ihrem jeweils längsten Vertreter.

	ZmDXR33	ZmDXR64	ZmDXR88
Gesamtlänge (bp)	1678	1986	1918
interne <i>Bam</i> HI-Schnittstellen	1	2	2
Häufigkeit	67%	7,5%	15%
% Identität zu ZmDXR33 (auf Nukleinsäureebene)		85,5	81,7
5'-untranslatierter Bereich (bp)	112	171	169
ORF (bp)	1419	1299	321
abgeleitetes Protein (Aminosäurereste)	473	433	107

Unter den ca. 360.000 verfügbaren EST-Sequenzen (Stand Oktober 2003) konnten keine identifiziert werden, die ZmDXR64 bzw. -88 entsprechen. Weitergehende Analysen ergaben, dass die Insertion im cDNA-Klon ZmDXR88 mit großer Wahrscheinlichkeit von einem falsch gespleissten Intron herrührt: ein Vergleich mit einem genomischen Fragment aus Mais (Genbank Nr. AZ916496) ergab eine teilweise Übereinstimmung des Fragments mit der Insertion im cDNA-Klon. Für ZmDXR64 liegen bislang noch keine entsprechend verwertbaren genomischen Fragmente in der Datenbank vor. Deshalb wurden die weitergehenden Analysen und Arbeiten auf den Klon ZmDXR33 beschränkt.

Die vollständige Sequenz der ZmDXR33-cDNA hat eine Länge von 1678 bp (Abbildung 3.1). Nach einem untranslatierten 5'-Bereich von 112 bp ist ein durchgängiges offenes Leseraster von 1419 bp erkennbar, gefolgt von einer untranslatierten 3'-Region von 126 bp, die mit einem PolyA-Signal abschließt. Der offene Leseraster entspricht einem Protein mit 473 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 51,28 kDa und einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 6,7. Der cDNA-Klon ZmDXR33 wurde unter der Genbanknummer AJ297566 in die EMBL-Datenbank eingegeben.

Sequenzvergleiche der kompletten abgeleiteten Aminosäuresequenz von ZmDXR33 mit anderen pflanzlichen DXR-Sequenzen aus den Datenbanken ergaben sehr hohe Identitätswerte von bis zu 91,3 % für das komplette, unprozessierte Protein (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Identitätswerte für pflanzliche DXR-Sequenzen aus der Datenbank (Genbanknummern in Klammern). Angegeben ist die prozentuale Identität auf Aminosäureebene bezogen auf das von *ZmDXR33* abgeleitete Protein (ZmDXR). Die Werte für die reifen Proteine wurden ohne die berechneten Plastidenimportsequenzen ermittelt.

	komplettes Protein	reifes Protein
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AF148852)	82,8 %	89,7 %
<i>Artemisia annua</i> (AF182287)	76,2 %	84 %
<i>Catharanthus roseus</i> (AF250235)	81,3 %	89,3 %
<i>Hordeum vulgare</i> (AJ583446)	88 %	92,7 %
<i>Lycopersicon esculentum</i> (AF331705)	83,4 %	92,2 %
<i>Mentha x piperita</i> (AF116825)	74,1 %	81,4 %
<i>Oryza sativa</i> (AF367205)	91,3 %	95,2 %
<i>Stevia rebaudiana</i> (AJ429232)	77,4 %	85,8 %

Im ClustalW-Alignment fällt auf, dass die N-terminalen Domänen (ca. 50 Aminosäurereste) am wenigsten konserviert sind, während die restlichen Sequenzen eine hohe Übereinstimmung aufweisen (Abbildung 3.2). Da der komplette MEP-Weg in Pflanzen plastidenlokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die variablen N-terminalen Domänen der Proteine plastidäre Importsignale darstellen. Eine entsprechende Überprüfung der *ZmDXR*-Sequenz mit dem Programm ChloroP V1.1 ergab das Vorhandensein einer möglichen sogenannten „stroma targeting domain“ (STD) für den Plastidenimport (vgl. Abbildung 3.1). Die wahrscheinlichste Schnittstelle für eine plastidäre Signalpeptidase wurde von der Software zwischen den beiden Aminosäureresten C48 und C49 berechnet. Die potentielle Schnittstelle liegt damit genau N-terminal zu einem hochkonservierten CSX-Motiv (wobei X für M, A oder V stehen kann), das sich in allen bekannten pflanzlichen DXR-Sequenzen an der Nahtstelle zwischen STD und reifem Protein befindet (Carretero-Paulet et al., 2002). Das berechnete reife Protein von *ZmDXR* besteht demnach aus 423 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 45,85 kDa und einem berechneten pI von 5,6. Hydrophobizitätsanalysen nach Kyte & Doolittle (1982) mit Hilfe des Protpian-Moduls der DNASTar Lasergene-Software weisen es als lösliches Protein aus.

1 CCGTCGCCAGCATCGCTTCCACTTCGGTCTCAGCGACGGTCGCCACCACCGCTCCCCTCCCTCTCCCCCTCCTCGCCCAG

81 CGGCAATTACCACAGCCTCCCCAGCAAGCCGGGATGGCTGCACTCAAGGCATCGTTCCGGGGTGAGCTCAGCGCCGCTTC
M A A L K A S F R G E L S A A S

161 CTTCTCGACTCCAGCAGGGGACCTCTCGTCCAGCACAAAGTGGATTTTACGTTTCAAAGGAAGGGCAAACGAGCTATTT
F L D S S R G P L V Q H K V D F T F Q R K G K R A I

241 CACTGAGAAGGACATGCTGTTCTATGCAACAGGCTCCACCACCAGCATGGCCTGGGCGAGCTGTGCTGAGCCTGGCCGG
S L R R T C C S M Q Q A P P P A W P G R A V A E P G R

321 AGGTCATGGGATGGCCAAAGCCTATCTCGATTGTTGGTTCAACTGGTTCATAGGAACACAGACATTGGACATTGTTGC
R S W D G P K P I S I V G S T G S I G T Q T L D I V A

401 GGAGAATCCTGATAAGTTCAGAGTTGTTGCTCTTGCTGTGGATCCAATGTCACGCTTCTAGCTGATCAGGTCAAACAT
E N P D K F R V V A L A A G S N V T L L A D Q V K T

481 TCAAACCTAAGTTGGTTGCTGTAAGAAACGAATCATTAGTTGATGAATTGAAAGAAGCCTTGGCTGATTGCGAAGAGAAG
F K P K L V A V R N E S L V D E L K E A L A D C E E K

561 CCAGAAATATTCTGGGAGCAAGGTGTCATAGAAGTGTCTGCCATCCAGATGCAGTTACAGTTGTCCACAGGATAGT
P E I I P G E Q G V I E V A R H P D A V T V V T G I V

641 AGGTTGTGCAGGGCTGAAGCCTACAGTTGCTGCAATTGAAGCTGGTAAAGACATAGCATTGGCAAACAAAGAGACACTTA
G C A G L K P T V A A I E A G K D I A L A N K E T L

721 TTGCAAGTGGTCTTTTGTGCTTCCCCTGTCACACAAACACAAAGTGAATAATTCTCCAGCTGATTCTGAGCCTCTGCA
I A G G P F V L P L A H K H K V K I L P A D S E H S A

801 ATATTTCAAGTGTATACAAGGCTTGTCCGAAGGTGCACCTTCGTCGCATTATTCTAACTGCATCAGGTGGTGTCTTTCAGGGA
I F Q C I Q G L S E G A L R R I I L T A S G G A F R D

881 CTGGCCAGTTGACAGGCTGAAAGATGTAAGTGTCTGACGCTTTAAAGCATCAAACCTGGAATATGGGAAGGAAGATCA
W P V D R L K D V K V A D A L K H P N W N M G R K I

961 CAGTAGATTCTGCTACTTTTATTCAACAAGGGTTTAGAAGTTATTGAAGCACATTATTTATTTGGTGTGTAATATGATGAC
T V D S A T L F N K G L E V I E A H Y L F G A E Y D D

1041 ATTGAGATTGTGATTACCCACAGTCTATCATACACTCTATGGTTGAAACCCAGGATTCATCTGTCTTAGCTCAGTTGGG
I E I V I H P Q S I I H S M V E T Q D S S V L A Q L G

1121 ATGGCCAGATATGCGGTTACCAATCTTTATACACCTTATCATGGCCAGATAGAATCTATTGCTCTGAGGTACCTGGCCCC
W P D M R L P I L Y T L S W P D R I Y C S E V T W P

1201 GTCTGGATCTTTGCAAGTGGGTTCACTGACATTTCAGAGCTCCAGACAACGTAATAATCCCATCAATGGACCTAGCCTAT
R L D L C K L G S L T F R A P D N V K Y P S M D L A Y

1281 GCAGCTGGCCGCTGGGGCCACCATGACAGGAGTCTGAGCGCTGCTAATGAGAAGGCCGTGGAGTTGTTCAATTGACGA
A A G R A G G T M T G V L S A A N E K A V E L F I D E

1361 GAAGATTAGCTACCTGGACATATTCAAGGTGGTGGAGCTTACATGTAACGCGCATCGGAACGAGCTGGTAACAAGCCCGT
K I S Y L D I F K V V E L T C N A H R N E L V T S P

1441 CACTGGAGGAGATCGTCCATTACGATCTGTGGGCGAGGAGATAATGACCCAGTCTACAACCATCTTCTGGCCTGAGCCCT
S L E E I V H Y D L W A R R Y A A S L Q P S S G L S P

1521 GTCCCTGCATAATAGTTCGTCACGACAACGTTGTACAGCAGGAGTTCTAAGATATGATGTGTTTGTGGCTCCTGTTTCCA
V P A *

1601 TGTTCAATTTTCAGGCCTCCACATGAATAAAATGCATCTATTCCATGTGATTTCTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abbildung 3.1 Komplette Sequenz des cDNA-Klons ZmDXR33 mit konzeptioneller Translation. Die fett gedruckten Nukleotide kennzeichnen den durchgängigen offenen Leserahmen des Klons. Die putative Signalsequenz für den Plastidenimport ist unterstrichen.



Abbildung 3.2 Sequenzvergleich von ZmDXR mit pflanzlichen DXR-Sequenzen aus der Datenbank: *Arabidopsis thaliana* (At, Genbank Nr. AF148852), *Artemisia annua* (Aa, AF182287), *Catharanthus roseus* (Cr, AF250235), *Hordeum vulgare* (Hv, AJ583446), *Lycopersicon esculentum* (Le, AF331705), *Mentha x piperita* (Mp, AF116825), *Oryza sativa* (Os, AF367205), *Stevia rebaudiana* (Sr, AJ429232), *Zea mays* ZmDXR (Zm, diese Arbeit, AJ297566). Schwarz unterlegte Aminosäurereste sind in 80% der verglichenen Sequenzen konserviert. Der Stern (*) kennzeichnet die berechnete Schnittstelle der Signalpeptidase.

3.2 Heterologe Expression von ZmDXR in *E. coli*

Die Identifizierung des von ZmDXR33 abgeleiteten Proteins (ZmDXR) als mögliche DXR basierte zunächst einzig auf der hohen Identität der Aminosäuresequenz zu bekannten pflanzlichen DXRs. Deshalb war es notwendig, durch heterologe Expression des Klons die enzymatische Funktion zu zeigen. Dazu wurde das Fragment der cDNA, das für das putative reife Protein kodiert, mittels einer PCR-Reaktion mit *Pfu*-Polymerase und den Primern KpnDXR/PstDXR (s. Tabelle 2.6) amplifiziert. Nach A-tailing und Subklonierung in den pGEM-Vektor konnte das Fragment mit *KpnI* und *PstI* geschnitten werden und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Expressionsvektor pQE30 ligiert wer-

den. Nach Transformation in einen Klonierungsstamm wurden die Plasmide durch PCR und Restriktionsanalysen auf das Vorhandensein des Inserts überprüft und positive Klone anschließend in den Expressionsstamm M15 [pREP4] transformiert. Isolation von Plasmid-DNA und Restriktionsanalysen bestätigten das Vorhandensein des Expressionskonstrukts pQE30dxr.

3.2.1 Ermittlung der optimalen Induktionsbedingungen

Die Expression rekombinanter Proteine ist in dem System M15 [pREP4]/pQE mit Hilfe von IPTG induzierbar. IPTG ist ein nichtmetabolisierbares Analogon zu Galaktose, das den *lac*-Repressor bindet und somit die *lac*-Operator-Sequenzen auf dem Expressionsplasmid freigibt, d.h. theoretisch sollte nur bei Anwesenheit einer bestimmten Menge an Galaktose bzw. IPTG die Expression des heterologen Proteins erfolgen.

Außerdem ist die Expression des rekombinanten Proteins auch von äußeren Faktoren, insbesondere Kulturtemperatur und Dauer der Expression, abhängig. Diese Faktoren müssen von Fall zu Fall immer wieder neu empirisch bestimmt werden. Zur Ermittlung der optimalen Parameter für die heterologe Expression von ZmDXR33 wurden zwei Temperaturen (30 °C und 37 °C), sowie verschiedene IPTG-Konzentrationen (0, 0,2, 0,5 und 1 mM IPTG) bei einer Induktionsdauer von zunächst 5 Stunden getestet. Dazu wurden 5 ml-Kulturen angesetzt, aus denen nach der Induktionsphase die löslichen Proteine extrahiert wurden. Nach Auftrennung der Proteinextrakte auf einem SDS-PAGE-Gel und Blot auf PVDF-Membran wurde das rekombinante Protein durch einen monoklonalen Anti-His-Tag-Antikörper nachgewiesen. Bei einer Induktionstemperatur von 30 °C ist mehr His-Tag-Protein in der löslichen Fraktion nachweisbar als bei 37 °C (Abbildung 3.3). Für weitere Versuche wurde 0,5 mM IPTG als Induktorkonzentration ausgewählt. Um den Einfluß der Induktionsdauer auf die Mengen an rekombinantem Protein zu ermitteln, wurden Vergleiche zwischen einer fünfstündigen und einer Übernachtinduktion bei 30 °C mit den oben angegebenen IPTG-Mengen durchgeführt. Bei allen getesteten Übernachtansätzen waren jedoch nur Spuren von His-Tag-Protein in der löslichen Fraktion nachweisbar. Für die Reinigungsversuche mit 6xHis-ZmDXR wurde die Induktion deshalb für 5 Stunden bei 30 °C mit 0,5 mM IPTG als Induktor durchgeführt.

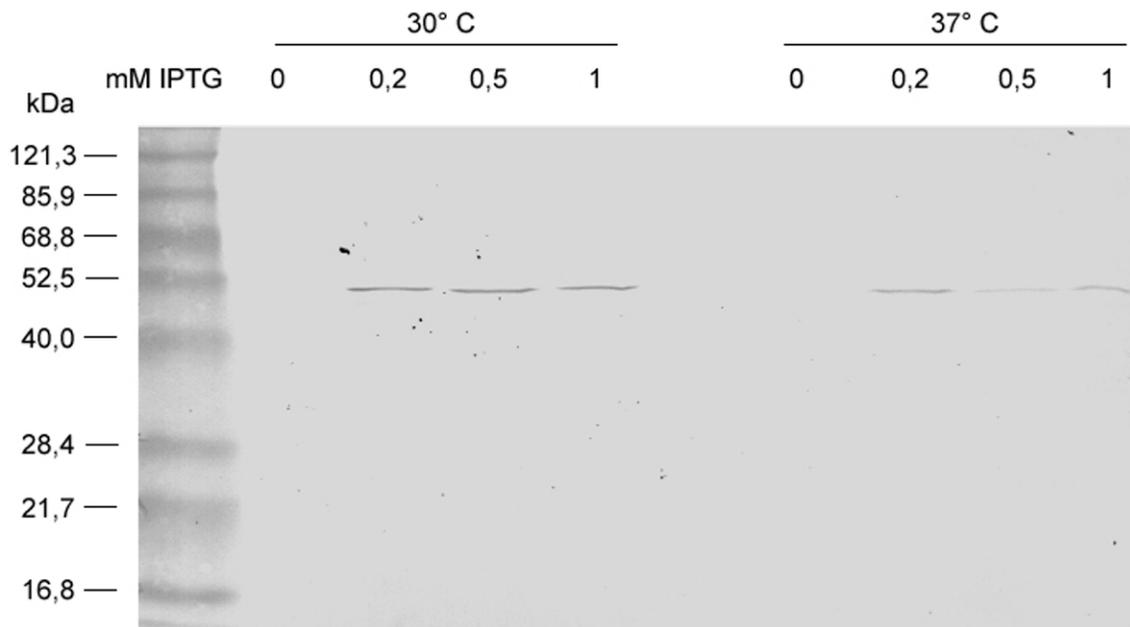


Abbildung 3.3 Test für optimale Expressionsbedingungen für ZmDXR. Western-Blot-Analyse mit 10 µg Protein/Spur; Blot auf PVDF-Membran; Primär-Antikörper: Anti-His-Tag 1:2000; Sekundär-Antikörper: Anti-Maus-IgG₁-AP 1:5000.

3.2.2 Partielle Aufreinigung an Talon-Harz

Zur Aufreinigung der rekombinanten ZmDXR wurden 3,6 Liter *E. coli* M15 [pREP4] pQEdxr-Kultur für 5 h bei 30 °C mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach Zellaufschluss und löslicher Extraktion wurden 235 mg Gesamtprotein mittels Metallaffinitätschromatographie an Talon-Harz aufgetrennt. Dabei wurden die ersten Spülschritte (2,5 mM Imidazol) im Batch-Verfahren durchgeführt. Anschließend wurde das Material in eine 2 ml-Säule überführt und 2 ml-Fractionen gesammelt. Deutlich erkennbar ist der typische dreistufige Verlauf der Proteinelution von den Metallaffinitätsmatrizes (Abbildung 3.4). Nach dem Durchlauf von nicht gebundenem Protein wurde durch eine leichte Erhöhung der Imidazolkonzentration unspezifisch oder nur locker gebundenes Protein abgewaschen. In dieser Reinigung wurden in den Waschfraktionen die höchsten Proteinkonzentrationen bestimmt. Abschließend wird durch Einsatz einer hohen Imidazolkonzentration (150 mM) oder alternativ durch Absenken des pH-Werts im Elutionspuffer das rekombinante Protein spezifisch eluiert.

Repräsentative Fractionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein der rekombinanten ZmDXR untersucht. Im relevanten Molekulargewichtsbereich (berechnete Größe der rekombinanten ZmDXR: 48,1 kDa) ist dabei eine schwache Bande erkennbar, die dem Protein entsprechen könnte (Abbildung

3.5). Jedoch sind noch viele Verunreinigungen erkennbar, insbesondere eine starke Bande bei ca. 60 kDa, die in allen Wasch- und Elutionsfraktionen sichtbar bleibt.

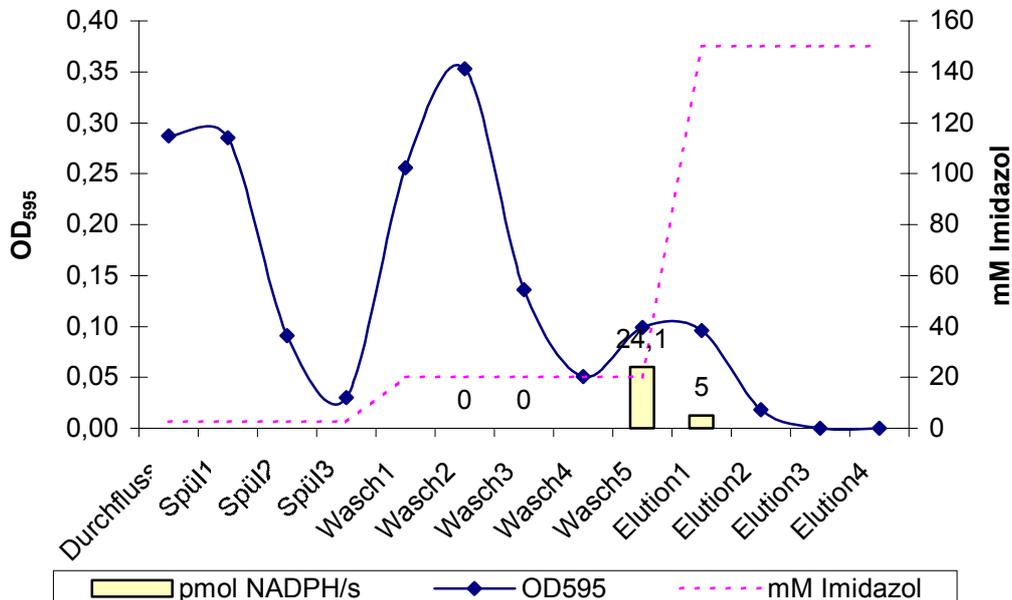


Abbildung 3.4 Elutionsprofil des M15 [pREP4] pQEdxr-Extrakts von der Talonsäule. Je 10 μ l pro Fraktion wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Aktivitätsbestimmung mit jeweils 20 μ l Protein.

Der in Abbildung 3.6 dargestellte Western-Blot zeigt die Anwesenheit von Proteinen mit His-Tag in den einzelnen aufgetragenen Fraktionen. Eine schwache Bande für das rekombinante Protein ist bereits im Rohextrakt detektierbar. Stärkere Signale werden ab Waschfraktion 2 erhalten, was dafür spricht, dass Teile des rekombinanten Proteins bereits mit 20 mM Imidazol von der Säule eluiert werden. Die größte Menge an His-Tag-Protein findet sich in den Fraktionen Wasch 5 und Elution 1. Jedoch sind hier auch zahlreiche Banden mit einem kleineren als dem berechneten Molekulargewicht des rekombinanten Proteins nachweisbar.

Versuche, die rekombinante DXR mit Hilfe einer hydrophoben Interaktionschromatographie an Phenylsepharose FF weiter anzureinigen, waren nicht erfolgreich. Das His-Tag-Protein eluierte zusammen mit dem Hauptproteinpeak.

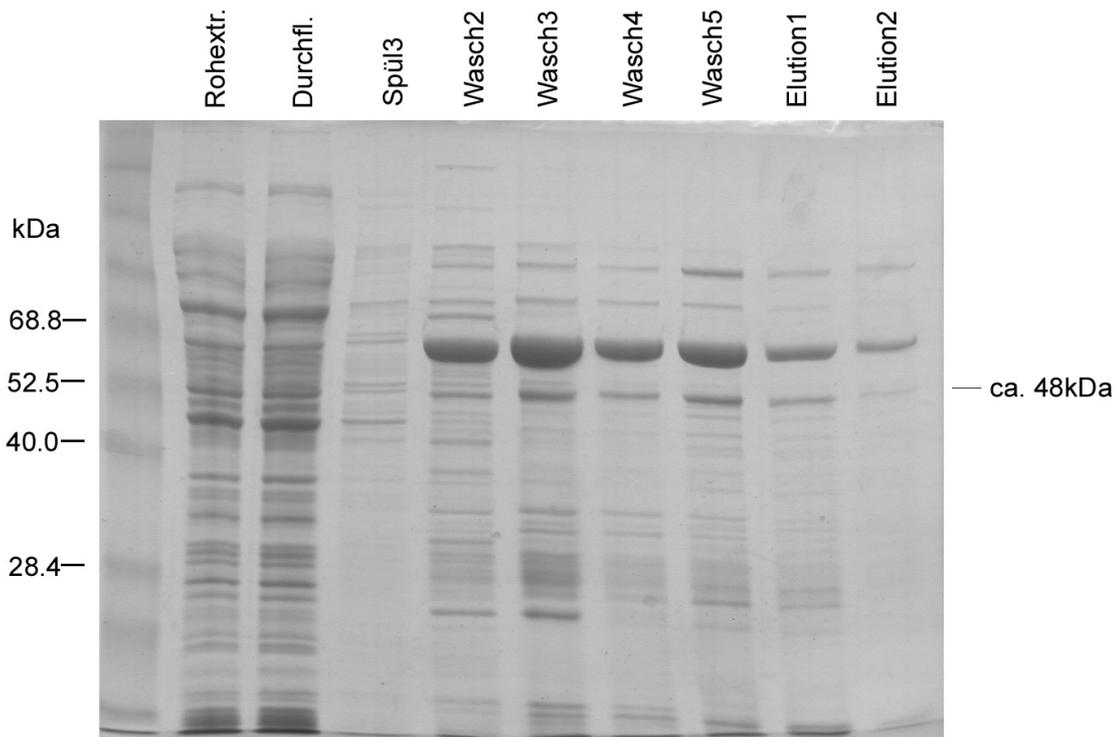


Abbildung 3.5 SDS-PAGE-Analyse repräsentativer Fraktionen der Aufreinigung der rekombinanten ZmDXR an Talon-Harz. Die Fraktionen Spül3 bis Elution2 wurden vor dem Auftragen auf das Gel um den Faktor 10 aufkonzentriert. 10 % Polyacrylamid-Gel, CBB-Färbung.

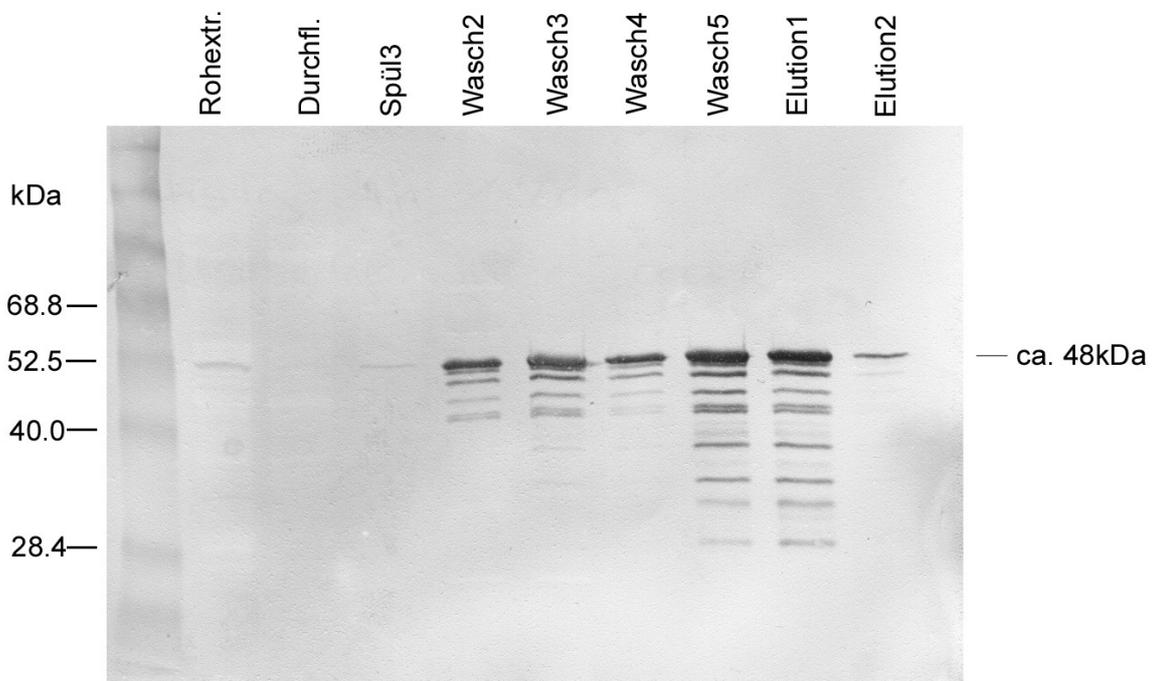


Abbildung 3.6 Western-Blot-Analyse der Fraktionen aus der Aufreinigung der rekombinanten ZmDXR an Talon-Harz. Beladung wie in Abbildung 3.5. Blot auf PVDF-Membran. Primärantikörper: Anti-His-Tag-AK (1:2000); Sekundär-AK: anti-Maus-IgG₁-AP-Konjugat (1:5000).

3.2.3 Aktivitätstests

Fraktionen der Aufreinigung von M15 [pREP4] pQEdxr-Extrakten, die nach Analyse auf Western-Blot-Ebene mit Anti-His-Tag-Antikörpern die Anwesenheit von rekombinanter DXR vermuten ließen, wurden auf ihre enzymatische Aktivität in DXR-Assays untersucht. Der Aktivitätsnachweis beruht auf dem Umsatz des eingesetzten NADPH, dessen Oxidation zu NADP^+ sich sehr leicht photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgen lässt. Als Positivkontrolle diente eine rekombinante DXR aus *S. leopoliensis* (als Klon *E. coli* TG1 pQEdxr von W. Zimmer zur Verfügung gestellt), die zuvor über eine Talon-Säule angereichert worden war.

Der Reaktionsverlauf wurde am Photometer über 5 min verfolgt, wobei alle 15 sec ein Messpunkt registriert wurde. Zur Bestimmung der anfänglichen Reaktionsrate wurde zunächst der OD_{340} -Verlauf gegen die Zeit aufgetragen, um die Linearität des OD-Verlaufs beurteilen zu können. Die Reaktionsrate wurde dann durch lineare Regression bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden anschließend mit dem spezifischen Extinktionskoeffizienten für NADPH bei 340 nm verrechnet, um Umsatzraten bestimmen zu können. Durch Bezug auf die eingesetzten Proteinmengen in den Assays wurden spezifische Aktivitäten berechnet. Die Rohdaten von Assays mit angereinigter rekombinanter ZmDXR (Waschfraktion 5) sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

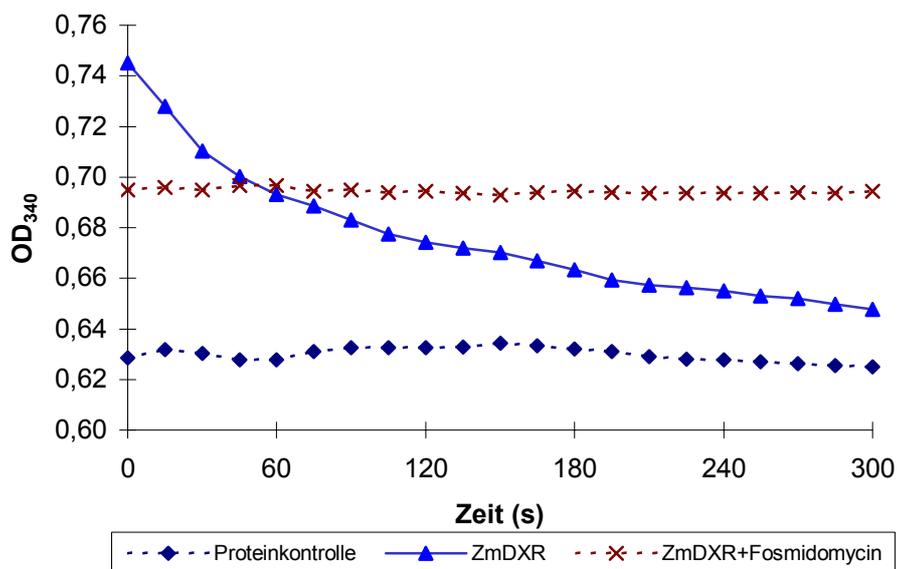


Abbildung 3.7 Rohdaten des Aktivitätstests mit angereinigter rekombinanter ZmDXR (Fraktion Wasch 5 aus Abbildung 3.5 bzw. Abbildung 3.6). 5 µg Protein/Assay; Proteinkontrolle: Assay mit hitzedenaturiertem Protein (5 min 95° C); ZmDXR+Fosmidomycin: 1 µM Fosmidomycin im Assay.

Mit hitzedenaturiertem Protein bzw. bei Zugabe des DXR-spezifischen Inhibitors Fosmidomycin (Kuzuyama et al., 1998a) konnte keine Abnahme der OD₃₄₀ nachgewiesen werden. Damit ist sichergestellt, dass der Umsatz von NADPH spezifisch für eine ablaufende DXR-Reaktion ist. Tabelle 3.3 zeigt die aus den Rohdaten berechnete spezifische Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle.

Tabelle 3.3 Spezifische Aktivitäten der ZmDXR-Enzymassays im Vergleich zur Positivkontrolle aus *S. leopoliensis*. n.d.: nicht detektierbar

Probe	spezif. Aktivität (nkat mg ⁻¹ Protein)
<i>S. leopoliensis</i> DXR	34,94
+ 1 µM Fosmidomycin	n.d.
ZmDXR	28,02
+ 1 µM Fosmidomycin	n.d.
- DXP	n.d.
denaturiertes Protein	n.d.

Neben der Waschfraktion 5 zeigte nur noch die Elutionsfraktion 1 messbare DXR-Aktivität (2,15 nkat mg⁻¹ Protein). Trotz der deutlichen Signale im Western Blot war in keiner der früheren Waschfraktionen DXR-Aktivität nachweisbar. Ob dies an einer nicht ausreichenden Sensitivität des Enzymtests für geringere Mengen an rekombinanter DXR lag, ist unklar.

3.2.4 Anreinigung aus der unlöslichen Fraktion

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums werden größere Mengen reinen Antigens benötigt. Da durch heterologe Expression von ZmDXR in *E. coli* nur wenig, stark verunreinigtes Protein in der löslichen Fraktion erhalten wird, wurde zur Antigengewinnung eine andere Strategie gewählt. Durch Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C über Nacht sollte eine Überexpression und damit verbunden, eine Sequestrierung des Proteins in die unlösliche Fraktion erzielt werden. Nach Solubilisierung der unlöslichen Rückstände unter denaturierenden Bedingungen wurde der erhaltene Extrakt durch Metallaffinitäts-Chromatographie an Ni-NTA-Agarose aufgetrennt. Dieses Material ist beständiger gegenüber den denaturierenden Bedingungen der verwendeten Puffer als die sonst zum Einsatz kommende Talon-Matrix. Abbildung 3.8 zeigt das Elutionsprofil des Extrakts aus 800 ml M15 [pREP4] pQEdxr –Kultur von der Ni-NTA-Säule.

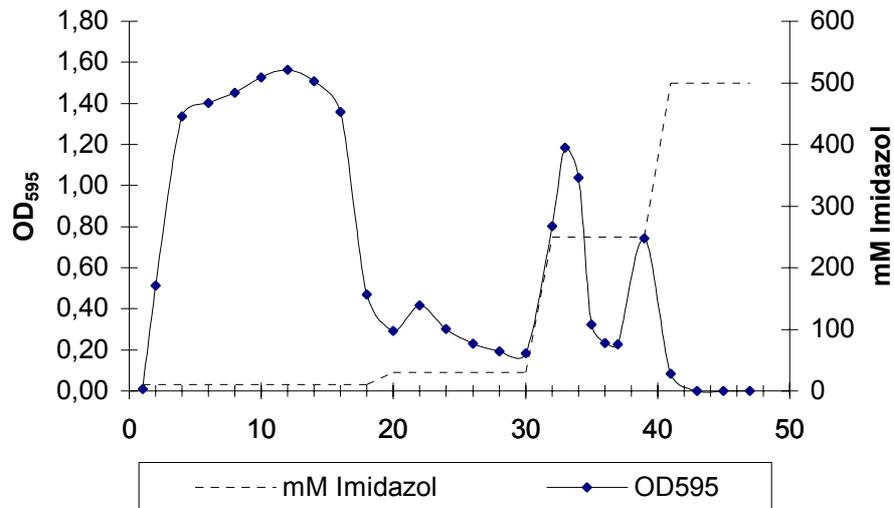


Abbildung 3.8 Elutionsprofil des denaturierenden Extrakts von M15 [pREP4] pQEdxr von Ni-NTA-Agarose. 45 mg Gesamtprotein; Proteinbestimmung nach Bradford (10 μ l/Fraktion)

Die Elution des rekombinanten Proteins von der Matrix erforderte hier höhere Imidazol-konzentrationen als bei der Verwendung von Talon-Material. Das gebundene Protein eluierte nach Steigerung der Imidazolkonzentration auf 250 mM in 2 Hauptpeaks. Die entsprechenden Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE auf die Reinheit des rekombinanten Proteins hin untersucht (Abbildung 3.9).

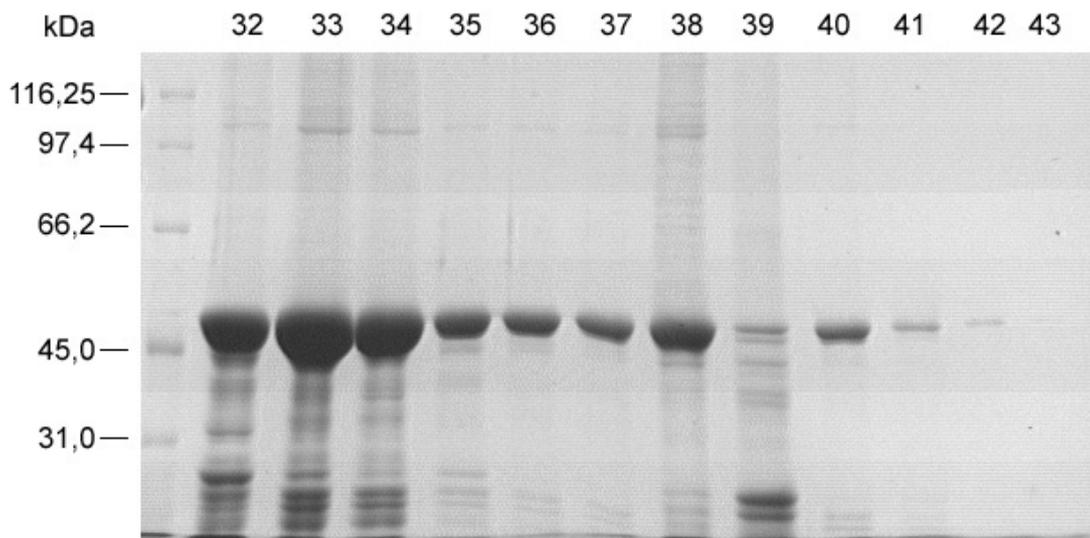


Abbildung 3.9 SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen 32 – 43 nach Auftrennung des denaturierenden Extrakts von M15 [pREP4] pQEdxr über Ni-NTA-Agarose. 5 μ l pro Fraktion; 10 % Polyacrylamidgel; CBB-Färbung.

Die Fraktionen 35 bis 38, sowie 40 und 41 wurden vereinigt; insgesamt wurden ca. 3 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,77 mg/ml erhalten. Dies entspricht einer Proteinmenge von ca. 2,3 mg.

3.2.5 Herstellung und Aufreinigung des polyklonalen Antiserums

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums wurden ca. 1,6 mg Antigen (Herstellung s. 3.2.4) an die Firma Eurogentec geschickt. Dort wurden zwei Kaninchen (Identifikationsnummern 641 bzw. 642) mit dem Antigen immunisiert. Vor Beginn der Immunisierung wurde Kaninchenserum als Präimmunserum gewonnen. Im weiteren Verlauf wurden mehrere Nachinjektionen mit dem Antigen vorgenommen; nach der dritten Boost-Injektion wurde eine größere Testcharge des Antiserums zur Überprüfung übersandt. Zunächst wurden *E. coli*-Proteinextrakte durch Western Blots analysiert. Dabei war ein starker Hintergrund an Proteinbanden erkennbar, die sowohl vom Antiserum als auch von Präimmunserum erkannt wurden (o. Abb.). Gesamtproteinextrakte aus Maisgeweben wurden nach elektrophoretischer Trennung auf PVDF geblottet und mit dem Serum bzw. dem Präimmunserum inkubiert. Das Präimmunserum zeigte keine Reaktivität gegenüber Proteinen aus Mais (Abbildung 3.10). Das Testserum hingegen detektierte eine Hauptbande in Extrakten aus Maisblättern und Wurzeln. Allerdings waren auch noch etliche schwächere Banden erkennbar. Auffallend ist auch, dass bei der als Positivkontrolle eingesetzten angereinigten rekombinanten DXR zahlreiche Banden detektiert wurden. Dies spricht dafür, dass die Reinheit des Antigens durch die Kontrolle auf SDS-PAGE (Abbildung 3.9) überschätzt wurde.

Der parallele Test mit dem Serum des Kaninchens 641 ergab identische Resultate und ist deswegen hier nicht eigens dargestellt.

Mit Hilfe eines Dot-Blot-Versuchs wurde die Sensitivität dieses Testserums ermittelt. Dazu wurden Verdünnungen des Antigens auf eine PVDF-Membran getüpfelt und mit dem Serum inkubiert (Abbildung 3.11).

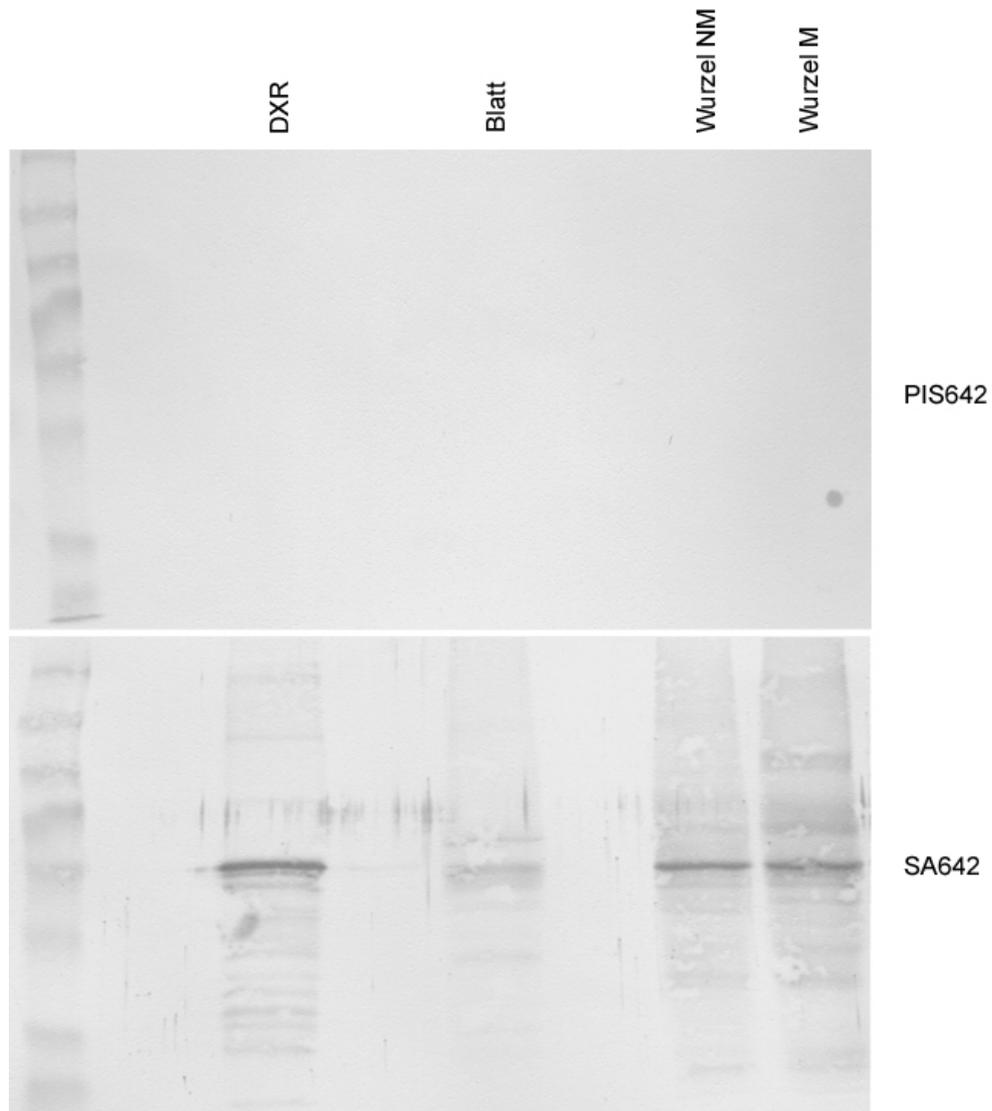


Abbildung 3.10 Western-Blots zur Überprüfung der Spezifität des Testserums 642 in Gesamtproteinextrakten aus Maisgeweben. 10 µg Gesamtprotein aus den angegebenen Maisgeweben pro Spur; DXR: 25 ng des rekombinanten Antigens als Positivkontrolle; NM: nicht mykorrhiziert; M: mykorrhiziert (*G. intraradices*); Primärantikörper: Testserum 642 (SA 642) bzw. Präimmunserum 642 (PIS 642) jeweils 1:2000.

Auch hier ist wie im vorhergehenden Western-Blot-Experiment erkennbar, dass das Präimmunserum keine Reaktion mit dem Antigen zeigte. Für beide getesteten Seren konnte bei einer Verdünnung von 1:2000 eine Sensitivität von weniger als 7 pg Antigen festgestellt werden.

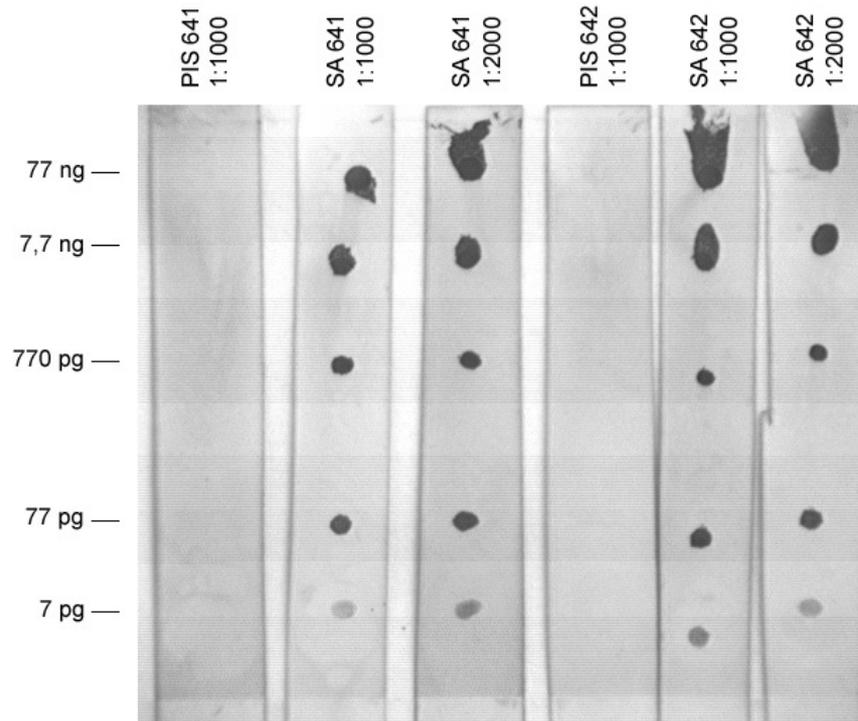


Abbildung 3.11 Dot-Blot-Versuch zur Ermittlung der Sensitivität der Testseren. Serielle Verdünnungen des rekombinanten Antigens wurden auf PVDF getüpfelt und mit den angegebenen Serenverdünnungen inkubiert.

Aufgrund der in Abbildung 3.10 sichtbaren Nebenbanden, die durch das polyklonale Antiserum detektiert wurden, war eine Reinigung des Antiserums notwendig. Um unspezifische Bindung aus dem Gesamtserum auszuschließen, wurde in einem ersten Versuch rohes Antiserum einer Affinitätschromatographie an einer Protein A-Matrix (Affi-Gel[®] Protein A Agarose, Biorad) unterworfen. Tests auf Western-Blots mit der eluierten IgG-Fraktion des Serums brachten jedoch keine Verbesserung der Spezifität des Serums. Daher wurde in einem weiteren Schritt eine Affinitätsreinigung des Serums am spezifischen Antigen durchgeführt. Etwa 70 µg des angereinigten rekombinanten Antigens wurden nach Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Membranbereich, der das spezifische Antigen enthielt, diente als Affinitätsmatrix für die Reinigung. 6 ml Antiserum wurden mehrere Stunden mit dem Membranstreifen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wurden die gebundenen Antikörper durch ein Absenken des pH-Wertes auf pH 2,5 eluiert. In Tabelle 3.4 sind die Proteinausbeuten der einzelnen Elutionsschritte aufgeführt.

Tabelle 3.4 Proteinausbeuten bei der Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums

Probe	Volumen	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μg gesamt
Eluat 1	1200 μl	0,185	222
Eluat 2	600 μl	0,085	51
Eluat 3	600 μl	0,025	15

Wichtig bei der Reinigungsprozedur ist, dass die bei niedrigem pH eluierten Antikörper sehr schnell wieder in den neutralen pH-Bereich zurücküberführt werden, um Denaturierung und damit Aktivitätsverlust der Antikörper zu vermeiden.

Die beiden ersten Eluate wurden aufkonzentriert und per Western Blot auf ihre Spezifität hin getestet. Abbildung 3.12 belegt, dass nach erfolgter Affinitätsreinigung sowohl im rekombinanten Antigen als auch in pflanzlichen Extrakten (hier aus nichtmykorrhizierten Maiswurzeln) nur noch eine Bande mit dem korrekten Molekulargewicht erkannt wird.

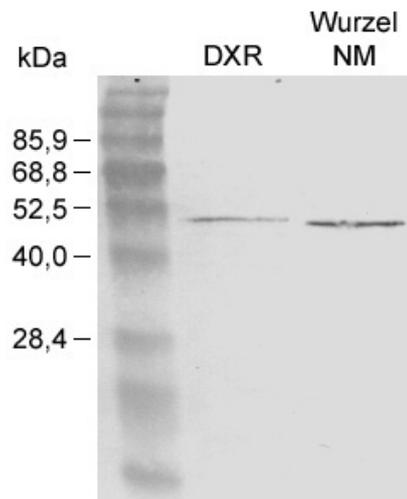


Abbildung 3.12 Western Blot zur Überprüfung der Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper. 25 ng rekombinantes Antigen (DXR), bzw. 10 μg Gesamtproteinextrakt aus nichtmykorrhizierten Maiswurzeln. Blot auf PVDF; Primär-Antikörper: Eluat 1 der Affinitätsreinigung 1: 2000.

Der parallel durchgeführte Test mit dem Eluat 2 der Reinigung ergab vergleichbare Ergebnisse. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3 Charakterisierung der Mais-DXR

3.3.1 Differentielle Transkriptakkumulation

Aus Untersuchungen von Walter et al. (2000) war bekannt, dass DXR-Transkripte durch Mykorrhizierung hochreguliert werden. Durch Verwendung der klonierten cDNA ZmDXR33 als Sonde sollte dies nun im homologen System überprüft werden. Weitere Maisgewebe wurden auf *DXR*-Expression hin untersucht, um ein Expressionsprofil zu erstellen. Je 5 µg Gesamt-RNA aus den einzelnen Geweben wurden dazu elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Nach Hybridisierung mit der kompletten cDNA ZmDXR33 ergab sich folgendes Bild (Abbildung 3.13):

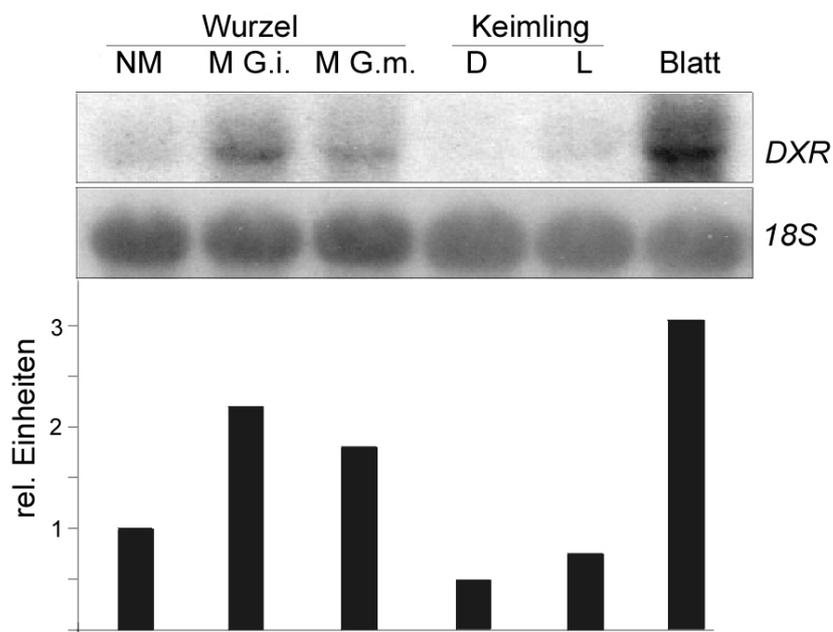


Abbildung 3.13 Northern-Blot-Analyse zur Erstellung eines Expressionsprofils für *ZmDXR*. NM: nichtmykorrhizierte Wurzeln; M G.i.: mykorrhizierte Wurzeln (*G. intraradices*); M G.m.: myk. Wurzeln (*G. mosseae*); D: Dunkelkeimung; L: Lichtkeimung. Jeweils 5 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden mit der kompletten cDNA von *ZmDXR33* hybridisiert. Die Beladungskontrolle erfolgte durch Hybridisierung mit einem 346 bp 18S rDNA-Fragment. Quantifizierung erfolgte durch Exposition beider Hybridisierungen mit dem PhosphorImager. Die quantitativen Werte sind als Quotient der Intensitäten [*ZmDXR*]/[18S] berechnet und auf den Wert aus nichtmykorrhizierten Wurzeln normiert.

Die höchste Transkriptakkumulation wurde in Blättern gefunden (etwa das Dreifache der Menge in nichtmykorrhizierten Wurzeln). In Wurzeln selbst war durch die Mykorrhizierung eine Verdoppelung der Transkriptmengen nachweisbar. Der geringe Unterschied in den Induktionsfaktoren zwischen den beiden Mykorrhizapilzen *G. intraradices* und *G. mosseae* ist wahrscheinlich auf Unterschiede in den Mykorrhizierungsraten der Pilze zu-

rückzuführen. *G. mosseae* zeigte in mehreren Versuchen eine langsamere Mykorrhizierung, so dass alle weiteren Experimente nur noch mit *G. intraradices* durchgeführt wurden. Geringere Transkriptmengen waren auch in Keimlingen nachweisbar. Belichtete Keimlinge zeigten ein etwas höheres Niveau an *DXR*-Transkript als etiolierte Stadien.

3.3.2 Differentielle Akkumulation von DXR-Protein

Änderungen von Transkriptniveaus eines bestimmten Gens müssen nicht notwendigerweise auch eine Änderung der Mengen des entsprechenden Proteins bedeuten. Daher wurde der affinitätsgereinigte Antikörper gegen die rekombinante Mais-DXR zur Analyse der Proteinmengen verwendet. In den untersuchten Wurzelproteinextrakten wurde eine einzelne Bande im korrekten Molekulargewichtsbereich erkannt (Abbildung 3.14). Analog zu den Transkriptmengen war auch hier eine höhere Proteinmenge in mykorrhizierten Proben nachweisbar. In Gesamtproteinextrakten aus Maisblättern waren zwei dicht übereinander liegende Banden erkennbar. Die Intensität der Bande, die auf gleicher Höhe mit den in Wurzeln detektierten Banden liegt, war etwa mit der Bandenintensität in mykorrhizierten Wurzeln vergleichbar.

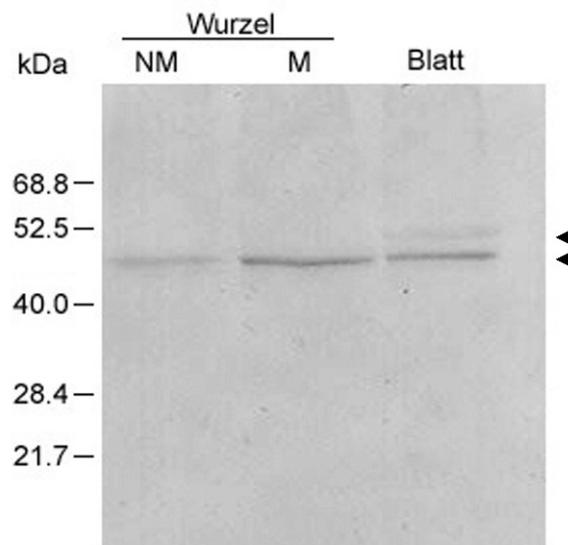


Abbildung 3.14 Western Blot-Analyse von Mais-Gesamtproteinextrakten. NM: nichtmykorrhizierte Wurzeln; M: mykorrhizierte Wurzeln (*G. intraradices*). Je 25 µg Gesamtprotein wurden pro Spur geladen. Blot auf PVDF-Membran; Primär-Antikörper: affinitätsgereinigter Anti-DXR (Eluat1) 1: 2000. Pfeilspitzen: obere Bande bei ca. 51 kDa (in Blattextrakt); untere Bande bei ca. 45 kDa (Hauptbande).

3.3.3 Genomische DNA-Blot-Analyse

Eine wichtige Fragestellung in der vorliegenden Arbeit betraf die Regulation des MEP-Wegs in mykorrhizierten Maiswurzeln. Die DXR katalysiert den zweiten Reaktionsschritt in diesem Stoffwechselweg. Dies ist zugleich der erste Schritt, der spezifisch ausschließlich in Richtung Isoprenoide führt. Um eine mögliche Regulation über Isogene zu untersuchen, wurde versucht, die Kopienzahl für *ZmDXR* im Maisgenom über eine genomische DNA-Blotanalyse zu ermitteln. Die genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, von denen eines (*Bam*HI) genau einmal in der cDNA schneidet, während die restlichen Enzyme (*Hind*III, *Xba*I, *Xho*I) keine Schnittstellen in der cDNA haben. Abbildung 3.15 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

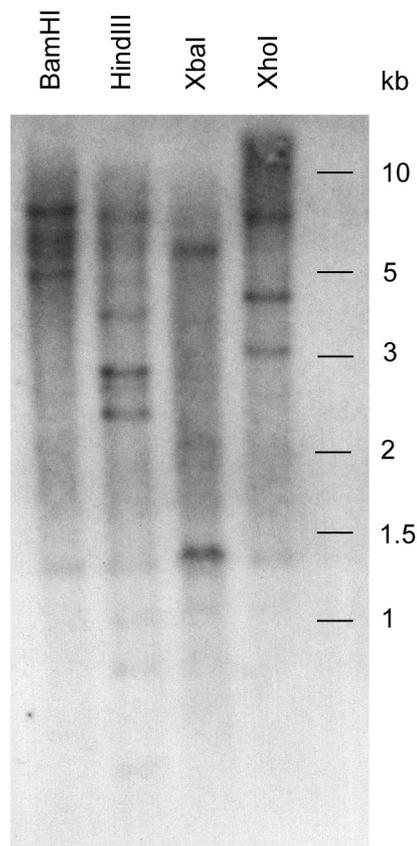


Abbildung 3.15 DNA-Blot-Analyse genomischer Mais-DNA. 10 µg DNA pro Spur wurden mit den angegebenen Enzymen verdaut und auf einem 0,7 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Hybridisiert wurde unter stringenten Bedingungen mit der kompletten cDNA von *ZmDXR33*. Exposition: 7 Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Ergebnisse der Hybridisierung des DNA-Blots sind nicht eindeutig. So sind beim Verdau mit *Bam*HI mindestens 5 Banden detektierbar, bei *Hind*III sind es mindestens 10. Bei den *Xba*I- bzw. *Xho*I-Verdaus sind jeweils 4 Banden feststellbar.

Die Interpretation der Ergebnisse wird dadurch erschwert, dass bislang keine Informationen über die genomische Organisation des *DXR*-Gens in Mais vorliegen. Insbesondere Kenntnisse über die Intron-/Exonstruktur sowie die Größe evtl. Introns sind für eine genaue Analyse des DNA-Blots unerlässlich. Die zahlreichen Banden mit einer Größe von weniger als 1,7 kb (die Größe der cDNA) sprechen bereits für Restriktionsschnittstellen innerhalb des Gens.

Zur Erleichterung der Interpretation der Ergebnisse wurde deshalb versucht, mittels PCR ein genomisches Fragment für das *DXR*-Gen zu amplifizieren. Vergleichende Datenbankanalysen ergaben, dass sich die beiden bislang bekannten *DXR*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* in ihrer Intron-/Exon-Struktur sehr ähnlich sind. Das Reisgen enthält bei einer Länge von ca. 6 kb sehr lange Intronsequenzen (vgl. Abbildung 4.2). Primer zur Amplifikation des genomischen Fragments aus Mais wurden so gewählt, dass sie in Analogie zum Reisgen jeweils im ersten bzw. letzten Exonbereich liegen. Es standen jeweils zwei äußere und zwei innere Forward- bzw. Reverseprimer (s. Tabelle 2.4) zur Verfügung.

Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, führte die Verwendung der Primerkombination DXRfw2 / DXRre2 zur Amplifikation eines ca. 6 kb großen Fragments. Dieses wurde aus dem Gel eluiert, mit einem 3'-A-Überhang versehen und wird zur Zeit in einen geeigneten Vektor subkloniert.

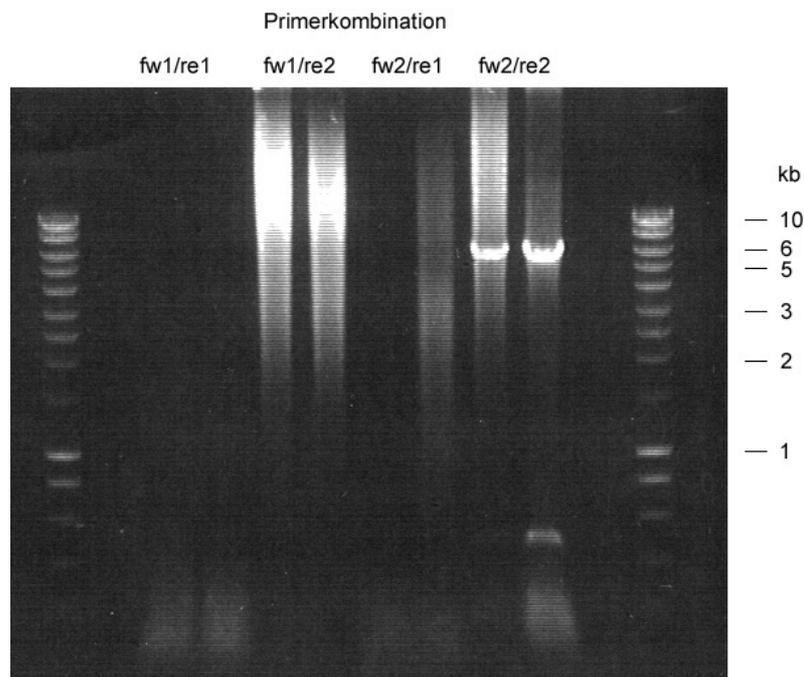


Abbildung 3.16 Ergebnis des Tests verschiedener Primerkombinationen zur Amplifikation eines genomischen *DXR*-Fragments. Je 15 μ l der PCR-Ansätze wurden auf ein 0,7 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Es wurden Doppelansätze durchgeführt.

3.4 Immunlokalisierung der Mais-DXR in Wurzelkortexzellen

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der räumlichen Verteilung der Mais-DXR in Wurzelzellen. Dazu wurden Querschnitte durch fixierte Wurzeln angefertigt, die dann mit dem affinitätsgereinigten Antiserum gegen die rekombinante DXR inkubiert wurden, um deren Lokalisation innerhalb des Gewebes bzw. innerhalb einzelner Zellen untersuchen zu können. Zusätzlich wurden pilzliche Strukturen mit Weizenkeimagglutinin (WGA, gekoppelt an Tetramethylrhodaminisothiocyanat, WGA-TRITC), einem Lectin aus Weizen mit hoher Affinität zu N-Acetylglucosamin, angefärbt. Eine Gegenfärbung mit DAPI ermöglicht die Erfassung von DNA in Zellkernen.

3.4.1 Etablierung der Markierungsbedingungen

Ausgehend von den Experimenten auf Western-Blot-Ebene war es die erste Aufgabe, geeignete Bedingungen für eine erfolgreiche Immunmarkierung der Mais-DXR in den Wurzelquerschnitten zu etablieren. Außerdem musste sichergestellt werden, dass durch das Antiserum keine unspezifischen Signale erzeugt werden. Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungsstufen des Primärantikörpers getestet. Bei einer Verdünnung von 1:2000 war die Signalintensität in den Schnitten sehr schwach. Eine Vervierfachung der Antikörpermenge auf 1:500 erbrachte wesentlich stärkere Signale, die jedoch trotz der vorher erfolgten Affinitätsreinigung des Serums auch unspezifischer wurden. Insbesondere wurde bei dieser höheren Konzentrationen des Anti-DXR-Antikörpers eine unspezifische Kreuzreaktivität mit Komponenten der pflanzlichen Zellwand festgestellt. Daher wurde für alle folgenden Versuche eine Primärantikörperverdünnung von 1:1000 verwendet, die das Optimum an Signalstärke und Spezifität erbrachte.

In Abbildung 3.17 ist ein Vergleich zwischen Präimmunserum und affinitätsgereinigtem Antiserum dargestellt. Nach Inkubation mit dem Präimmunserum konnte kein Fluoreszenzsignal für Alexa488, und damit für eine Markierung der DXR, festgestellt werden. Deutlich sichtbar waren allerdings die pilzlichen Strukturen und die pflanzliche Zellwand durch ihre Autofluoreszenz nach Anregung mit der 488 nm-Laserlinie.

Die Inkubation mit dem DXR-Antikörper dagegen führte zu einer deutlichen grünen Fluoreszenz (s. Pfeile in Abbildung 3.17). Signale für die Mais-DXR waren in der Nähe des Arbuskels sowie des pflanzl. Zellkerns feststellbar. Durch die Verwendung des Antiserums in einer Verdünnung von 1:1000 war keine unspezifische Bindung der Antikörper an die pflanzliche Zellwand detektierbar. Autofluoreszenz-Signale der pilzlichen Strukturen

wurden sowohl im roten als auch im grünen Kanal detektiert. Wie Abbildung 3.17 zeigt, ist eine Abgrenzung dieses Signals von dem Alexa488-Signal der spezifischen DXR-Markierung jedoch problemlos möglich.

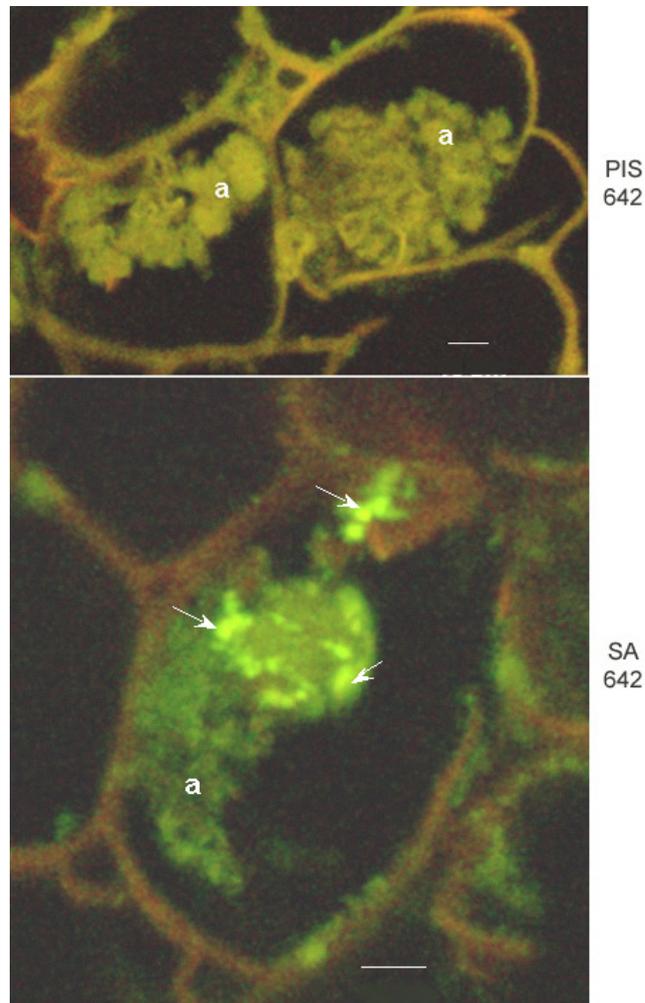


Abbildung 3.17 Vergleich von Präimmunserum (PIS) und affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Mais-DXR (SA642) in Immunlokalisierungsexperimenten. Beide Seren wurden 1:1000 verdünnt. Analyse am LSM 410 (40x Objektiv), gezeigt ist jeweils ein einzelner optischer Schnitt. Detektion mit Kanal 1 (grün) für Alexa488-Signale und mit Kanal 2 (rot) für Autofluoreszenz von Pilz und pflanzl. Zellwand. Die Maßstäbe entsprechen jeweils 10 µm. a: Arbuskel; die Pfeile zeigen beispielhaft Lokalisierungssignale für DXR.

3.4.2 Differentielle Lokalisation der Mais-DXR in kolonisierten und nichtkolonisierten Zellen

Nach der Etablierung der Bedingungen für die Immunmarkierung der DXR in den Schnitten war ein möglicher Unterschied im Lokalisierungsmuster zwischen kolonisierten (arbuskelhaltigen) und nichtkolonisierten (arbuskelfreien) Zellen zu untersuchen. Die DXR

ist ein plastidenlokalisiertes Enzym, daher sind in den Schnitten diese Organellen markiert, wenn sie genügend DXR-Protein enthalten.

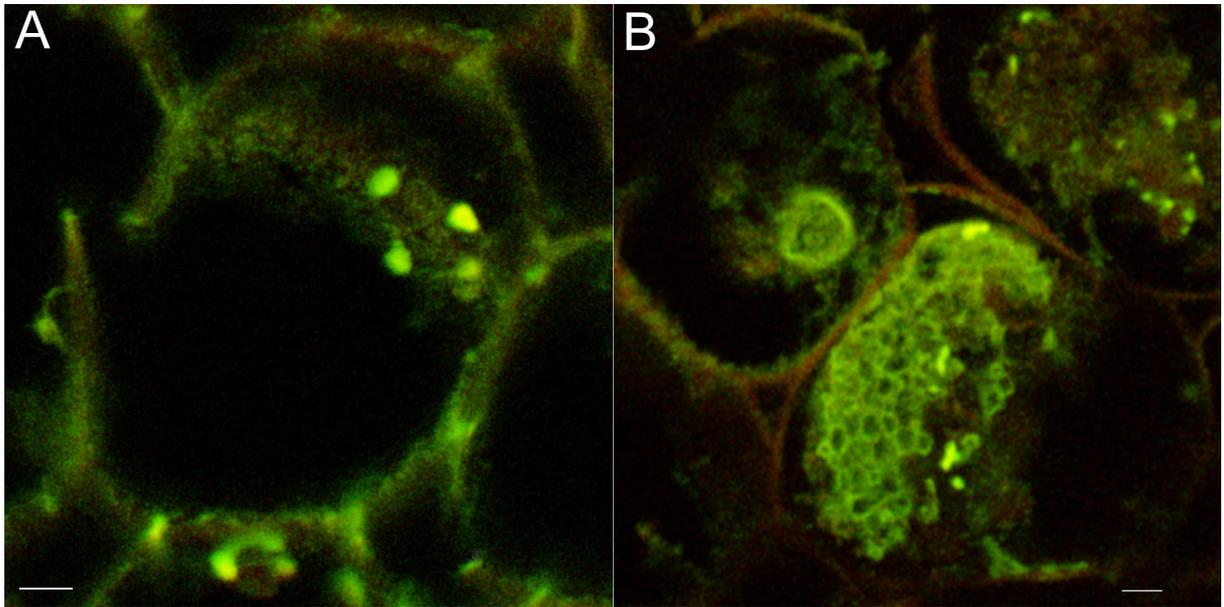


Abbildung 3.18 Immunlokalisierung der Mais-DXR in nichtkolonisierten Wurzeln (A) und mykorrhizierten Wurzeln (B). Inkubation mit Antiserum (1:1000). Analyse am LSM 410; 40x Objektiv; für Kanalbelegung s. Abbildung 3.17. Abgebildet ist jeweils ein einzelner optischer Schnitt; Maßstäbe: 10 μ m.

Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, besteht ein markanter Unterschied zwischen kolonisierten und nichtkolonisierten Zellen in der Lokalisation und der Abundanz der Signale für die DXR. In nichtkolonisierten Zellen findet sich die DXR vor allem in vereinzelt Plastiden, die im Cytoplasma verteilt vorliegen (Bild A). Dagegen ist in arbuskelhaltigen Zellen (Bild B) eine starke Proliferation der Plastiden erkennbar. Die räumliche Verteilung der Organellen in der Zelle ist ebenfalls stark verändert: es kommt zur Ausbildung eines Netzwerkes, das die Arbuskel umgibt. Eine weitere Aggregation von DXR-haltigen Plastiden ist in einer ringförmigen Struktur um den pflanzlichen Zellkern erkennbar (linke obere Zelle in Bild B). Bei dieser Zelle ist nicht klar zu erkennen, ob sie eine Arbuskel beinhaltet.

3.4.3 Färbung der pilzlichen Zellwand mit WGA-TRITC

Ein Problem der vorangegangenen Untersuchungen liegt darin, dass die Anwesenheit pilzlichen Materials in Zellen nicht zweifelsfrei belegt werden kann. Die beobachteten Autofluoreszenzen sind zwar ein Hinweis, aber kein zwingender Beleg für die Existenz eines Arbuskels in einer bestimmten Zelle. Daher wurden Versuche unternommen, die pilzliche

Zellwand spezifisch zu markieren, um damit zu zweifelsfreien Aussagen bezüglich der Lokalisation von DXR und Arbuskeln zu kommen.

Als geeignetes Agens zur Markierung pilzlicher Zellwände bietet sich Weizenkeimagglutinin (WGA) an. Dieses Lectin hat eine sehr hohe und sehr spezifische Affinität zu N-Acetylglucosamin, der monomeren Hauptkomponente des Chitins der pilzlichen Zellwände. Um eine Kolo-kalisation von Pilzstrukturen und DXR zu gewährleisten, wurde für diese Versuche WGA in Kopplung an TRITC gewählt, dessen Fluoreszenzcharakteristika deutlich von denen des Alexa488-Farbstoffs verschieden sind. Erste Versuche mit WGA-TRITC machten deutlich, dass die Dicke der Schnitte (bis 20 µm) kein durchgängiges Färben der Präparate erlaubte. Daher wurde vor der Färbung eine Inkubation mit Zellwand-lytischen Enzymen durchgeführt, um durch Verdau der pflanzlichen Zellwände ein besseres Eindringen des Markierungsagens in die Präparate zu ermöglichen. Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis einer WGA-TRITC-Markierung. Deutlich erkennbar ist eine Arbuskel, die eine Maiswurzelzelle fast vollständig ausfüllt. Die starke dichotome Verzweigung des symbiotischen Organs ist undeutlich zu erkennen. Unter den hier gewählten Anregungs- und Detektionsbedingungen ist auch eine Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwände festzustellen.

Die Kombination der Immunlokalisierung der Mais-DXR mit der Anfärbung pilzlicher Zellwände durch WGA-TRITC ermöglicht deren Kolo-kalisation und Aussagen über eine mögliche Korrelation von DXR-haltigen Plastiden mit Arbuskeln. In Abbildung 3.20 ist eine solche Kolo-kalisation dargestellt. Deutlich erkennbar ist ein Teil einer Arbuskel mit ihrer Stammhype (im rechten Bildteil). In der direkten Umgebung der arbuskulären Struktur, die durch ihre starke Verästelung erkennbar ist, finden sich Signale für die Mais-DXR. Interessanterweise sind sie auf den stark verästelten Bereich der Arbuskel beschränkt, die Stammhype zeigt keine solche Markierung. DXR-haltige Plastiden oder deren tubuläre Ausläufer (sog. *stromules*, abgeleitet von „*stroma containing tubules*“; Köhler et al., 1997; Tobin, 1997) sind räumlich eng mit den Arbuskelausläufern korreliert.

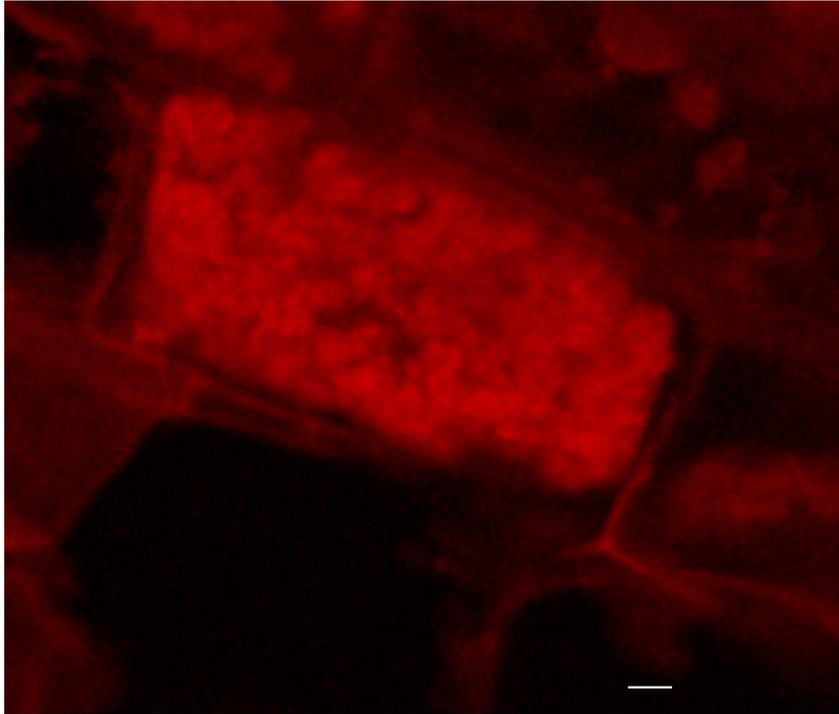


Abbildung 3.19 Markierung pilzlicher Zellwände mit WGA-TRITC. Detektion im roten Kanal. Der Maßstab entspricht 10 μm . Dargestellt ist ein einzelner optischer Schnitt (Analyse am LSM 410; 40x Objektiv).

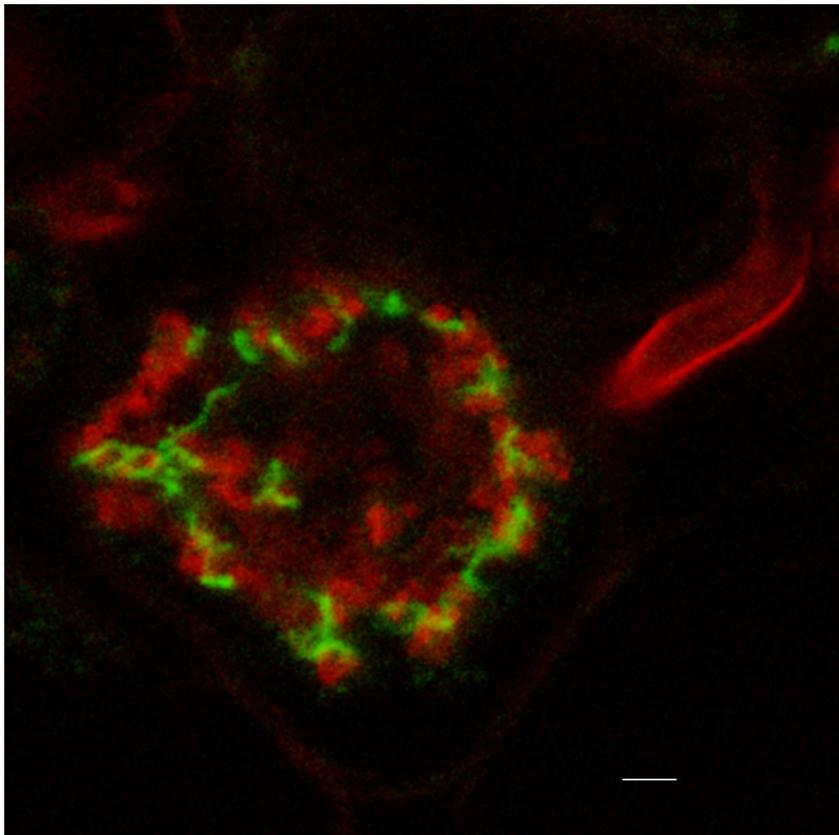


Abbildung 3.20 Simultane Detektion der Mais-DXR (durch anti-DXR/Alexa488; grüner Kanal) und pilzlicher Strukturen (durch WGA-TRITC, roter Kanal). Analyse am LSM 410 (40x Objektiv). Maßstab: 5 μm . Dargestellt ist ein einzelner optischer Schnitt.

3.4.4 Räumliche Rekonstruktion durch Projektion gestapelter optischer Schnitte

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation der DXR in Maiswurzelzellen beschränkten sich auf die Analyse einzelner optischer Schnitte am Konfokalmikroskop (LSM 410). Arbuskeln sind jedoch Strukturen, die das Volumen einer kolonisierten Kortezelle fast völlig ausfüllen können. Daher ist es interessant, eine Art dreidimensionale Analyse der Verteilung von DXR-Protein und Arbuskel in Zellen durchführen zu können. Diese Möglichkeit besteht durch das Anlegen von optischen Schnittstapeln. In einem definierten Abstand (in z-Richtung, also in der Tiefenebene des Präparats) werden optische Schnitte durch das Präparat gelegt, die anschließend durch Projektion zu einem einzelnen Bild einen quasiräumlichen Einblick ermöglichen.

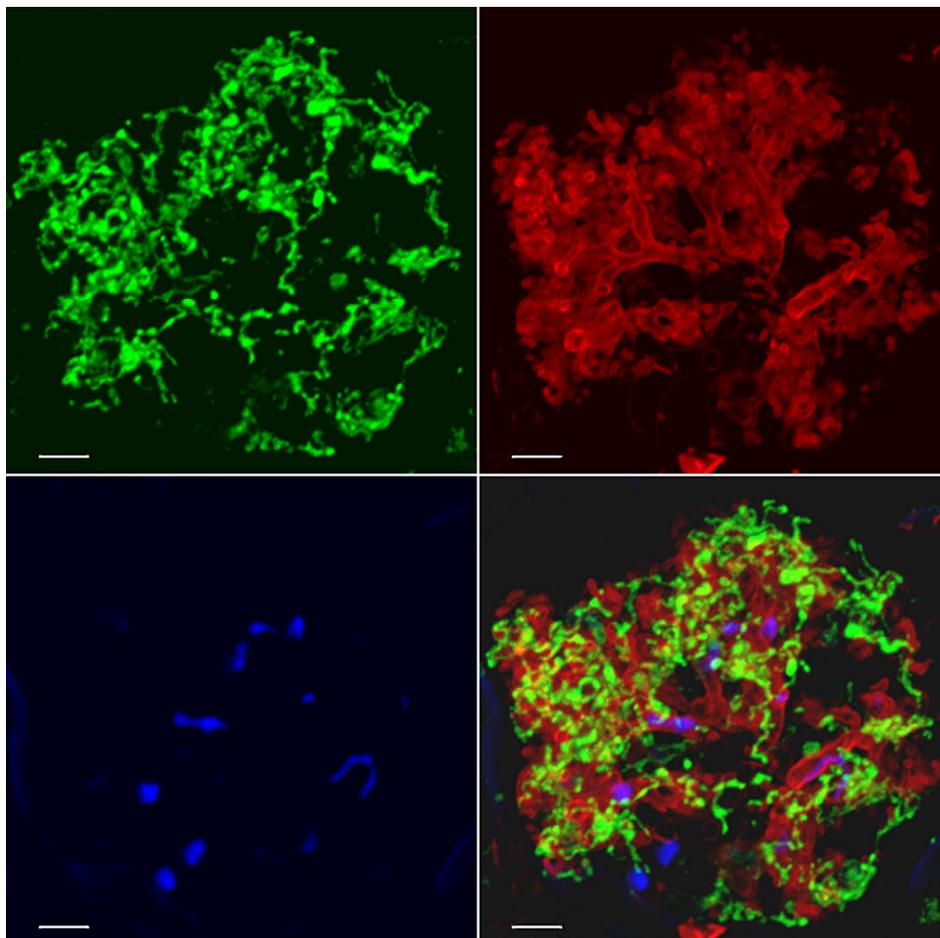


Abbildung 3.21 Arbuskel in einer Wurzelkortexzelle von Mais. Grüner Kanal: Alexa488-Signal für DXR; roter Kanal: TRITC-Signal für WGA-markierte Pilzhyphen; blauer Kanal: DAPI-Gegenfärbung. Analyse am LSM 510 Meta mit 63x Objektiv. Dargestellt ist die Projektion von 25 einzelnen optischen Schnitten in einem z-Abstand von ca. 0,5 μm ; Maßstab: 5 μm .

In Abbildung 3.21 ist eine solche Projektion dargestellt. Deutlich erkennbar ist das Plastidennetzwerk im grünen Kanal. Einzelne Plastiden (als intensivere Signale erkennbar)

sind durch zahlreiche *stromules* miteinander verbunden. Im roten Kanal ist die bäumchenartige Struktur der Arbuskel sichtbar. Dickere Hyphen verzweigen sich in der distalen Region des Organs zu immer feiner verästelten Strukturen. Im blauen Kanal sind durch die DAPI-Färbung pilzliche Zellkerne sichtbar. In der Überlagerung aller drei Kanäle erkennt man die enge Kolokalisation von DXR-haltigen Plastiden und arbuskulären Strukturen. Die meisten Plastiden finden sich dabei um die fein verzweigten distalen Strukturen an der Oberfläche der Arbuskel.

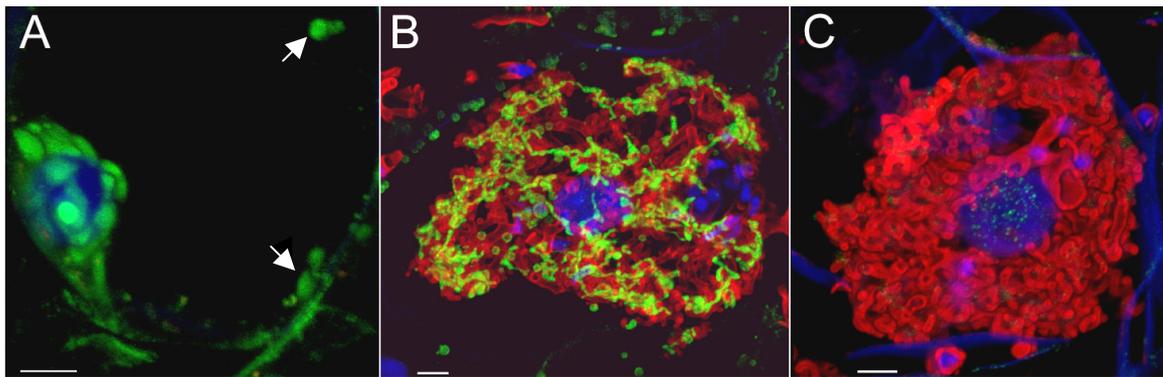


Abbildung 3.22 Kontrollexperimente für die Lokalisierung der DXR in Maiswurzeln. A: nichtmykorrhizierende Wurzelzelle nach Inkubation mit DXR-Antiserum; B: mykorrhizierte Wurzelzelle nach Inkubation mit DXR-Antiserum; C: mykorrhizierte Zelle nach Inkubation mit Präimmunsereum. Analyse am LSM 510 Meta mit 63x Objektiv. Kanal- und Farbbelegung: rot: WGA-TRITC; grün: anti-DXR/Alexa488; blau: DAPI. Die Maßstäbe entsprechen jeweils 5 μm . Es sind jeweils die Projektionen von 25 optischen Schnitten (Abstand 0,5 μm) dargestellt. Die Pfeile in Bild A weisen auf einzelne DXR-haltige Plastiden hin.

Die in Abbildung 3.17 dargestellten Kontrollexperimente wurden wiederholt und am LSM 510 Meta mit Hilfe von optischen Schnittstapeln erneut ausgewertet. Auch die Lokalisierung der DXR in nichtmykorrhizierten Zellen wurde in diesem Ansatz erneut überprüft. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt, wurden die wesentlichen Befunde der vorausgegangenen Analysen bestätigt. Bild A zeigt die Lokalisierung DXR-haltiger Plastiden in einer nichtkolonisierten Zelle. Deutlich erkennbar ist die Aggregation von Plastiden um den Zellkern, wie bereits in Abbildung 3.18 angedeutet. Hier kann allerdings eine Kolonisierung der Zelle durch den Pilz definitiv ausgeschlossen werden, da im roten Kanal kein Signal für WGA-TRITC feststellbar ist. Weiterhin sind Lokalisierungssignale für DXR-haltige Plastiden im Cytoplasmasaum der Zellen (mit Pfeilen markiert) sichtbar. In Bild B ist die aus Abbildung 3.21 bereits bekannte plastidäre Netzwerkbildung um den Arbuskel erneut sichtbar. Der pflanzliche Zellkern ist inmitten der Arbuskel zu erkennen. Bild C zeigt das Ergebnis nach Inkubation eines mykorrhizierten Wurzelschnitts mit dem Präimmunsereum. Deutlich sichtbar sind Arbuskelstrukturen sowie der pflanzliche Zellkern. Es

können jedoch keine markierten Plastiden im grünen Kanal detektiert werden. Somit ist die Spezifität der Detektion der Mais-DXR auch in diesem Versuch bestätigt.

3.4.5 DXR-Akkumulation in Abhängigkeit vom arbuskulären Lebenszyklus

Arbuskel sind dynamische Gebilde, die sich in einer Zelle entwickeln, eine begrenzte Zeit aktiv bleiben und anschließend wieder zerfallen. Um eine evtl. Abhängigkeit der DXR-Akkumulation von bestimmten Entwicklungsstadien der Arbuskel zu untersuchen, wurden Schnitte von mykorrhizierten Maiswurzeln nach entsprechenden Stadien des arbuskulären Lebenszyklus durchsucht. Da für Mais noch keine molekularen Marker für die Arbuskelentwicklung verfügbar sind, wurden entsprechende Stadien nach morphologischen Kriterien klassifiziert. Wichtige Parameter sind dabei Anzahl, Verzweigungsgrad und Durchmesser der Hyphen (nach Kinds & Brown, 1975, 1976). Während der Entwicklung zur voll ausgewachsenen Arbuskel ist dabei ein stetig ansteigender Verästelungsgrad, sowie ein Abnehmen des Durchmessers der Hyphen zu verzeichnen. Die basalen Stammhyphen sind relativ dick, während die distalen stark verzweigten Hyphen feiner und dünner werden. Die Degeneration der Arbuskel wird eingeleitet durch einen Kollaps der distalen Hyphen, der sich mit fortschreitendem Zerfall der Struktur stetig basal ausbreitet. Das Endstadium der Arbuskel ist dann durch einen vollständigen Kollaps der Hyphen in der kolonisierten Zelle charakterisiert.

In Abbildung 3.23 sind entsprechende Stadien der Arbuskelentwicklung mit der gleichzeitigen Lokalisation der DXR dargestellt. In der ersten Spalte (roter Kanal) sind dabei die pilzlichen Strukturen durch WGA-TRITC visualisiert. Die zweite Spalte (grüner Kanal) bildet die Lokalisierungssignale für die DXR ab, während in der dritten Spalte (blauer Kanal) die DAPI-Gegenfärbung dargestellt ist. Die vierte Spalte zeigt eine Überlagerung aller drei Kanäle.

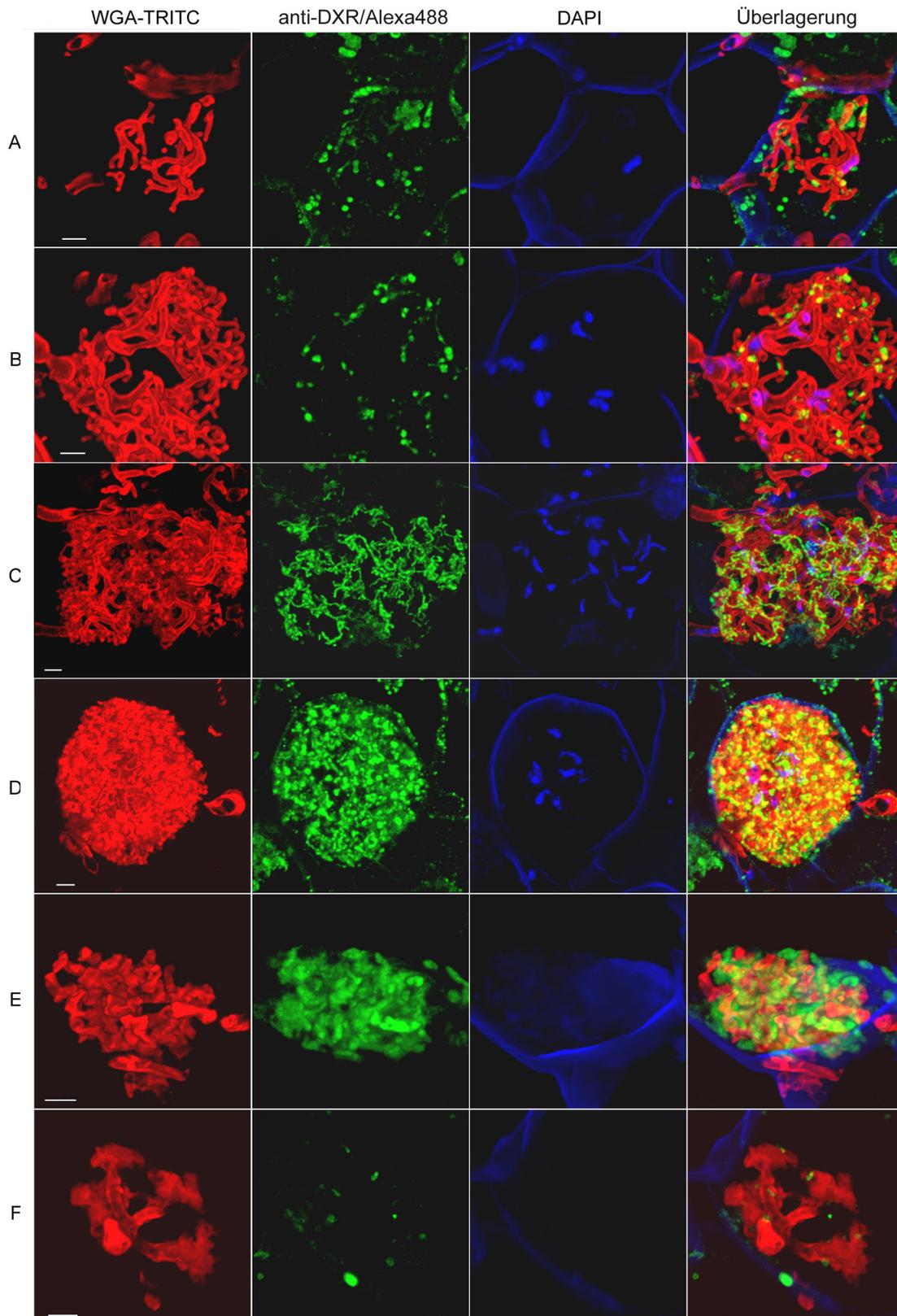


Abbildung 3.23 DXR-Akkumulation in Abhängigkeit von Arbuskelstadien. Dargestellt ist der Entwicklungsgang von sehr jungen (Zeile A) über voll entwickelte (Zeilen C, D) bis zu fast vollständig zerfallenen Arbuskeln (Zeile F). Kanalbelegung siehe Beschriftung. Analyse am LSM 510 Meta mit 63x Objektiv. Dargestellt sind jeweils Projektionen von 25 einzelnen optischen Schnitten; Maßstab: 5 μm .

Nach Penetration der pflanzlichen Zellwand beginnt die einwachsende Hyphe sich zu verzweigen (Zeile A). In diesem frühen Stadium der Arbuskelentwicklung, das durch wenige dicke, kaum verzweigte Hyphen charakterisiert ist, finden sich Markierungen für DXR vor allem in einzelnen Plastiden, die im Cytoplasma verteilt vorliegen. Es sind auch bereits erste Anzeichen für Plastidenaggregationen sichtbar. Die Gegenfärbung mit DAPI ermöglicht in den meisten Fällen nicht nur eine Visualisierung von pilzlicher oder pflanzlicher DNA in den jeweiligen Zellkernen, sondern bewirkt durch die Anregungswellenlänge von 350 nm auch eine starke Autofluoreszenz von Zellwandmaterial. Somit ist oft auch der Zellumriss deutlich sichtbar.

Zeile B stellt ein etwas fortgeschrittenes Wachstumsstadium der Arbuskel dar. Deutlich erkennbar ist der höhere Verzweigungsgrad der Hyphen, die allerdings immer noch relativ dick sind. In diesem Stadium ist eine Orientierung der Plastiden in die mehr distalen Bereiche der Arbuskel erkennbar; ihre Anzahl ist gegenüber dem in Zeile A abgebildeten Stadium aber noch nicht wesentlich erhöht.

Dagegen ist im nächsten Entwicklungsstadium (Zeile C) bereits eine deutliche Proliferation DXR-haltiger Plastiden feststellbar. Einzelne Plastiden sind durch *stromules* zu einem Netzwerk verbunden, das die fast komplett entwickelte Arbuskel eng umgibt. Diese füllt bereits einen beträchtlichen Teil des Zellvolumens aus und ist hochgradig verzweigt. Die größte Ausdehnung erreicht die Arbuskel im vollentwickelten Zustand (Zeile D). Sie füllt das Zellvolumen fast komplett aus. In diesem Stadium ist der höchste Grad an Vernetzung der DXR-haltigen Plastiden zu beobachten. Das Plastidennetzwerk ist eng mit den distalen Ausläufern der Arbuskel verwoben. Die in den Zeilen C und D dargestellten Arbuskelstadien dürften wahrscheinlich die funktionell aktivsten Phasen des arbuskulären Lebenszyklus darstellen, in denen der intensivste Nährstofftransport erfolgt.

Der beginnende Zerfall der Arbuskel wird durch das Kollabieren der distalen Hyphenbereiche charakterisiert. Wie in Zeile E abgebildet, verlieren die Hyphen ihren runden Querschnitt und bilden eine Knäuelstruktur. Das die Arbuskel umgebende Plastidennetzwerk kollabiert ebenfalls und bleibt weiterhin in engem Kontakt mit dem pilzlichen Material. In diesem Stadium werden die höchsten Markierungsintensitäten für die DXR beobachtet. Es ist allerdings unklar, ob dies auf einer räumlichen Kondensation des vorhandenen Proteins beruht oder tatsächlich eine verstärkte Proteinbiosynthese in dieser Phase zu verzeichnen ist. Im DAPI-Kanal (blau) ist für dieses Stadium auch eine erhöhte Autofluoreszenz zu beobachten, die evtl. von den kollabierenden Pilzhyphen ausgeht. Die Bedeutung dieser stärkeren Fluoreszenz ist unklar. Zeile F stellt ein sehr fortgeschrittenes Zerfallsstadium

dar. Der Kollaps der pilzlichen Hyphen hat auch die Stammhyphne der Arbuskel erreicht, wie an der ovalen Deformation sichtbar ist. Die distalen Bereiche sind nur noch als verwachsene, strukturlose Aggregate pilzlichen Materials sichtbar. Das Netzwerk DXR-haltiger Plastiden scheint sich ebenfalls fast vollständig aufgelöst zu haben. Es sind nur noch ganz vereinzelte Signale für DXR zu erkennen.

Insgesamt ist eine Korrelation der DXR-Akkumulation und auch der Bildung eines plastidären Netzwerkes mit dem Entwicklungsgang einer Arbuskel festzustellen. Während die Netzwerkstruktur synchron mit der vollen Entwicklung der Arbuskel ihre höchste Komplexität erreicht, ist die maximale Akkumulation des DXR-Proteins etwas in Richtung beginnende Arbuskeldegeneration verschoben.

4. Diskussion

4.1 Klonierung und molekulare Charakterisierung der Mais-DXR cDNA

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Klonierung der Mykorrhiza-induzierten DXR aus Maiswurzeln. Durch Einsatz des Reis-EST S11168 als Sonde gelang die Isolierung von drei cDNA-Klone mit hoher Ähnlichkeit zu bereits bekannten pflanzlichen DXR-Sequenzen. Interessanterweise zeigte allerdings nur einer der drei Klone ein durchgängiges offenes Leseraster. Die Leseraster der beiden anderen Klone sind an unterschiedlichen Stellen durch Insertionen unterbrochen. Diese Insertionen können zumindest im Falle des Klons *ZmDXR88* auf ein fehlerhaftes oder unvollständiges Splicing der Vorläufer-mRNA zurückgeführt werden. Ein kurzes genomisches DNA-Fragment aus Mais, das den 3'-Teil des 49 bp-Insertionsbereichs abdeckt, liegt in der Datenbank vor (AZ916496). Die Insertion im Klon *ZmDXR88* endet mit der Basenabfolge AG, die typischerweise am 3'-Ende von Intron-Sequenzen zu finden ist (Brown & Simpson, 1998). Für den zweiten Klon *ZmDXR64* liegen noch keine entsprechenden genomischen Fragmente in den Datenbanken vor, jedoch schließt auch hier die Insertion mit den Basen AG ab. Insgesamt ist davon auszugehen, dass beide Klone die Produkte eines unkorrekten Splicings oder Transkripte von Pseudogenen darstellen. Untermuert wird dieser Befund durch das Fehlen entsprechender ESTs in den öffentlich zugänglichen Maisdatenbanken.

Auffällig ist der extrem hohe Grad an Sequenzidentität auf Aminosäureebene innerhalb der bekannten pflanzlichen DXRs. Die N-terminalen Plastidenimportsequenzen weisen kaum konservierte Bereiche auf, jedoch liegt die berechnete wahrscheinliche Schnittstelle der plastidären Signalpeptidase in allen bekannten Sequenzen direkt N-terminal von einem konservierten CSX-Motiv (wobei X für M, V oder A steht; Carretero-Paulet et al., 2002). Die putativen prozessierten Proteine zeigen dagegen extrem hohe Identitätswerte von bis zu 95 %. Dies ist möglicherweise auch ein Hinweis auf einen sehr starken Selektionsdruck, der kaum Spielraum für Veränderungen im Laufe der Evolution zuließ. Selbst die in den „variablen“ Bereichen auftretenden Aminosäureaustausche sind oft konservativ, so dass keine allzu großen Auswirkungen auf die Struktur des Proteins oder seine Eigenschaften zu erwarten sind. Die DXR-Proteine bilden eine eigene in sich abgeschlossene Gruppe, die kaum Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen in Pflanzen aufweist. Die vom Reaktionsmechanismus her verwandten Ketol-Säure-Reduktoisomerasen aus der

Valin-Biosynthese zeigen nur eine Sequenzidentität von ca. 10 % zu den DXR-Proteinen aus dem gleichen Organismus (*A. thaliana* und *O. sativa*). Ein konserviertes Motiv im N-terminalen Bereich der prozessierten DXR-Proteine (GSTGS I/V G) hat allerdings eine gewisse Ähnlichkeit zu dem GxGxxGxxxG-Motiv der Ketol-Säure-Reduktoisomerasen, das als mögliche NADPH-Bindungsstelle diskutiert wird (Rane & Calvo, 1997).

4.2 Heterologe Expression der Mais-DXR cDNA

Die heterologe Expression des cDNA-Klons hatte zwei Ziele. Zunächst sollte durch eine funktionelle Expression die Identität des Klons als DXR bestätigt werden. Außerdem sollte das rekombinante Protein als Antigen für die Herstellung eines polyklonalen Antiseraums gegen die Mais-DXR dienen.

Die Expression unter den als optimal ermittelten Expressionsbedingungen resultierte in sehr geringen Mengen an nativem rekombinanten Protein. Eine Veränderung dieser Bedingungen führte zu einer Sequestrierung des rekombinanten Proteins in die unlösliche Fraktion von *E. coli*. Die durch die oben genannten Induktionsbedingungen erzielten Mengen an rekombinanter DXR liessen sich durch die eingesetzten Chromatographie-techniken nur grob anreinigen. Eine mögliche Ursache dafür könnten eventuelle Protein-Protein-Wechselwirkungen in den bakteriellen Extrakten sein, die unter den verwendeten Chromatographiebedingungen nicht unterdrückt werden konnten. So ist zum Beispiel in der SDS-PAGE-Analyse der Talonreinigung (Abbildung 3.5) eine starke Proteinbande bei ca. 60 kDa erkennbar, deren Intensitätsverteilung in den einzelnen Fraktionen ziemlich genau mit der des His-Tag-Proteins (Abbildung 3.6) korreliert. Auch eine anschließende hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose FF ermöglichte keine Abtrennung der rekombinanten DXR von diesem Protein. Eine mögliche Ursache für diese artifizielle Protein-Protein-Wechselwirkung könnte in der Existenz des konservierten Prolin-reichen Motivs PPPAWPGRA am N-Terminus des putativen prozessierten DXR-Proteins liegen. Solche Prolin-reiche Regionen können Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln (Kay & Williamson, 2000).

Die Aktivitätsmessungen mit den rekombinanten Proteinfractionen belegten die Anwesenheit einer rekombinanten funktionellen DXR. Insbesondere durch Einsatz des spezifischen Inhibitors Fosmidomycin (Kuzuyama et al., 1998a) war es möglich, den Umsatz von NADPH als DXR-spezifisch zu charakterisieren. Dabei wurde in den Assays sowohl mit der Postivkontrolle aus *Synechococcus leopoliensis* als auch mit den Proben der re-

kombinanten ZmDXR bei einer eingesetzten InhibitorKonzentration von 1 μM eine komplette Hemmung der Reaktion erreicht. Diese Fosmidomycinkonzentration entspricht etwa dem 25fachen Wert des von Kuzuyama et al. (1998a) angegebenen K_i -Werts von Fosmidomycin für die DXR aus *E. coli* (38 nM). Im Gegensatz dazu führten InhibitorKonzentrationen von 7,5 μM in den von Miller et al. (2000) beschriebenen Tests mit der rekombinanten DXR aus *S. leopoliensis* erst zu einer Halbierung der spezifischen Aktivität des Enzyms. Interessanterweise ist die spezifische Aktivität der in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzten rekombinanten DXR aus *S. leopoliensis* mit etwa 35 nkat mg^{-1} Protein etwa siebenmal höher als von Miller et al. (2000) beschrieben. Die Ursache für die wesentlich höhere spezifische Aktivität und die erheblich effektivere Inhibition der Reaktion bleibt unklar. Die rekombinante DXR aus *Z. mays* zeigt in den Aktivitätstests eine ähnliche spezifische Aktivität wie die Positivkontrolle.

Aufgrund der limitierten Proteinmenge waren weiterführende enzymkinetische Messungen nicht durchführbar. In der Literatur sind keine kinetischen Daten für pflanzliche DXR-Enzyme verfügbar. Die bislang heterolog exprimierten Enzyme wurden meist nur qualitativ auf DXR-Aktivität hin untersucht (Lange & Croteau, 1999; Schwender et al., 1999), bzw. durch Komplementation von *dxr*-Mutanten in *E. coli* funktionell identifiziert (Rodríguez-Concepción et al., 2001; Carretero-Paulet et al., 2002). Verfügbare kinetische Daten aus prokaryotischen Systemen zeigen apparente K_m -Werte, die sich innerhalb eines sehr weiten Konzentrationsbereichs bewegen: so wurde für die rekombinante DXR aus *Zymomonas mobilis* ein apparenter K_m -Wert für DXP von 0,3 mM ermittelt (Grolle et al., 2000), während entsprechende Messungen für das rekombinante Enzym aus *E. coli* Werte von 73 μM (Hoeffler et al., 2002) bzw. 250 μM (Kuzuyama et al., 2000) ergaben. In allen Fällen handelt es sich bei den untersuchten Enzymen um His-Tag-Proteine.

4.3 Regulation und genomische Organisation der frühen Schritte des MEP-Wegs

Aus früheren Untersuchungen war eine Mykorrhiza-spezifische verstärkte Transkriptakkumulation von *DXS* und *DXR* in Wurzeln bekannt (Walter et al., 2000). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer homologen Sonde im Northern-Blot verifiziert werden. Auf Gewebeniveau ist für die *DXR* in mykorrhizierten Wurzeln ein Induktionsfaktor von ca. 2 gegenüber nichtmykorrhizierten Wurzeln feststellbar. Dieser Wert ist nicht sehr hoch, bezieht seine Signifikanz jedoch aus der Tatsache, dass die sym-

biotische Interaktion auf eine anteilmäßig geringe Zellpopulation im gesamten Wurzelgewebe beschränkt ist. Ähnliche Werte werden auch für die Transkriptakkumulation von *ZmDXS2* im mykorrhizierten Maiswurzeln erhalten (Walter et al., 2002). Bei der DXS scheint eine Aufgabenteilung zwischen zwei unterschiedlichen Genen und damit eine Regulation über Isogene vorzuliegen. Dabei ist das mit *ZmDXS1* bezeichnete Gen eher in primären Stoffwechselsituationen, wie z. B. Photosyntheseprozesse oder Wachstum und Entwicklung, aktiv. *ZmDXS2* ist dagegen eher in Wurzeln aktiviert, und ist zudem durch Mykorrhizierung induzierbar (Abbildung 4.1; Walter et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deuten hingegen auf die Aktivität eines einzelnen *DXR*-Gens in *Z. mays* hin. So detektiert die homologe Sonde im Northern-Blot nur eine Bande bei ca. 1,8 kb (Abbildung 3.13). Weiterhin wurden Transkripte sowohl in Wurzeln als auch in photosynthetisch aktiven Blättern nachgewiesen. Auch die Ergebnisse des genomischen Southern-Blots deuten auf das Vorliegen eines Gens mit niedriger Kopienanzahl im Maisgenom hin. Die genaue Kopienzahl kann zwar ohne Kenntnisse des Intron-Exon-Musters und der Intronsequenzen nicht angegeben werden, jedoch ist die Existenz einer *DXR*-Genfamilie in Mais auszuschließen. Genauere Informationen könnten dabei durch die Amplifikation und anschließende Analyse des genomischen *DXR*-Fragments aus *Z. mays* erhalten werden. Frühere Untersuchungen und Datenbankanalysen der beiden sequenzierten Genome aus *A. thaliana* und *O. sativa* ergaben für beide Organismen das Vorhandensein eines einzelnen *DXR*-Gens (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Lange & Ghassemian, 2003). Dies wird für *A. thaliana* auch durch eine keimlingsletale T-DNA-Insertionsmutante im *DXR*-Gen untermauert (Budziszewski et al., 2001).

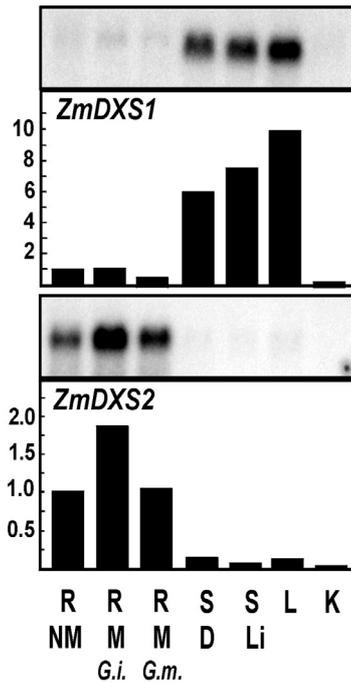


Abbildung 4.1 Northern Blot Analyse der differentiellen Transkriptakkumulation von *ZmDXS1* und *ZmDXS2*. Je 5 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden geblottet und mit den entsprechenden spezifischen Sonden für DXS1 bzw. -2 hybridisiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Bezug auf Hybridisierungssignale mit einer 18S rRNA-Sonde. R: Wurzel; NM: nicht mykorrhiziert; M G.i.: mykorrhiziert mit *G. intraradices*; M G.m.: myk. mit *G. mosseae*; S: Keimlinge; D: Dunkelanzucht; Li: Lichtanzucht; L: Blätter; K: unreife (weiße) Maiskörner. Abbildung aus Walter et al. (2002).

Vergleicht man beide bekannten Gene hinsichtlich ihrer Intron-Exon-Struktur, so stellt man fest, dass in beiden Fällen 12 hoch konservierte Exonbereiche vorliegen. Die Intronpositionen unterscheiden sich in beiden Organismen nur um maximal 10–20 bp. Dagegen ist die Länge der Intronsequenzen in *O. sativa* wesentlich größer (Abbildung 4.2).

A. thaliana DXR (ca. 3,2 kb)



O. sativa DXR (ca. 6 kb)



500 bp Exons Introns

Abbildung 4.2 Intron-Exonstruktur der codierenden Bereiche der DXR-Gene aus *A. thaliana* und *O. sativa*

Ausgehend von diesen vergleichenden Daten ist die Größe des kodierenden Bereichs (einschliesslich Introns) des *DXR*-Gens aus *Z. mays* sicher eher im Größenbereich des *O. sativa*-Gens zu erwarten. Ein entsprechend großes Amplikon aus genomischer DNA von *Z. mays* liegt bereits vor und muß vor weitergehenden Analysen noch in einen geeigneten Vektor subkloniert werden. Durch Datenbankanalysen konnte für *Z. mays* festgestellt werden, dass ein *DXR*-Gen (als TC 209786) auf Chromosom 8 bei 99,6 cM in der Nähe des Markers AZ916496 lokalisiert ist. Da die genetische Karte des Maisgenoms aber noch nicht vollständig ist, lässt sich auch daraus noch nicht sicher ableiten, dass *ZmDXR* in nur einer Kopie in Mais vorliegt.

Erwartungsgemäß finden sich in Blättern die höchsten Mengen an *DXR*-Transkript, was mit der notwendigen Bereitstellung von MEP-Weg-abhängigen Isoprenoidvorstufen insbesondere für Komponenten des Photosyntheseapparats (z.B. Carotinoide) erklärt werden kann. Auffällig ist jedoch, dass das hohe Transkriptniveau in Maisblättern nicht von einem ähnlich hohen *DXR*-Proteingehalt in den Blättern reflektiert wird. Die in Abbildung 3.14 sichtbare Bande bei ca. 45 kDa entspricht in ihrer Intensität etwa derjenigen in mykorrhizierten Maiswurzeln. Jedoch ist in Blättern eine weitere schwächere Bande bei ca. 51 kDa sichtbar, die in ihrer Größe dem unprozessierten Präprotein der *DXR* vor dem Plastidenimport entsprechen könnte. Somit ist denkbar, dass in Blättern ein höherer Proteinsatz für die *DXR* vorliegt, als dies in Wurzeln der Fall ist.

In Maiskeimlingen sind ebenfalls *DXR*-Transkripte nachweisbar. Ob die etwas höheren Transkriptmengen in lichtgekeimten Proben auf eine eventuelle Lichtregulation der *DXR* hinweisen, bleibt in der vorliegenden Arbeit ungeklärt. Für die *DXR* aus *A. thaliana* wurde allerdings eine solche direkte Regulation durch Licht beschrieben (Carretero-Paulet et al., 2002).

Durch ihre Position als erster spezifischer Schritt zur Isoprenoidbiosynthese im MEP-Weg ist die *DXR*-katalysierte Reaktion ein potentieller Regulationspunkt dieses Stoffwechsels. Bislang wurde dies allerdings nur in einigen wenigen Systemen untersucht, wobei die Ergebnisse kein einheitliches Bild ergeben. Wie oben erwähnt, weist die *DXR* aus *A. thaliana* eine direkte Lichtregulation auf. Etiolierte Keimlinge zeigen nach Belichtung einen deutlichen Anstieg der Menge von *DXR*-Transkript. Promotor::*GUS*-Fusionsexperimente zeigten weiterhin eine entwicklungspezifische Modulation der *DXR*-Expression. Insbesondere in jungen photosynthetisch aktiven Geweben und in Infloreszenzen sind höhere Expressionsniveaus detektierbar (Carretero-Paulet et al., 2002). Das hohe Expressionsniveau in den jungen Stadien ist mit der Lichtinduktion der *DXR* vereinbar, während der

Anstieg in den Infloreszenzen mit der Produktion von flüchtigen Terpenoiden in den Blüten korreliert (Chen et al., 2003). Die Expression der *DXR* in *A. thaliana* ist mit der *DXS*-Expression gekoppelt.

Eine ähnliche Koordination der Regulation von *DXS* und *DXR* ist im Fall der induzierbaren Monoterpen-Indolalkaloid-Produktion in *Catharanthus roseus*-Zellkulturen feststellbar (Veau et al., 2000). Der Monoterpenrest dieser Alkaloide wird über den MEP-Weg synthetisiert. Vier Tage nach Beginn der Induktion sind die ersten *DXS*- und *DXR*-Transkripte nachweisbar. Bei der Fruchtreife in Tomate scheint dagegen keine Koordination zwischen *DXS* und *DXR* vorzuliegen. Bei der massiven Akkumulation von Carotinoiden scheint die *DXS*-Reaktion der limitierende Schritt in der Biosynthese der Iosprenoidvorstufen (Lois et al., 2000) zu sein. Dagegen bleiben *DXR*-Transkript und auch Protein auf ihrem konstitutiven Niveau (Rodríguez-Concepción et al., 2001). Einen klaren Effekt auf die Flussrate im MEP-Weg durch eine *DXR* kann man in *Mentha x piperita* erkennen (Mahmoud & Croteau, 2001). Transgene Pflanzen, die mit der endogenen *DXR* als *sense*-Konstrukt transformiert waren, zeigten je nach Überexpression bzw. Cosuppression in den einzelnen Linien deutliche Unterschiede in der Ausbeute an etherischen Ölen, die vor allem aus Monoterpenen bestehen. Bei überexprimierenden Linien war die Ausbeute an Monoterpenen um bis zu 50 % gesteigert, während bei Cosuppressionslinien deutlich weniger Monoterpene gebildet wurden. Gleichzeitig zeigten diese Pflanzen eine Reduktion im Chlorophyllgehalt. Entsprechende transgene Ansätze mit der endogenen *DXS* zeigten keine Auswirkungen auf den Monoterpengehalt in *M. piperita* (S. Mahmoud, Pullman WA, USA; pers. Mitteilung).

4.4 Lokalisation von DXR-Protein in Maiswurzeln

Der Einsatz von Analysemethoden wie Northern- und Western-Blots ist immer dann problematisch, wenn Effekte untersucht werden sollen, die nicht gleichförmig im untersuchten Gewebe auftreten, sondern lokal auf einzelne Zellpopulationen beschränkt sind. In diesen Fällen führen Totalgewebesanalysen zu einer deutlichen Unterschätzung von Induktionsfaktoren für hochregulierte Gene und ihre Produkte, da die messbaren Effekte durch die große Zahl an nicht veränderten Zellen im Gewebe stark reduziert werden. Aus diesem Grund lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf Immunlokalisierungsexperimenten in Maiswurzeln. Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete Induktion der *DXR*-

Transkripte und des Proteins systemische oder lokalisierte Effekte sind, die sich eventuell in einer differentiellen räumlichen Akkumulation des DXR-Proteins widerspiegeln.

In nichtkolonisierten Zellen in Maiswurzeln waren Signale für DXR in einzelnen Plastiden im Cytoplasmasaum der Zellen und in einer Plastidenaggregation um den Zellkern sichtbar (Abbildung 3.22A). Dabei ergaben Analysen von Zellen aus nichtmykorrhizierten Wurzeln und von nichtkolonisierten (also arbuskelfreien) Zellen aus mykorrhizierten Wurzeln das gleiche Ergebnis. Damit wurde gezeigt, dass die auf Transkript- und Proteinebene auftretenden Induktionseffekte keine systemischen sondern lokal begrenzte Effekte sein müssen. Die Aggregation von Plastiden um den Zellkern ist erklärbar durch die Tatsache, dass beispielsweise die Nukleotidbiosynthese in Pflanzen in Plastiden abläuft, so dass eine räumliche Nähe dieser Organellen zum Ort des Nukleotidbedarfs, beispielsweise bei der Transkription von Genen zu mRNA, plausibel ist. Ähnliche Plastidenverteilungen werden auch in nichtmykorrhizierten transgenen Tabakwurzeln beobachtet, in denen die Plastiden durch ein importiertes GFP markiert werden (Köhler et al., 1997; Fester et al., 2001). In Tabak scheint jedoch die Anzahl der in nichtmykorrhizierten Wurzelzellen sichtbaren Plastiden höher zu liegen als in Mais. Dies könnte zunächst einmal auf einen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Pflanzenspezies hinweisen. Diese Beobachtung ist jedoch unter Umständen auch darauf zurückzuführen, dass einige Plastiden in Maiswurzelzellen keine oder nur sehr geringe Mengen DXR enthalten, und somit mit Hilfe des DXR-Antiserums nicht detektierbar sind. Es bleibt allerdings unklar, ob in Maiswurzelzellen verschiedene Plastidenpopulationen mit unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten existieren.

Wird eine Cortexzelle in Maiswurzeln von einem AM-Pilz kolonisiert, ändern sich Abundanz und Verteilung der DXR-haltigen Plastiden. Es ist eine starke Proliferation der Organellen feststellbar, die mit einer Relokalisation in Richtung der pilzlichen Hyphen einhergeht. Die Plastiden sind dabei vor allem um die distalen, fein verzweigten Ausläufer der Arbuskel verteilt. Durch Querverbindung einzelner Plastiden über sog. *stromules* (*stroma containing tubules*; Köhler et al., 1997) bildet sich ein dichtes Netzwerk, das die Arbuskel eng umschließt. Ähnliche plastidäre Netzwerke um Arbuskel sind auch in transgenen Tabakpflanzen durch GFP-Markierung beobachtet worden (Fester et al., 2001). Da Plastiden der Ort wichtiger metabolischer Prozesse, wie z.B. Stickstoff-Assimilierung, Fettsäure- und Pyrimidinbiosynthese sind, ist die enge räumliche Korrelation zwischen den Organellen und dem Arbuskel möglicherweise essentiell für eine funktionierende Interaktion der beiden Organismen. Die Quervernetzung der Plastiden könnte dabei einem

vereinfachten Transport von Metaboliten und/oder Proteinen innerhalb des Netzwerkes dienen. Die starke Proliferation der Plastiden in arbuskelhaltigen Zellen ist in Einklang mit den beschriebenen Effekten einer Aktivierung des pflanzlichen Stoffwechsels während der Kolonisierung durch AM-Pilze. Neben Plastiden ist auch eine Proliferation von Mitochondrien, sowie eine verstärkte Transkriptionsaktivität des Zellkerns nachgewiesen worden (Gianinazzi-Pearson, 1996). Neben den Veränderungen im Metabolismus ist auch eine starke räumliche Umorientierung von kolonisierten Wurzelzellen feststellbar. Die Umstrukturierung des Cytoskeletts dürfte wohl vorrangig dazu dienen, der Arbuskel den benötigten Raum innerhalb der Cortexzelle zu verschaffen. Es ist jedoch auch bekannt, dass Organellen, wie z.B. Plastiden, entlang von Cytoskelettsträngen verlagert werden können (Staiger, 2000).

4.5 Korrelation zwischen Arbuskelentwicklung und DXR-Akkumulation

Arbuskel sind dynamische Gebilde mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 7-10 Tagen in Mais (Alexander et al., 1988). Um mögliche Korrelationen der DXR-Akkumulation bzw. der plastidären Vernetzung mit Entwicklungsstadien der pilzlichen Struktur feststellen zu können, war eine Klassifizierung unterschiedlicher Arbuskelstadien notwendig. Da für die arbuskuläre Mykorrhiza in Mais noch keine funktionellen molekularen Marker bekannt sind, wurde diese Klassifizierung aufgrund morphologischer Parameter der Arbuskelstrukturen erstellt. In Anlehnung an elektronenmikroskopische Arbeiten (Kinden & Brown, 1975, 1976) wurden insbesondere die Anzahl und Dicke der pilzlichen Hyphen sowie ihr Verzweigungsgrad zur Klassifizierung von Stadien eingesetzt. Auch die Gesamtgröße der Arbuskel im Verhältnis zur Größe der kolonisierten Zelle wurde als Kriterium verwendet. Insgesamt wurden 6 Stadien definiert (vgl. Abbildung 3.23).

Auffällig ist, dass die Proliferation der DXR-haltigen Plastiden erst einsetzt, wenn die arbuskuläre Entwicklung bereits begonnen hat. Zeitgleich zu dieser Vermehrung setzt offensichtlich auch die räumliche Umorganisation der Organellen in Richtung der Arbuskeloberfläche ein. Insgesamt ist eine starke Korrelation der Vernetzung DXR-haltiger Plastiden mit der Entwicklung der arbuskulären Strukturen erkennbar. Der höchste Vernetzungsgrad dieser Organellen wird dabei um voll entwickelte und wahrscheinlich physiologisch aktive Arbuskeln erreicht. Im Gegensatz dazu ist das Maximum der Signalstärke für DXR-Protein eher in Richtung auf spätere Stadien und den beginnenden Abbau der

Arbuskeln verschoben. Ob diese maximale Signalstärke für DXR-Protein jedoch auf einer tatsächlichen erhöhten Proteinbiosynthese in diesem spezifischen Stadium oder eher auf einer räumlichen Konzentration des vorhandenen Proteins innerhalb des kollabierenden Netzwerks beruht, ist unklar.

Im Gegensatz zur beinahe kontinuierlichen Detektion des DXR-Proteins während des Arbuskelzyklus in Mais sind zwei andere Proteine nur auf bestimmte Phasen der arbuskulären Entwicklung beschränkt. So ist der Phosphattransporter MtPT4 nur um voll entwickelte Arbuskeln in *Medicago truncatula* detektierbar (Harrison et al., 2002). Ebenfalls ausschließlich um metabolisch aktive Arbuskeln ist eine H⁺-ATPase lokalisiert, die wahrscheinlich die Energetisierung des Nährstofftransports sicherstellt (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Beide Proteine sind direkt in den Prozess des Nährstofftransports integriert, so dass ihre Anwesenheit bzw. Aktivität auch nur während der Phase des aktiven Transports erforderlich ist. Die Detektion der DXR über einen wesentlich breiteren Zeitraum hinweg legt den Schluß nahe, dass ihre Funktion (bzw. die der akkumulierenden Apocarotenoide oder ihrer putativen Carotinoidvorläufer) nicht direkt mit dem Nährstofftransport, der primären Aufgabe der Arbuskel, verknüpft ist.

Um kollabierte Arbuskel liegt fast kein Lokalisierungssignal für die DXR mehr vor. Dies spricht dafür, dass nach dem Abbau des plastidären Netzwerkes die Aktivität des MEP-Weges in den einzelnen Plastiden herunterreguliert wird. In transgenen Tabakpflanzen sind bleiben einzelne, nicht vernetzte Plastiden um kollabierende Arbuskel sichtbar (Fester et al., 2001).

4.6 Rolle der DXR-Induktion und der Apocarotinoidakkumulation

Im Biosyntheseweg der akkumulierenden Apocarotinoide sind bislang die frühen Schritte der DXS (Walter et al., 2000, 2002), sowie der DXR (vorliegende Arbeit) im MEP-Weg bezüglich ihrer Regulation charakterisiert worden. Analysen der Phytoendesaturase (PDS) als Carotinoid-spezifischer Stoffwechselschritt zeigten eine Aktivierung des *PDS*-Promotors in kolonisierten Tabakwurzelzellen (Fester et al., 2002b). Dies bedeutet, dass wahrscheinlich die komplette Carotinoidbiosynthese durch Mykorrhizierung induziert wird.

Bislang ist noch unklar, ob die akkumulierenden Apocarotinoide oder ihre Carotinoidvorläufer eine funktionelle Rolle in der Symbiose haben. Jedoch ist eine funktionelle Signifikanz für die Endprodukte eher unwahrscheinlich, da diese in hydrophoben, osmiophilen

Tröpfchen in der Vakuole und im Cytosol von Zellen akkumulieren (Fester et al., 2002a). In mykorrhizierten Maiswurzeln waren geringe Mengen an ζ -Carotin messbar, die in nichtmykorrhizierten Wurzeln nicht detektiert wurden (Fester et al., 2002b). Diese Ergebnisse sprechen für einen schnellen metabolischen Fluss durch diesen Stoffwechselweg, da die Mengen an akkumulierenden Apocarotinoiden sehr hoch sind. Durch Hemmung der Carotinoidbiosynthese im PDS-Schritt mit Hilfe von Norflurazon konnte eine messbare Akkumulation von Phytoen erreicht werden, die in mykorrhizierten Maiswurzeln etwa fünfmal höher war als in nichtmykorrhizierten Wurzeln (Fester et al., 2002b).

Weitere Hinweise auf eine mögliche funktionelle Rolle von Carotinoiden wurden durch Experimente mit den Maismutanten *all* (*albescens plant 1*) und *y9* (*pale yellow 9*) erhalten. Beide Mutanten sind Carotinoid-defizient und zeigen nach Mykorrhizierung keine Akkumulation von Mycorradicin (Fester et al., 2002b). Während die Struktur der Arbuskeln in den Wurzeln beider Mutanten unverändert blieben, war ihre Anzahl im Vergleich zur Situation in Wildtypwurzeln stark reduziert (Fester et al., 2002b). Da beide Mutanten aber wahrscheinlich keine volle Photosynthesekapazität aufweisen, kann ein sekundärer Effekt der schlechteren Versorgung mit Photosyntheseprodukten auf die Ausbildung der Symbiose nicht ausgeschlossen werden.

Carotinoide zeigen starke antioxidative Wirkung. Eine mögliche Funktion in der arbuskulären Mykorrhiza könnte demnach in der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies liegen, die während der Mykorrhizierung in Wurzeln entstehen (Salzer et al., 1999). Diese Sauerstoffspezies sind auch als *second messenger* für die Induktion der Carotinoidbiosynthese beschrieben (Bouvier et al., 1998). Bislang fehlen allerdings eindeutige experimentelle Ergebnisse, die eine klare Definition der Funktion von Carotinoiden in der arbuskulären Mykorrhiza erlauben.

4.7 Weiterführende Arbeiten

Wichtige, bislang noch ungeklärte Fragestellungen im Umfeld der vorliegenden Arbeit betreffen vor allem die schon angesprochene Rolle der (Apo)carotinoide in der Physiologie der arbuskulären Mykorrhiza, sowie Mechanismen der Mykorrhiza-spezifischen Genregulation. Bei der Frage nach der physiologischen Funktion der Metabolite oder ihrer Vorläufer erscheint eine Analyse eines sehr späten Stoffwechselschritts sinnvoll. Hier bietet sich die bereits erwähnte regiospezifische Dioxygenase vom CCD-Typ (*carotenoid-cleavage dioxygenase*, Schwartz et al., 2001; vgl. 1.2) an. Ein entsprechender Mykorrhiza-

induzierter cDNA-Klon liegt bereits vor. Neben der Bestimmung der Substratspezifität des kodierten Enzyms ist auch in diesem Fall eine Lokalisierung des Proteins von besonderem Interesse. Durch Colokalisation von CCD und DXR wäre nicht nur eine räumliche, sondern auch eine zeitliche Auflösung der Isoprenoidbiosynthese und der Carotinoidspaltung möglich. Weiterhin wäre die Dioxygenase auch ein ideales Werkzeug für funktionelle transgene Ansätze durch Überexpression oder *silencing*. Insbesondere würde ein erfolgreiches *silencing* der *CCD* zur endgültigen Klärung der Frage beitragen können, ob die akkumulierenden Apocarotinoide selbst eine physiologische Funktion für die Symbiose haben. Weitere interessante Möglichkeiten für funktionelle Analysen ergeben sich durch transgene Ansätze, durch die frühe Schritte der Isoprenoidsynthese beeinflusst werden. Hierfür ist die DXR allerdings eher ungeeignet, da sich durch ein entsprechendes *silencing* auch Auswirkungen auf pflanzliche Primärprozesse, wie Photosynthese, ergeben dürften. Erfolgversprechender wäre deshalb der Einsatz des *DXS2*-Gens, dessen Suppression keine derartig globalen Auswirkungen auf die Pflanze haben dürfte.

Bezüglich der Mechanismen der Mykorrhiza-spezifischen Genregulation liegt das Hauptinteresse momentan auf der Analyse entsprechender Promotoren. Nach der Klonierung und Sequenzierung des kodierenden genomischen Fragmentes von *ZmDXR* wäre die Isolierung des Promotors und die Identifizierung von *cis*-aktiven Elementen der nächste logische Schritt. Interessant wäre insbesondere der Vergleich des *DXR*-Promotors mit dem Promotor des *DXS2*-Gens. Während der *DXR*-Promotor nicht nur in mykorrhizierten Wurzeln, sondern auch in allen anderen untersuchten Geweben aktiv zu sein scheint, ist die Aktivität des *DXS2*-Promotors wahrscheinlich auf mykorrhizierte Wurzeln beschränkt. Erste potentielle *cis*-aktive Elemente, sog. MRR (*mycorrhiza and resistance related*)-Regionen, wurden kürzlich in *Solanum tuberosum* (Rausch et al., 2001) und *M. truncatula* (Harrison et al., 2002) beschrieben. Innerhalb des DFG-Schwerpunkts 1084 (Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen), in dem die vorliegende Arbeit entstanden ist, sind einige weitere Promotorsequenzen Mykorrhiza-induzierter Gene für vergleichende Studien verfügbar (Frühling et al., 1997; Hohnjec et al., 2003; Wulf et al., 2003), so dass eine Identifizierung Mykorrhiza-spezifischer Promotorelemente möglich erscheint.

5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Klonierung, Charakterisierung und Lokalisierung einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR), eines Enzyms des plastidären Methylerythritolphosphat-Wegs der Isoprenoidbiosynthese, aus *Zea mays*. Bisherige Untersuchungen hatten eine erhöhte Transkriptakkumulation eines *DXR*-Gens in Maiswurzeln im Laufe der Kolonisierung durch arbuskuläre Mykorrhizapilze gezeigt, die mit der Akkumulation von Apocarotinoiden in den kolonisierten Wurzeln einhergeht.

- Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurde mit Hilfe einer heterologen Sonde eine Reihe *DXR*-ähnlicher Klone aus einer cDNA-Bank von mykorrhizierten Maiswurzeln isoliert. Sequenzanalysen ergaben für einige der Klone unvollständige offene Leserahmen, so dass sich alle weiterführenden Analysen und Arbeiten auf den Klon *ZmDXR33* mit einem durchgängigen Leserahmen von 1419 bp und einem abgeleiteten Protein von 473 Aminosäuren konzentrierten. Der Klon zeigt sehr hohe Sequenzidentitätswerte auf Aminosäureebene zu bereits bekannten pflanzlichen *DXR*-Sequenzen (bis zu 95 %) und enthält ein putatives N-terminales Plastidenimportsignal, das 48 Aminosäuren umfasst.
- Heterologe Expression des Klons als His-Tag-Konstrukt in *Escherichia coli* ermöglichte die grobe Anreicherung des rekombinanten Proteins und die funktionelle Identifizierung als *DXR* durch Enzymassays. Die Spezifität des gemessenen NADPH-Umsatzes für eine *DXR*-Reaktion konnte durch Hemmung der Reaktion mit Hilfe des *DXR*-spezifischen Inhibitors Fosmidomycin belegt werden.
- Die Überexpression des rekombinanten Proteins in *E. coli* lieferte genügend Antigen für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das *DXR*-Protein. Das resultierende Serum hat eine Sensitivität von weniger als 7 pg Antigen und zeigte leichte Kreuzreaktivität in Maisproteinextrakten. Nach einer Affinitätsreinigung an immobilisiertem Antigen wurde nur noch eine einzelne Bande mit dem korrekten Molekulargewicht der Mais-*DXR* in Wurzelextrakten detektiert.
- Expressionsanalysen bestätigten die Erhöhung der Transkriptakkumulation für *ZmDXR* in Wurzeln durch Mykorrhizierung. Transkripte waren auch in photosynthetisch aktiven Blättern, sowie in Keimlingen nachweisbar. Die differentielle Akkumulation von *ZmDXR* in Maiswurzeln konnte auch auf Proteinebene verifiziert werden. Eine genomische DNA-Blotanalyse führte zu dem Ergebnis, dass *ZmDXR*

höchstwahrscheinlich in einer sehr niedrigen Kopienanzahl im Maisgenom vorliegt.

- Immunlokalisierungsstudien in Maiswurzeln belegten zunächst, dass die in Northern- und Western-Blots ermittelten erhöhten Akkumulationen von *DXR*-Transkripten und *DXR*-Protein keine systemischen Effekte in mykorrhizierten Wurzeln sind, sondern lokal auf Arbuskel-haltige Zellen beschränkt sind. *DXR*-enthaltende Plastiden sind in solchen Zellen durch *stromules* zu einem Netzwerk verbunden, das die Arbuskeloberfläche umgibt. Dagegen finden sich in nichtkolonisierten (also Arbuskel-freien) Zellen einzelne markierte Plastiden im Cytoplasma der Zellen, sowie Aggregationen um den Zellkern. Die Dynamik der Arbuskelentwicklung in einer kolonisierten Zelle spiegelt sich auch in der Entwicklung des plastidären Netzwerkes wider. Der höchste Vernetzungsgrad wird dabei um voll entwickelte, hochaktive Arbuskel erreicht. Die höchste Markierungsintensität der Plastiden scheint dagegen in Richtung einer Phase des beginnenden Arbuskel- und Netzwerkabbaus hin verschoben zu sein.
- Im Gegensatz zu anderen charakterisierten und lokalisierten Proteinen in der arbuskulären Mykorrhiza ist die *DXR* während fast allen Entwicklungsstadien von Arbuskeln aktiv. Die Rolle der *DXR*-Induktion sowie der Akkumulation der Apocarotinoide bleibt jedoch weiter unklar. Eine funktionelle Signifikanz der Apocarotinoide selbst ist aufgrund cytologischer Befunde unwahrscheinlich, so dass Carotinoide als ihre direkten Vorläufer eher als die funktionellen Moleküle angesehen werden.

Der Schwerpunkt weiterführender Arbeiten wird zum einen auf einer Ermittlung der physiologischen Rolle der (Apo)carotinoide für die arbuskuläre Mykorrhiza liegen. Hierfür bieten sich mit den bislang charakterisierten Schritten der frühen Isoprenoidsynthese bzw. mit dem noch zu analysierenden putativen oxidativen Spaltungsschritt in der späten Apocarotinoidbiosynthese zwei vielversprechende Ansatzpunkte für Gensuppressions- bzw. Überexpressionsansätze in transgenen Pflanzen. Weiterhin sind die Mechanismen der Mykorrhiza-spezifischen Genregulation von besonderem Interesse. Vergleichende Promotorstudien sollen hier zur Identifizierung von neuen Mykorrhiza-spezifischen *cis*-aktiven Elementen oder anderen regulatorischen Prinzipien führen.

6. Summary

The main topics of the work described here were the cloning, characterization and localization of a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from the methylerythritol phosphate pathway in isoprenoid biosynthesis in *Zea mays*. Previous investigations had shown an increase in *DXR* transcript accumulation in maize roots upon colonization by arbuscular mycorrhizal fungi, concomitant with the accumulation of apocarotenoids.

- Based on these preliminary data, a number of *DXR*-like clones were isolated from a cDNA library constructed from mycorrhizal maize roots. Sequence analysis revealed interrupted open reading frames for a number of clones. Therefore, all further analyses and experiments were focused on the clone *ZmDXR33*, showing a continuous open reading frame of 1419 bp, resulting in a deduced protein of 473 amino acids. The clone shows high sequence identities on amino acid levels to published plant DXR sequences (up to 95 %) and contains a putative N-terminal plastid import sequence of 48 amino acids.
- Heterologous expression of the clone in *Escherichia coli* allowed a partial purification of the recombinant protein and the functional identification by enzyme assays. Specificity of the measured NADPH consumption for the DXR reaction could be demonstrated by the use of fosmidomycin, a specific inhibitor of the DXR reaction, completely abolishing NADPH consumption.
- Overexpression of the recombinant protein in *E. coli* led to sufficient antigen for the production of a polyclonal antiserum against the maize DXR. This serum exhibited a sensitivity of less than 7 pg towards the antigen, but showed slight cross reactivity against other proteins in maize extracts. After affinity purification using immobilized antigen, the serum detected a single band with the correct molecular weight of DXR in maize root extracts.
- Expression analysis confirmed the increase in transcript levels of *ZmDXR* in roots upon mycorrhization. Other tissues with *DXR* transcript accumulation are photosynthetic leaves and seedlings of maize. The differential accumulation of *ZmDXR* in maize roots could also be confirmed on the protein level. From the analysis of a genomic DNA blot it is concluded that *ZmDXR* is likely to be a low-copy gene in maize.

- Immunolocalization studies in maize roots revealed that the observed accumulation of DXR is not a systemic effect in mycorrhizal roots, but is limited locally to arbuscule-containing cells. DXR-containing plastids in these cells are interconnected by *stromules*, forming a dense network on the surface of arbuscules. In non-colonized cells DXR-containing plastids are found anisotropically distributed in the cytoplasm layer or in an aggregation around the cell nucleus. The dynamics of arbuscule development are reflected in the formation of the plastidial network as visualized by the DXR antibody. Highest densities of plastid interconnection are detectable around fully mature, presumably highly active arbuscules. However, the highest labeling intensity for DXR protein appears to be slightly shifted to stages of beginning arbuscule and plastid network degeneration.
- In contrast to other characterized and localized proteins in the arbuscular mycorrhizal interaction, the DXR appears to accumulate throughout a broader time window of the arbuscular life cycle. The role of DXR induction and apocarotenoid accumulation in the arbuscular mycorrhizal interaction remains unclear. Based on cytological evidence, a functional significance for the apocarotenoids seems highly unlikely, pointing to the precursor carotenoids as the potential functional principle.

Future work will focus on the physiological significance of the (apo)carotenoids in the arbuscular mycorrhizal symbiosis using transgenic functional approaches. The characterized early steps of isoprenoid biosynthesis and the putative oxidative cleavage step in late apocarotenoid formation represent promising tools for such approaches. Another focus is the mechanism of mycorrhiza-specific gene regulation. Comparative analysis of promoters is expected lead to the identification of novel *cis*-acting elements or other regulatory principles in AM symbiosis.

7. Literatur

Alexander T., Meier R., Toth R., Weber H.C. (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol.* **110**: 363-370

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402

Augé R.M. (2001) Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42

Blancaflor E.B., Zhao L., Harrison M.J. (2001) Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* **217**: 154-165

Bonfante P. (2001) At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *The Mycota IX – Fungal Associations*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Bonfante P., Bergero R., Uribe X., Romera C., Rigau J., Puigdomenech P. (1996) Transcriptional activation of a maize α -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *Plant J.* **9**: 737-743

Bouvier F., Backhaus R.A., Camara B. (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**: 30651-30659

Bradford M.M. (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

Brandle J.E., Richman A., Swanson A.K., Chapman B.P. (2002) Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Mol. Biol.* **50**: 613-622

Brown J.W.S., Simpson C.G. (1998) Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 77-95

Brundrett M.C., Piché Y., Peterson R.L. (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* **62**: 2128-2134.

Budziszewski G.J., Lewis S.P., Glover L.W., Reineke J., Jones G., Ziemnik L.S., Lonowski J., Nyfeler B., Aux G., Zhou Q., McElver J., Patton D.A., Martienssen R., Grossniklaus U., Ma H., Law M., Levin J.Z. (2001) *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**: 1765-1778

Carretero-Paulet L., Ahumada I., Cunillera N., Rodríguez-Concepción M., Ferrer A., Boronat A., Campos N. (2002) Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiol.* **129**: 1581-1591

Chen F., Tholl D., D'Auria J.C., Farooq A., Pichersky E., Gershenzon J. (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **15**: 481-494

Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 1017-1028

Dong Q., Roy L., Freeling M., Walbot V., Brendel V. (2003) ZmDB, an integrated database for maize genome research. *Nucl. Acids Res.* **31**: 244-247

Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**: 78-84

Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**: 978-984

Esen A. (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.* **89**: 264-273

Fester T., Strack D., Hause B. (2001) Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868

Fester T., Hause B., Schmidt D., Halfmann K., Schmidt J., Wray V., Hause G., Strack D. (2002a) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol.* **43**: 256-265

Fester T., Schmidt D., Lohse S., Walter M.H., Giuliano G., Bramley P.M., Fraser P.D., Hause B., Strack D. (2002b) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* **216**: 148-154

Frank B. (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. d. deutschen botan. Gesellsch.* **3**: 128-145

Frühling M., Roussel H., Gianinazzi-Pearson V., Pühler A., Perlick A.M. (1997) The *Vicia faba* leghaemoglobin gene *VfLb29* is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 124-131

Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S, Smith FA (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* **117**: 61-74

Gianinazzi-Pearson V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871-1883

Grolle S., Bringer-Meyer S., Sahn H. (2000) Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. FEMS Microbiol. Lett. **191**: 131-137

Hall T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. **41**: 95-98

Harrison M.J. (1999) Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. J. Exp. Bot. **50**: 1013-1022

Harrison M.J., Dewbre G.R., Liu J. (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell **14**: 2413-2429

Hemmerlin A., Hoeffler J.F., Meyer O., Tritsch D., Kagan I.A., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., Bach T.J. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco Bright Yellow-2 cells. J. Biol. Chem. **278**: 26666-26676

Hoeffler J.F., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway – Mechanistic investigations of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. Eur. J. Biochem. **269**: 4446-4457

Hohnjec N., Perlick A.M., Pühler A., Küster H. (2003) The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucS1* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. Mol. Plant Microbe Interact. **16**: 903-915

Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Türbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H.K., Soldati D., Beck E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. Science **285**: 1573-1576

Jones F.R. (1924) A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *J. Agric. Res.* **29**: 459-470

Kay B.K., Williamson M.P. (2000) The importance of being a proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**: 231-241

Kinden D.A., Brown M.F. (1975) Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. III. Host-endophyte interactions during arbuscule development. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1930-1939

Kinden D.A., Brown M.F. (1976) Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. IV. Host-endophyte interactions during arbuscule degeneration. *Can. J. Microbiol.* **22**: 64-75

Klingner A., Bothe H., Wray V., Marner F.J. (1995) Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry* **38**: 53-55

Köhler R.H., Cao J., Zipfel W.R., Web W.W., Hanson M.R. (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* **276**: 2039-2042

Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H. (1998a) Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**: 7913-7916

Kuzuyama T., Takahashi S., Watanabe H., Seto H. (1998b) Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **39**: 4509-4512

Kuzuyama T., Takahashi S., Takagi M., Seto H. (2000) Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate

biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J. Biol. Chem.* **275**: 19928-19932

Kyte J., Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lange B.M., Croteau R. (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 170-174

Lange B.M., Ghassemian M. (2003) Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.* **51**: 925-948

Laule O., Fürholz A., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Grussem W., Lange M.B. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6866-6871

Lichtenthaler H.K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 47-65

Lingua G., Fusconi A., Berta G. (2001) The nucleus of differentiated root plant cells: modifications induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Eur. J. Histochem.* **45**: 9-20

Lois L.M., Campos N., Putra R.S., Danielsen K., Rohmer M., Boronat A. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2105-2110

- Lois L.M., Rodríguez-Concepción M., Gallego F., Campos N., Boronat A. (2000)** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* **22**: 503-513
- Mahmoud S.S., Croteau R. (2001)** Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8915-8920
- Maier W., Peipp H., Schmidt J., Wray V., Strack D. (1995)** Levels of a terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant Physiol.* **109**: 465-470
- Maier W., Hammer K., Dammann U., Schulz B., Strack D. (1997)** Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta* **202**: 36-42
- Maier W., Schneider B., Strack D. (1998)** Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. *Tetrahedron Lett.* **39**: 521-524
- Maier W., Schmidt J., Wray V., Walter M.H., Strack D. (1999)** The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta* **207**: 620-623
- Maier W., Schmidt J., Nimtz M., Wray V., Strack D. (2000)** Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry* **54**: 473-479
- Meyer I., Grosset J., Chartier Y., Cleyet-Maral J.C. (1988)** Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibody against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* **9**: 704-712

Miller B., Heuser T., Zimmer W. (2000) Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **481**: 221-226

Morton J.B., Benny G.L. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* **37**: 471-491

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350

Radykewicz T., Rohdich F., Wungsintaweekul J., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M.H., Arigoni D. (2000) Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Lett.* **465**: 157-160

Rane M.J., Calvo K.C. (1997) Reversal of the nucleotide specificity of ketol acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis identifies the NADPH binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **338**: 83-89

Rausch C., Daram P., Brunner S., Jansa J., Laloi M., Leggewie G., Amrhein N., Bucher M. (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**: 462-466

Redecker D., Kodner R., Graham L.E. (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921

Reuter K., Sanderbrand S., Jomaa H., Wiesner J., Steinbrecher I., Beck E., Hintz M., Klebe G., Stubbs M.T. (2002) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 5378-5384

Rodríguez-Concepción M., Ahumada I., Diez-Juez E., Sauret-Güeto S., Lois L.M., Gallego F., Carretero-Paulet L., Campos N., Boronat A. (2001) 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.* **27**: 213-222

Rodríguez-Concepción M., Boronat A. (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **130**: 1079-1089

Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**: 517-524

Salzer P., Corbière H., Boller T. (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**: 319-325

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Press, New York

Schneider G., Jensen E., Spray C.R., Phinney B.O. (1992) Hydrolysis and reconjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* **89**: 8045–8048

Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevart J.A.D., McCarthy D.R. (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874

Schwartz S.H., Qin X., Zeevaart J.A.D. (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 25208-25211

Schwarz M.K. (1994) *Terpenbiosynthese in Ginkgo biloba*. Dissertation ETH Zürich, Schweiz

Schwender J., Müller C., Zeidler J., Lichtenthaler H.K. (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. **455**: 140-144

Smith S.E., Read D.J. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. 2. Aufl. Academic Press, New York

Sprenger G.A., Schörken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A.A., Taylor S.V., Begley T.P., Bringer-Meyer S., Sahn H. (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 12857-12862

Staiger C.J. (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **51**: 257-288

Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., Seto H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: **95**: 9879-9884

Tobin E.M. (1997) Renewing an old view of chloroplasts. Trends Plant Sci. **2**: 405–406

Veau B., Courtois M., Oudin A., Chénieux J.C., Rideau M., Clastre M. (2000) Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. Biochim. Biophys. Acta **1517**: 159-163

Walter M.H., Fester T., Strack D. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with the accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. Plant J. **21**: 571-578

Walter M.H., Hans, J., Strack D. (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.* **31**: 243-254

Wiesner J., Borrmann S., Jomaa H. (2003) Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol. Res.* **90**: Suppl. 2: 71-76

Wilkinson D.M. (2001) Mycorrhizal evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 64-65

Wulf A., Manthey K., Doll J., Perlick A.M., Linke B., Bekel T., Meyer F., Franken P., Küster H., Krajinski F. (2003) Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhizal development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 306-314

Yajima S., Nonaka T., Kuzuyama T, Seto H., Ohsawa K. (2002) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J. Biochem.* **131**: 313-317

Ziegler J., Vogt T., Miersch O., Strack D. (1999) Concentration of dilute protein solutions prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **250**: 257-260

Lebenslauf

Name: Joachim Hans
Anschrift: Ernst-Moritz-Arndt-Str. 3
06114 Halle/Saale
Geburtsdatum/-ort: 16.07.1971 in Ottweiler/Saar

Werdegang:

1978-1982 Grundschole Oberthal/Saar
1982-1991: Arnold-Janssen-Gymnasium St. Wendel

1991-1992: Wehrdienst

WS 92/93-SS 98 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
WS95/96-SS96 Austauschstudent (ERASMUS-Programm) an der University of Sussex in Brighton/England

09/98-05/99 Diplomarbeit am Lehrstuhl Ökologische Physiologie der Pflanzen (Prof. Hampp): „Proteomanalytik an Ektomykorrhizen: Versuche zur analytischen und präparativen Darstellung von Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese im Mikromaßstab“

ab 06/99 Arbeit an der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Sekundärstoffwechsel (Prof. Strack) am IPB Halle

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 07.11.2003