

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie beleuchtet den Oligomerisierungsstatus pflanzlicher Membranproteine

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

vorgelegt von

Julian Lehmann

geboren in Nürtingen

Würzburg, Februar 2020



Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie beleuchtet den Oligomerisierungsstatus pflanzlicher Membranproteine

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Geiger

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Eidesstattliche Erklärungen

nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Hochauflösende Fluoreszenz-mikroskopie beleuchtet den Oligomerisierungsstatus pflanzlicher Membranproteine“, eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten, bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen beziehungsweise Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Super-resolution microscopy elucidates the stoichiometry of plant membrane proteins” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student

Zusammenfassung

SLAC/SLAH Anionenkanäle, die zur Familie der langsamen Anionenkanäle gehören, repräsentieren Schlüsselproteine in der pflanzlichen Stressantwort. Neben ihrer Aufgabe in Stresssituationen, ist eine Untergruppe der Kanäle für die Beladung der Leitgefäße mit Nitrat und Chlorid in der Stele der Pflanzenwurzeln verantwortlich. Biophysikalische und pflanzenphysiologische Studien stellten heraus, dass vor Allem der Anionenkanal SLAH3 für die Beladung der Xylem Leitgefäße mit Nitrat und Chlorid verantwortlich ist. Ihm zur Seite gestellt werden noch die elektrisch inaktiven Homologe SLAH1 und SLAH4 in der Wurzel exprimiert. Sie steuern die Aktivität von SLAH3 durch die Assemblierung zu SLAH1/SLAH3 oder SLAH3/SLAH4 Heteromeren. Neben der Kontrolle durch Heteromerisierungsereignisse, werden SLAH3 Homomere sehr spezifisch und schnell durch zytosolische Ansäuerung aktiviert. Obwohl bereits die Kristallstruktur des bakteriellen Homologs *HiTehA* zu pflanzlichen SLAC/SLAH Anionenkanälen bekannt ist, welche *HiTehA* als Trimer charakterisiert, sind die Stöchiometrie und der Polymerisierungsgrad der pflanzlichen SLAC/SLAHs bisher noch unbekannt.

Die Fluoreszenzmikroskopie umfasst viele etablierte Anwendungsmethoden, wie die konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM), Techniken mit verbesserter Auflösung, wie die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) und hochauflösende Methoden, welche durch die Lokalisationsmikroskopie (z.B. *d*STORM und PALM) oder die Expansionsmikroskopie (ExM) vertreten werden. Diese unterschiedlichen Mikroskopiemethoden ermöglichen neue Einblicke in die Organisation von Proteinen in biologischen Systemen, die bis auf die molekulare Ebene hinunterreichen. Insbesondere im Bereich der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie sind im Gegensatz zu tierischen Fragestellungen bisher jedoch nur wenige Untersuchungen in pflanzlichen Geweben durchgeführt worden.

Die Lokalisationsmikroskopie ermöglicht die Quantifizierung einzelner Moleküle in nativen Systemen und lässt überdies Rückschlüsse auf den Polymerisierungsgrad von Proteinen zu. Da Poly- und Heteromerisierung von Proteinen oftmals mit der Funktionalität eines entsprechenden Proteins einhergeht, wie es bei den SLAC/SLAH Anionenkanälen der Fall ist, wurden in dieser Arbeit PALM-Messungen zur Untersuchung des Polymerisierungsgrades und Interaktionsmuster der Anionenkanäle

angewendet. Ferner wurden Expressionsmuster der SLAC/SLAHs untersucht und zudem Mikroskopieanwendungen im Pflanzengewebe etabliert und verbessert.

In Bezug auf die Mikroskopieanwendungen konnten wir in *Arabidopsis thaliana* (*At*)-Wurzeln die polare Verteilung von PIN-Proteinen mittels SIM bestätigen und die gruppierte Verteilung in der Plasmamembran am Zellpol auflösen. In Wurzelquerschnitten war es möglich, Zellwände zu vermessen, den Aufbau der Pflanzenwurzel mit den verschiedenen Zelltypen zu rekonstruieren und diesen in Zusammenhang mit Zellwanddicken zu bringen. Anhand dieser Aufnahmen ließ sich die Auflösungsgrenze eines SIM-Mikroskops bestimmen, weshalb diese Probe als Modellstruktur für Auflösungsanalysen, zur Kontrolle für die korrekte Bildverarbeitung bei hochauflösender Bildgebung und andere Fragestellungen empfohlen werden kann.

Für die Expansionsmikroskopie in pflanzlichen Proben konnten ein enzym- und ein denaturierungsbasiertes Präparationsprotokoll etabliert werden. Dabei wurden ganze *At*-Setzlinge, Wurzelabschnitte und Blattstücke gefärbt, expandiert und mit zwei bis drei Mal verbesserter Auflösung bildlich dargestellt. In diesem Zusammenhang waren Aufnahmen ganzer Wurzel- und Blattproben mit beeindruckender Eindringtiefe und extrem geringem Hintergrundsignal möglich. Zudem wurden die Daten kritisch betrachtet, Probleme aufgezeigt, gewebespezifische Veränderungen dargestellt und limitierende Faktoren für die ExM in Pflanzenproben thematisiert.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der SLAC/SLAH Proteine. SLAH2 wird in den Wurzeln vornehmlich in Endodermis- und Perizykelzellen exprimiert, was anhand verschiedener *At*-SLAH2-YFP-Mutanten untersucht werden konnte. Dies unterstützt die Annahme, dass SLAH2 bei der Beladung der Leitgefäße mit Nitrat maßgeblich beteiligt ist. Es ist denkbar, dass SLAH2 ebenfalls eine wachstumsbeeinflussende Funktion über die Regulation von Nitratkonzentrationen zugeschrieben werden kann. Darauf deuten vor allem die verstärkte Expression von SLAH2 im Bereich der Seitenwurzeln und die heterogene Expression in der Elongations-, Differenzierungs- und meristematischen Zone hin. Die Membranständigkeit von SLAH4 konnte nachgewiesen werden und FRET-FLIM Untersuchungen zeigten eine hohe Affinität von SLAH4 zu SLAH3, was die beiden Homologe als Interaktionspartner identifiziert.

Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades mittels PALM wurden die pflanzlichen Anionenkanäle in tierischen COS7-Zellen exprimiert. Die elektrophysiologische Funktionalität der mEOS2-SLAC/SLAH-Konstrukte wurde mit Hilfe von Patch-Clamp-Versuchen in COS7-Zellen überprüft. Um Expressionslevel, Membranständigkeit und die Verteilung über die Membran der SLAC/SLAHs zu verifizieren, wurden dSTORM-Aufnahmen herangezogen

Schließlich ermöglichten PALM-Aufnahmen die Bestimmung des Polymerisierungsgrades der SLAC/SLAH Anionenkanäle, die stöchiometrischen Veränderungen bei Heteromerisierung von SLAH3 mit SLAH1 oder SLAH4 und auch der Einfluss einer zytosolischer Ansäuerung auf den Polymerisierungsgrad von SLAH3 Homomeren.

Zudem weisen die Oligomerisierungsanalysen von SLAH3-Mutanten darauf hin, dass die Aminosäuren Histidin His330 und His454 entscheidend an der pH-sensitiven Regulierung von SLAH3 beteiligt sind.

Durch die erhobenen Daten konnten also entscheidende, neue Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen von pflanzlichen Anionenkanälen auf molekularer Ebene gewonnen werden: Unter Standardbedingungen liegen SLAC1, SLAH2 und SLAH3 hauptsächlich als Dimer vor. Auf eine zytosolische Ansäuerung reagiert ausschließlich SLAH3 mit einer signifikanten stöchiometrischen Veränderung und liegt im aktiven Zustand vor Allem als Monomer vor. Der Oligomerisierungsgrad von SLAC1 und SLAH2 bleibt hingegen bei einer zytosolischen Ansäuerung unverändert. Ferner kommt es bei der Interaktion von SLAH3 mit SLAH1 oder SLAH4 zur Formierung eines Heterodimers, welches unbeeinflusst durch den zytosolischen pH bleibt. Im Gegensatz dazu bleiben die elektrisch inaktiven Untereinheiten SLAH1 und SLAH4 monomerisch und assemblieren ganz spezifisch nur mit SLAH3. Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere PALM erlaubt es also Heteromerisierungsereignisse und Änderungen im Polymerisierungsgrad von Membranproteinen wie den SLAC/SLAHs auf molekularer Ebene zu untersuchen und lässt so Rückschlüsse auf physiologische Ereignisse zu.

Summary

Anion channels of the slow anion channel family (SLAC/SLAH) are general master switches of plant stress responses. In addition a subgroup of channels load the vascular tissue in roots with nitrate and chloride. The activity of the main nitrate and chloride loading anion channel, SLAH3, is controlled by heteromerization with the electrophysiologically silent subunits SLAH1 and SLAH4 or alternatively by cytosolic acidification. Although the crystal structure of a bacterial homologue (*HiTehA*) of plant SLAC/SLAH anion channels is already known and suggests a trimeric structure, the stoichiometry and the multimerization level of the plant anion channel counterparts are still undiscovered.

Fluorescence microscopy encompasses numerous well-established application methods like confocal laser scanning microscopy (CLSM), high resolution techniques like structured illumination microscopy (SIM) and super-resolution microscopy represented by single molecule localization microscopy (e.g. *d*STORM and PALM) or recently upcoming methods like expansion microscopy (ExM). These different application methods open new fields of insight into the biological organization of proteins, even down to the molecular level. In comparison to faunal studies, very little floral enquiries have been conducted, especially in the super-resolution-sector.

Single-molecule localization microscopy enables individual molecules to be quantified in the native environment and therefore allows conclusions regarding protein stoichiometry. As protein stoichiometry often involves cellular function of the corresponding protein, we used PALM applications and single molecule counting strategies to analyze the stoichiometric distribution of anion channel complexes. Moreover, in this study, expression patterns of the SLAC/SLAH proteins were investigated and different microscopic applications on plant specific issues could be improved and established.

Referring to microscopic applications, we confirmed the polar orientation of PIN-proteins via SIM and succeeded in resolving the clustered distribution in the plasma membrane at the cellular pole. Besides we were also able to measure cellwall dimensions of root cross sections from *Arabidopsis thaliana* seedlings and therefore succeeded in concluding the root architecture, designating the various cell types within the root, comparing them with cellwall thickness and evaluating resolution limits of the SIM microscope. Due to these reasons, this specimen can be recommended as a model structure for resolution analyses,

control measurements regarding tissue-intactness after image processing for super-resolution images, or further questions.

We turned out to establish two different protocols for ExM-studies in plants. One is based on enzymatic digestion and the other one on denaturation. We were able to label, expand and image whole *At*-seedlings, root- and leaf segments and thereby improved the resolution 2-3 fold. In this regard we managed to comprehensively depict the intact structure of leaves and roots with impressive penetration depth and extremely low background. We also examined our data and identified tissue-specific changes, discuss problems and possible limits of ExM in plants.

The major part of this work was the investigation of SLAC/SLAH proteins. The expression of SLAH2 in roots is mainly located in endodermal and pericycle cells which was observed in various *At*-SLAH2-YFP mutants. Thus, strengthening the hypothesis, that SLAH2 has a major role in loading the vascular tissue with nitrate. The heterogeneous expression levels of SLAH2 in the meristematic-, elongation- and differentiation zone and moreover the upregulation in areas of lateral root formation also suggests that SLAH2 has an effect on plant growth by regulating nitrate levels. SLAH4 is located in the plasma membrane and FRET-FLIM measurements showed a high affinity to SLAH3, validating the two homologues as interaction partners.

For PALM-stoichiometry analyses, the plant anion channels were expressed in mammalian COS7-cells, in order to avoid endogenous falsification of the stoichiometries, as well as impractical reasons of PALM imaging in plant tissue. Hence, checking the electrophysiological functionality of mEOS2-SLAC/SLAH constructs via patch-clamp measurements. *d*STORM-measurements were used to verify expression levels, correct membrane-association and the distribution of the SLAC/SLAHs in COS7 cells.

We determined the multimerization level of SLAC/SLAHs upon cytosolic acidification and monitor stoichiometric changes upon heteromerization of SLAH3 with SLAH1 and SLAH4.

On the basis of our data the following valuable new insights into the regulation mechanisms of plant anion channels were revealed: under control conditions, SLAC1, SLAH2 and SLAH3 are mainly depicted as dimers. Upon cytosolic acidification with NaOAc the stoichiometries of SLAC1 and SLAH2 remained unchanged, whereas the amount of dimeric SLAH3 is significantly reduced and shifts to a mainly monomeric distribution. It could also be assessed that SLAH3 interacts with SLAH1 or SLAH4, thereby forming a heterodimer, which is barely separable by acidification. In contrast, for SLAH1 and SLAH4 no affinity was observed. Moreover, the stoichiometries of different SLAH3-mutants indicated a crucial role of the amino acids histidin His330 and His454 in the pH-sensitive regulation of SLAH3.

Hence, super-resolution microscopy, especially PALM allows the quantification of polymerization- and heteromerization-levels of proteins like the SLAC/SLAH anion-channels on the molecular level and therefore enabling physiological conclusions.

Abkürzungen

A:	<u>A</u> lanin
AA:	<u>A</u> cryl <u>a</u> mid
ABA:	Pflanzliches Phytohormon Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
Abb.:	<u>A</u> bbildung
abs:	<u>A</u> bsorption
AcX:	Succinimidyl-ester der 6-((Acryloyl)amino)hexansäure (<u>A</u> cryloyl- <u>X</u> , SE)
Ar:	<u>A</u> rgon (Laser)
AS:	Aminosäure
<i>At</i> :	<i>A</i> rabidopsis <i>t</i> haliana
Aux:	Pflanzliches Phytohormon <u>A</u> uxin
BC:	O ⁶ -Benzylcytosin-Substrat
BG:	O ⁶ -Benzylguanin-Substrat
Bis-AA:	<u>B</u> is- <u>A</u> cryl <u>a</u> mid
BLUS1:	<i>blue light signalling 1</i> Proteinkinase
bp:	<u>B</u> asenpaare
BPC:	Nukleasefreies Wasser
BSA:	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Bsp.:	<u>B</u> eispiel
bspw.:	<u>b</u> eispiels <u>w</u> eise
C:	Cluster (Gruppierung)
CBL:	Calcineurin B-ähnliche Proteinkinase (<i>calcineurin B-like</i>)
CIPK:	mit <u>C</u> BL- interagierende <u>P</u> rotei <u>n</u> ki <u>n</u> asen
CFW:	<u>C</u> alcofluor- <u>w</u> eiß (<i>fluorescent brightener</i>)
Cl ⁻ :	Chloridion
CLSM:	Konfokales Laserrastermikroskop (<i>confocal laser scanning microscope</i>)
cluster:	Gruppierung
co:	<u>K</u> ortex
CPK:	Calcium-abhängige Proteinkinase
ddH ₂ O:	destilliertes Wasser
DEVC:	Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (<i>double-electrode-voltage clamp</i>)

Abkürzungen

DPSSL:	Dioden gepumpter Festkörper-Laser (<i>diode pumped solid state laser</i>)
DS:	Dichroitischer Spiegel
dSTORM:	<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i>
EF:	Emissionsfilter
Em.:	Emissionen
en:	Endodermis
ep:	Epidermis
Epi:	Blichtungsmodus Durchlicht (<i>epifluorescence</i>)
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
etc.:	<i>et cetera</i> (und die übrigen)
ExM:	Expansionsmikroskopie
F:	Phenylalanin
F ₀ :	Singulett-Grundzustand eines Farbstoffs
F ₁ :	Angeregter Zustand eines Farbstoffs
F ₃ :	Tripletzustand eines Farbstoffs
F•:	Semireduziertes Farbstoffradikal (farbloser Zustand)
F _H :	Leukozustand eines Farbstoffs (farbloser Zustand)
FA:	Formaldehyd
fl:	Fluoreszenz
FLIM:	Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
FP:	Fluoreszierendes Protein
fr:	Einzelbilder (<i>frames</i>)
FRET:	Förster- Resonanzenergieübertragung
FRET-FLIM:	Förster-Resonanzenergieübertragung in Kombination mit Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (<i>förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
FWHM:	Halbwertsbreite (<i>full width of half maximum</i>)
GA:	Glutaraldehyd
Gent:	Gentamycin
GFP:	Grün- fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GHR1:	<i>guard cell hydrogen peroxide resistant 1</i> Proteinkinase
H:	Histidin
HeNe:	Helium-Neon (Laser)
HA:	SLAH3- Mutante bei welcher bestimmte Histidine (H) durch Alanin (A) ersetzt wurden
HF:	SLAH3- Mutante bei welcher bestimmte Histidine (H) durch Phenylalanin (F) ersetzt wurden
HILO:	Belichtungsmodus Lichtbrechung (<i>highly inclined and laminated optical sheet</i>)

His:	<u>H</u> istidin
HK:	SLAH3- Mutante bei welcher bestimmte Histidine (<u>H</u>) durch Lysin (<u>K</u>) ersetzt wurden
HT1:	<i>high leaf temperature 1</i> Proteinkinase
IAA:	Pflanzliches Phytohormon Indol-3-Essigsäure (<i>indol-3-acetic acid</i>)
isc:	<i>intersystem crossing</i>
K:	Lysin
K ⁺ :	Kaliumion
k:	(Schalt-/Reaktions-)Rate
Kan:	<u>K</u> anamycin
KAT1:	Kaliumkanal 1
Konz.:	<u>K</u> onzentration
konv.:	<u>k</u> onvertiert
Lokal.:	<u>L</u> okalisationen
LSM:	Laserrastermikroskop (<i>laser scanning microscope</i>)
max:	<u>M</u> aximum; <u>m</u> aximal
min:	<u>M</u> inimum; <u>m</u> inimal
MPK:	<u>M</u> itogen-aktivierte <u>P</u> rotei <u>n</u> kinase
mxy:	<u>M</u> etaxylem
MTSB:	Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer (<i>microtubule-stabilizing buffer</i>)
MW:	<u>M</u> ittelwert
Na ⁺ :	Natriumion
NA:	<u>N</u> umerische <u>A</u> pertur eines Objektivs
n. Den.:	<u>n</u> ach <u>D</u> enaturierung (bzgl. ExM Probenvorbereitung)
n. Vd.:	<u>n</u> ach <u>V</u> erdau (bzgl. ExM Probenvorbereitung)
Nb:	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NO ₃ ⁻ :	Nitrat
o. ä.:	<u>o</u> der <u>ä</u> hnliche
OD ₆₀₀ :	optische <u>D</u> ichte bei 600 nm
OPSL:	Optisch gepumpter Halbleiterlaser (<i>optically pumped semiconductor laser</i>)
ox:	<u>O</u> xidation (chemisch)
P2A:	<u>P</u> 2A-selbst-schneidendes Peptid
PALM:	Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (<i>Photoactivated localization microscopy</i>)
pc:	<u>P</u> rocambium
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pe:	<u>P</u> erizykel
phl:	<u>P</u> hloem
PI:	<u>P</u> ropidium <u>I</u> odid
PIN:	Auxin-efflux-Karrier Komponente (<i>Auxin efflux carrier component</i>)

Abkürzungen

PK:	<u>P</u> roteinase <u>K</u>
PPT:	2 <u>P</u> ipette <u>n</u> technik (s. Abb. 3.2)
px:	<u>P</u> ixel
pxy:	<u>P</u> ro <u>t</u> o <u>x</u> ylem
red:	<u>R</u> eduktion (chemisch)
RHC1:	<i>resistant to high CO₂ I</i> Proteinkinase
Rif:	<u>R</u> ifampicin
ROI:	Region von Interesse (<i>region of interest</i>)
ROS:	Hochreaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RS ⁻ :	Oxidiertes Thiol (<u>R</u> est mit <u>S</u> ulfhydrylanion; chemisch)
RSH:	Thiol (<u>R</u> est mit funktioneller <u>S</u> ulfhydrylgruppe; chemisch)
RT:	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur (25°C)
s. o.:	siehe <u>o</u> ben
SA:	<u>S</u> odium- <u>A</u> crylat
SDS:	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIM:	Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (<i>structured illumination microscopy</i>)
SLAC:	Langsamer Anionenkanal (<i>Slow anion channel</i>)
SLAH:	Homolog eines langsamen Anionenkanals (<i>Slow anion channel homolog</i>)
STED:	Stimulierte Emissionsmikroskopie (<i>stimulated emission depletion</i>)
Tab.:	Tabelle
TCSPC:	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (<i>time-correlated single photon counting</i>)
.tif:	Dateiformat zur Speicherung von Bilddaten (<i>tagged image file</i>)
TIRF:	Belichtungsmodus Totalreflektion (<i>total internal reflection fluorescence</i>)
u.a.:	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
ÜN:	<u>Ü</u> ber <u>N</u> acht (min. 12 h)
UpM:	Nenn <u>d</u> rehzahl (<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute)
USER:	Uracil-Entfernungsmethode (<i>uracil-specific excision reagent cloning technique</i>)
usw.:	<u>u</u> nd <u>s</u> o <u>w</u> eiter
v. Gel.:	<u>v</u> or <u>G</u> elierung (bzgl. ExM Probenvorbereitung)
verf.:	<u>v</u> er <u>f</u> olgen
vgl.:	<u>v</u> er <u>g</u> leiche
WS:	<u>W</u> urzel <u>s</u> pitze
YFP:	Gelb- fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
Z:	Zellen
Z-Stack:	Bilderstapel in Bezug auf die z-Ebene (ermöglicht die dreidimensionale Darstellung)
λ:	Wellenlänge des Lichts

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärungen.....	i
Zusammenfassung.....	iii
Summary.....	vii
Abkürzungen	ix
Inhaltsverzeichnis	xiii
1 Einleitung und Theoretische Grundlagen.....	1
1.1 Die S-Typ Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie	1
Charakterisierung von SLAC/SLAHs.....	2
1.2 Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie.....	6
Färbemethoden.....	7
Markierung mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen.....	7
Markierung mit Hilfe von Protein-Tags.....	7
Immunfärbungen	9
Markierung mit zielmolekülspezifischen Farbstoffen.....	9
Das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie	9
Bestimmung des Auflösungsvermögens	10
Konfokale Laserrastermikroskopie	12
Förster-Resonanzenergietransferuntersuchungen in Kombination mit Fluoreszenz-lebensdauer Mikroskopie	12
Verbessertes Auflösungsvermögen durch strukturierte Beleuchtung.....	13
Grundlagen der Expansionsmikroskopie	14
Enzymatische Homogenisierung der ExM-Probe	15
Denaturierungsbasierte Homogenisierung der ExM-Probe.....	17
Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie durch die Lokalisation einzelner fluoreszierender Moleküle	18
Grundlagen der Lokalisationsmikroskopie	18

Fluorophore für die dSTORM	20
Fluoreszierende Proteine für die photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM)	20
Rekonstruktion lokalisationsbasierter hochaufgelöster Bilder	22
Messaufbau für die Lokalisationsmikroskopie und Beleuchtungsmodi	22
Beleuchtungsmodi	22
PALM-Messungen zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen.....	23
Grundlagen für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM.....	23
Plasmidkonstrukte für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM.....	25
1.3 Pflanzenanatomie und Molekularbiologie der Pflanzen	26
1.3.1 Struktureller Aufbau der Landpflanzen.....	26
Die Pflanzenwurzel	26
Das Blatt.....	28
1.3.2 Die Pflanzenzelle.....	29
Die Plasmamembran.....	29
Membrantransport	29
Chloroplasten.....	30
Das Zytosol.....	30
Das Zytoskelett.....	30
2 Zielsetzung.....	33
3 Material und Methoden.....	35
3.1 Klonierung und DNA Herstellung	35
Herstellung linearisierter Vektoren	35
In vitro Transkription Polymerase-Kettenreaktion (IVT PCR).....	36
Endonukleaseverdau von methylierter DNA mittels DPN1 und USER-Reaktion....	36
Plasmid-Amplifizierung, Transformation und-Aufreinigung.....	36
3.2 Probenvorbereitung pflanzlicher Präparate.....	39
Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana benthamiana</i>	39
Fixierung von Pflanzengewebe	39
Zellwandverdau und Permeabilisierung von Pflanzengewebe.....	40

3.3 Färbungen von Pflanzenproben.....	40
3.3.1 Fluoreszierende Proteine als Markierung.....	40
Stabile Pflanzenmutanten.....	40
Transiente Transformation von Tabakblättern.....	41
Herstellung kompetenter Agrobakterien.....	41
Transformation der Agrobakterien.....	41
Inokulation von Tabakblättern.....	41
3.3.2 Färbung mit organell-spezifischen Farbstoffen.....	42
Färbung mit Propidium Iodide.....	42
Färbung mit Calcofluor-weiß.....	42
3.3.3 Immunfärbung.....	43
Standardproben.....	44
Expansionsmikroskopie.....	44
Immunfärbung vor der Gelierung.....	44
Immunfärbung nach dem Verdau/Denaturierung der gelierten Probe.....	44
Dünnschnitte.....	44
3.4 Dünnschnitte von Pflanzenwurzeln.....	45
3.5 Expansionsmikroskopie.....	46
Proteine verknüpfen.....	46
Gelierung.....	46
Verdau, Denaturierung und Expansion der ExM Proben.....	47
Enzymatischer Verdau.....	47
Denaturierung.....	47
Expansion.....	47
3.6 Zellkultur und Probenvorbereitung von Säugerzellen.....	49
Färbung von Proben mit Tag.....	49
Probenvorbereitung für PALM Messungen.....	49
3.7 Fluoreszenzmikroskopische Messungen.....	51
3.7.1 Hochauflösende Lokalisationsmikroskopie.....	51
Weitfeldmikroskopieaufbau.....	51
PALM Messungen.....	52
dSTORM Messungen.....	53

3.7.2 CLSM Messungen.....	53
3.7.3 FRET-FLIM Messungen	54
3.7.4 SIM Messungen.....	54
3.8 Patch-Clamp Experimente	55
3.9 Datenauswertung.....	56
3.9.1 Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisations- mikroskopischen Messungen	56
Rekonstruktion lokalisationsmikroskopischer Daten	57
Emissionen verfolgen.....	59
Lokalisationen konvertieren	61
Proteincluster auswählen und Bestimmung der Lokalisationen pro Cluster	61
Histogrammieren und anpassungsspezifische Auswertung.....	63
Anpassungsfunktionen für bekannte Stöchiometrien	63
Gewichtete Anpassungsfunktionen für unbekannte Proteinstöchiometrien	64
3.9.2 Datenauswertung von CLSM und SIM Messungen.....	65
3.9.3 Datenauswertung von FRET-FLIM Messungen	65
3.9.4 Bildbearbeitung und Bildanalyse	65
4 Ergebnisse und Diskussion	67
4.1 Lokalisation von SLAH2 und SLAH4 in funktionellen Unter-einheiten des Pflanzengewebes	68
Identifikation von Referenzstrukturen mittels Standardfärbungen.....	68
Lokalisation von SLAH2 in der <i>At</i> -Wurzel.....	70
Subzelluläre Lokalisation von SLAH4 in der <i>Nb</i> -Blattepidermis	79
4.2 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von Pflanzengewebe und Pflanzenproteinen.....	82
Die polare Verteilung von PIN1 und PIN2 im Wurzelgewebe anhand von SIM Aufnahmen	82
Ultradünnschnitte und SIM Mikroskopie der <i>At</i> -Wurzel	86
<i>d</i> STORM von MT in der <i>At</i> -Wurzel	93
Expansionsmikroskopie von Pflanzengewebe.....	96
Expansionsmikroskopische Untersuchung ganzer <i>At</i> -Setzlinge	96
Strukturelle ExM-Analyse von Chloroplasten in <i>AT</i> -Setzlingen	98

Intaktheitsprüfung und korrekte Expansion von Pflanzengewebe bei ExM-Versuchen.....	100
4.3 FRET-FLIM Analysen von SLAC/SLAH	115
4.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der pflanzlichen Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie mittels Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie	122
Untersuchung der Membranständigkeit von mEOS2 markierten SLAC/SLAHs in COS7-Zellen anhand von CLSM-Aufnahmen.....	123
Verteilung von SLAC/SLAHs über die Plasmamembran.....	125
Patch-Clamp Experimente von SLAH3-mEOS	129
Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von SLAC/SLAH-Proteinen mittels PALM	131
5 Folgerung und Ausblick	151
6 Liste der Publikationen.....	155
Publikationen die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind	155
Publikationen, welche nicht aus dieser Dissertation hervorgegangen sind.....	155
7 Anhang	157
7.1 Bildberechtigungen	157
Abb. 1.1 und Abb. 1.2:.....	157
Abb. 1.3:	158
Abb. 1.5:	158
7.2 Zusätzliche Abbildungen	160
7.3 Liste der Formeln	162
7.4 Liste der Abbildungen.....	163
7.5 Liste der Tabellen.....	165
7.6 Zusatzinformationen	166
Bauteile Weitfeldmikroskop-Aufbau:.....	166
Basisbauteile	166
Laser.....	166
Filter	166
Optische Bauteile	167
7.7 Danksagung.....	169
8 Literaturverzeichnis.....	171

1 Einleitung und Theoretische Grundlagen

Pflanzen haben im Laufe der Evolution eine einzigartige Anpassungsfähigkeit entwickelt, die ihnen die Besiedelung einer Vielzahl von Lebensräumen mit unterschiedlichsten Umwelteinflüssen ermöglicht. Die Anpassung an gegebene Einflüsse durch eine differenzierte Reaktion auf äußere Stressfaktoren ist der Schlüssel für diesen Erfolg. Die Signalkaskaden und Regulierungsmechanismen dieser Stressantworten sind vielseitig und hochkomplex [1], weshalb immer noch viele Bausteine im Wissen darüber fehlen. Eine maßgebliche Rolle bei der pflanzlichen Stressantwort spielen dabei pflanzliche Anionenkanäle.

1.1 Die S-Typ Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie

Durch die Schließzellen der Stomata werden die CO₂-Aufnahme und zugleich der Wasserverlust durch Transpiration reguliert. Den membranständigen Anionenkanälen der Schließzellen wird eine Schlüsselrolle bei der Initiierung des Stomaschlusses zugeschrieben. Zwei Arten von Anionenkanälen konnten dabei mit dem Stomaschluss in Verbindung gebracht werden. Zum einen handelt es sich um die Gruppe der R-Typ Anionenkanäle, welche sehr schnell (innerhalb 50 ms) bei einer Depolarisierung der Plasmamembran aktivieren und durch Hyperpolarisation wiederum schnell deaktivieren [2]. R-Typ Anionenkanäle entlassen hauptsächlich Malat und Sulfat aus dem Zytosol der Schließzellen. Zum anderen konnten S-Typ Anionenkanäle (*slow anion channels/homolog* (SLAC/SLAH)) beschrieben werden, welche sich durch eine sehr langsame De-/Aktivierbarkeit (~10 s) auszeichnen und über eine zeit- und hyperpolarisationsabhängige Deaktivierung verfügen [2]. Wird ein Stomaschluss induziert, dann transportieren diese S-Typ Anionenkanäle Chlorid und Nitrat in den Apoplasten, was wiederum zu einer sehr starken Depolarisation der Plasmamembran führt und den weiteren Stomaschluss initiiert.

Charakterisierung von SLAC/SLAHs

Die Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie in *Arabidopsis thaliana* umfassen SLAC1 und vier Homologe SLAH1-4. SLAC/SLAHs sind sowohl beim Stomaschluss als auch beim Nährstofftransport von Wurzel zu Spross involviert. Die einzelnen Homologe der SLAC/SLAHs zeichnen sich neben unterschiedlichen Expressionsmustern innerhalb der Pflanze (Spross, Schließzellen, Wurzel) zusätzlich durch unterschiedliche Anionen-selektivitäten und Regulationsmechanismen aus. Der Oligomerisierungsgrad von *HiTehA*, einem bakteriellen Ortholog des pflanzlichen S-Typ Anionenkanals SLAC1 (*slow anion channel 1*) konnte in einer Kristallstruktur bereits als Trimer gezeigt werden. Im Gegensatz dazu ist der Polymerisierungsgrad der pflanzlichen S-Typ Kanäle völlig unbekannt [3]. Jedoch konnte ein Strukturmodell entworfen werden, welches Rückschlüsse auf die Funktion bestimmter Aminosäuren im Protein zuließ und auf die Homo-/Heteromerisierungsfähigkeit der pflanzlichen S-Typ Anionenkanäle hindeutet. Unter anderem konnte mit Hilfe gerichteter Mutationen ein Phenylalanin in der Porenregion identifiziert werden, das den Permeationsweg der S-Typ-Kanäle blockiert. Es wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von SLAC/SLAHs mit einer Konformationsänderung einhergeht, wodurch dieses Phenylalanin aus dem Permeationsweg entfernt wird [3].

SLAC1 wird ausschließlich in den Schließzellen exprimiert und ist dort maßgeblich am Stomaschluss beteiligt. SLAC1-Verlustmutanten weisen einen gestörten Stomaschluss auf [4, 5]. SLAC1 ist nitrat- und chloridpermeabel und vermittelt den Anionenausstrom. Die Aktivierung von SLAC1 wird insbesondere durch das Stresshormon Abscisinsäure (ABA) beeinflusst. ABA akkumuliert vornehmlich bei Trocken- [6] und Salzstress [7]. Die SLAC1-Aktivität wird zudem von Umweltstimuli wie CO₂ [8, 9], reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [5, 10], Pathogenen [11, 12] und Rot-/Blaulicht [13, 14] beeinflusst.

Die am besten untersuchte Signalkaskade, die SLAC1 aber auch SLAH3 aktivieren, ist der ABA-Signalweg. Hierbei sind im Wesentlichen vier Komponenten involvierte: Zytoplasmatische ABA-Rezeptoren (RCAR/PYR/PYL, [15]) zur Wahrnehmung von ABA, Protein-Phosphatasen (PP2Cs ABI1/ABI2, [16]), Protein-Kinasen (OST1 / CPKs / CIPK / CBL, [17-20]) und den Anionenkanal SLAC1. Bei der ABA-abhängigen Regulation von SLAC1 werden in Abwesenheit von ABA die Proteinkinasen OST1 (*open stomata 1*) oder CPKs (*calcium-dependent kinases*) durch Proteinphosphatasen (PP2C) inhibiert. Bei Anwesenheit von ABA werden die Proteinphosphatasen durch den ABA-Rezeptorkomplex (ABA-PYR) inhibiert, wodurch OST1/CPKs/CIPK Kinasen aktiv werden, den Kanal SLAC1 phosphorylieren und somit aktivieren. Dabei ist lediglich die ABA-abhängige Aktivierung durch CPKs Ca²⁺-abhängig. Nichtsdestotrotz kann diese Kern-ABA-Signalkaskade mit anderen Signalkaskaden wechselwirken und durch Proteinkinasen, Phosphatasen und Rezeptoren wie CPKs, CIPKs, MPKs, GHR1, HT1, BLUS1, RHC1, etc., moduliert werden. Dadurch wird die Regulation von SLAC1 hochkomplex und kann auf unterschiedlichste Umweltfaktoren spezifisch und flexibel reagieren [21].

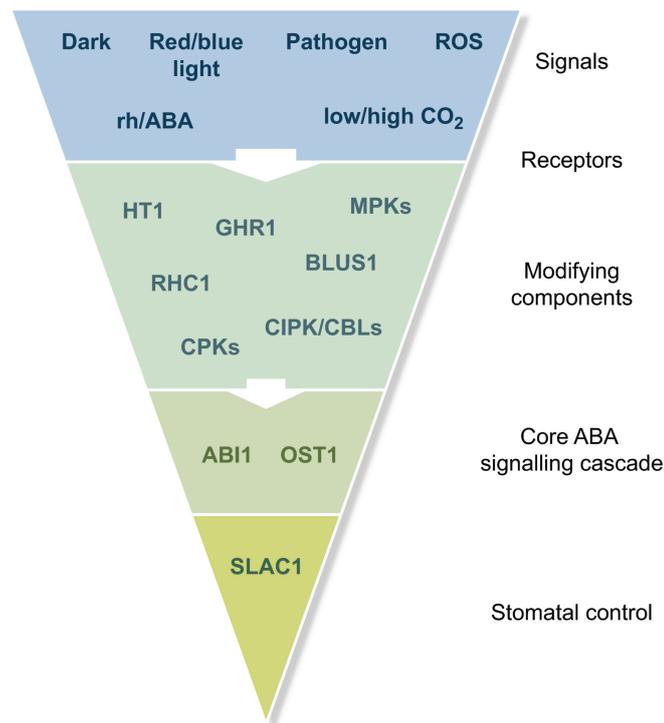


Abb. 1.1: Multisensorisches Modell zur Aktivitätskontrolle von SLAC1. Schließzellen sind multisensorische Modellzellen die durch unterschiedlichste biotische und abiotische Einflüsse die Aktivität von SLAC1 kontrollieren können. Die Bestandteile der ABA-abhängigen Kern-Signalkaskade (*Core ABA signalling cascade*) sind dabei die wesentlichen Regulationsfaktoren von SLAC1. Die externen Signale (Dunkelheit, Rot/Blaulicht, Pathogene, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Abscisinsäure (ABA), CO₂-Konzentration) tragen dabei über signalspezifische Proteinkinasen, Phosphatasen oder Rezeptoren (*modifying components*: CPKs, CIPK/CBLs, MPKs, GHR1, HT1, BLUS1 RHC1) zur Feinabstimmung der Kern-Signalkaskade bei und beeinflussen somit die Aktivität von SLAC1 indirekt. Die Abbildung ist übernommen aus „Hedrich, et al., 2017“ [21].

Die Aufnahme von Wasser, Nährstoffen und Nährsalzen findet bei Landpflanzen über die Wurzeln statt. Die Versorgung der Pflanze mit diesen wird dann über das Xylem bewerkstelligt. Bei der Aufnahme müssen die Nährstoffe die Endodermiszellen und den Casparischen Streifen passieren. Die Beladung des Xylems findet dann durch die Perizykelzellen statt [22]. Der Anatomische Aufbau und die Versorgung der Pflanze wird im Kapitel 1.3 nochmals ausführlich thematisiert. Die Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie spielen bei der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen ebenfalls eine essentielle Rolle.

Der nitrat- und chloridspezifische Anionenkanal SLAH3 ist neben der Expression in Schließzellen auch in der gesamten Pflanze zu finden und unterliegt einer ebenfalls von PYR und PP2C abhängigen Signalkaskade wie SLAC1. SLAH3 wird jedoch nur durch die kalziumabhängigen Proteinkinasen (CPKs und CIPKs) aktiviert und ist zudem von der Verfügbarkeit von extrazellulärem Nitrat abhängig [23]. In Xylemparenchymzellen

der Wurzel konnte außerdem eine Nitrat- und Kinase-unabhängige Aktivierung von SLAH3 durch SLAH1 festgestellt werden. Es wird davon ausgegangen, dass es hierbei zu einer Heteromerisierung der beiden Homologe kommt [24].

SLAH1 ist ausschließlich in den Xylem-Pol-Perizykelzellen der Pflanzenwurzel exprimiert und kolokalisiert dort mit SLAH3. SLAH1 verfügt aber über keine eigene Kanalaktivität und fungiert, soweit bekannt, nur als regulatorische Untereinheit von SLAH3 in *At*. Mittels Förster-Resonanzenergietransferuntersuchungen in Kombination mit Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (FRET-FLIM) [25] konnte die Interaktion der beiden SLAC1-Homologe SLAH1 und SLAH3 (*slow anion channel homolog 1* und *3*) eruiert werden, wobei SLAH1 als stiller, regulierender Faktor von SLAH3 charakterisiert werden konnte. Bei hohen Salzkonzentrationen des Bodens wird die Expression von SLAH1 herunterreguliert und es konnte eine ca. 50 %ige Abnahme der Chloridkonzentration im Xylemsaft von *At*SLAH1-Verlustmutanten im Vergleich zu wildtypischen *At* festgestellt werden [24].

Im Gegensatz zu SLAC1 und SLAH3 ist SLAH2 hochspezifisch permeabel für Nitrat und impermeabel für Chlorid. Die Aktivierung von SLAH2 geht mit einer Phosphorylierung durch CPKs und CIPKs einher [26]. GUS-Lokalisationsstudien zeigten SLAH2-Promoteraktivität in der Stele der Pflanzenwurzel [27], was die Funktion von SLAH2 als Nitratbeladender Kanal des Xylems nahelegt. Detaillierte Funktionsanalysen und Expressionsmuster von SLAH2 in planta sind jedoch bisher nicht beschrieben.

Die physiologische Funktion von SLAH4 bleibt bislang unklar. Für SLAH4 konnten bisher noch keine makroskopischen Anionenströme gemessen werden. Selbst die Lokalisation in der Plasmamembran konnte bisher nur für SLAC1 und SLAH1-3 nachgewiesen werden. Erste Studien lassen Rückschlüsse zu, welche eine vergleichbare Funktion von SLAH4 wie SLAH1 vermuten lassen. Auch SLAH4 scheint eine elektrisch stille, modulatorische Untereinheit zu sein. Allerdings schaltet SLAH4, im Gegensatz zu SLAH1, die Aktivität von SLAH3 ab. Diese Ergebnisse beruhen allerdings ausschließlich auf elektrischen Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (DEVC) im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten in der AG-Geiger.

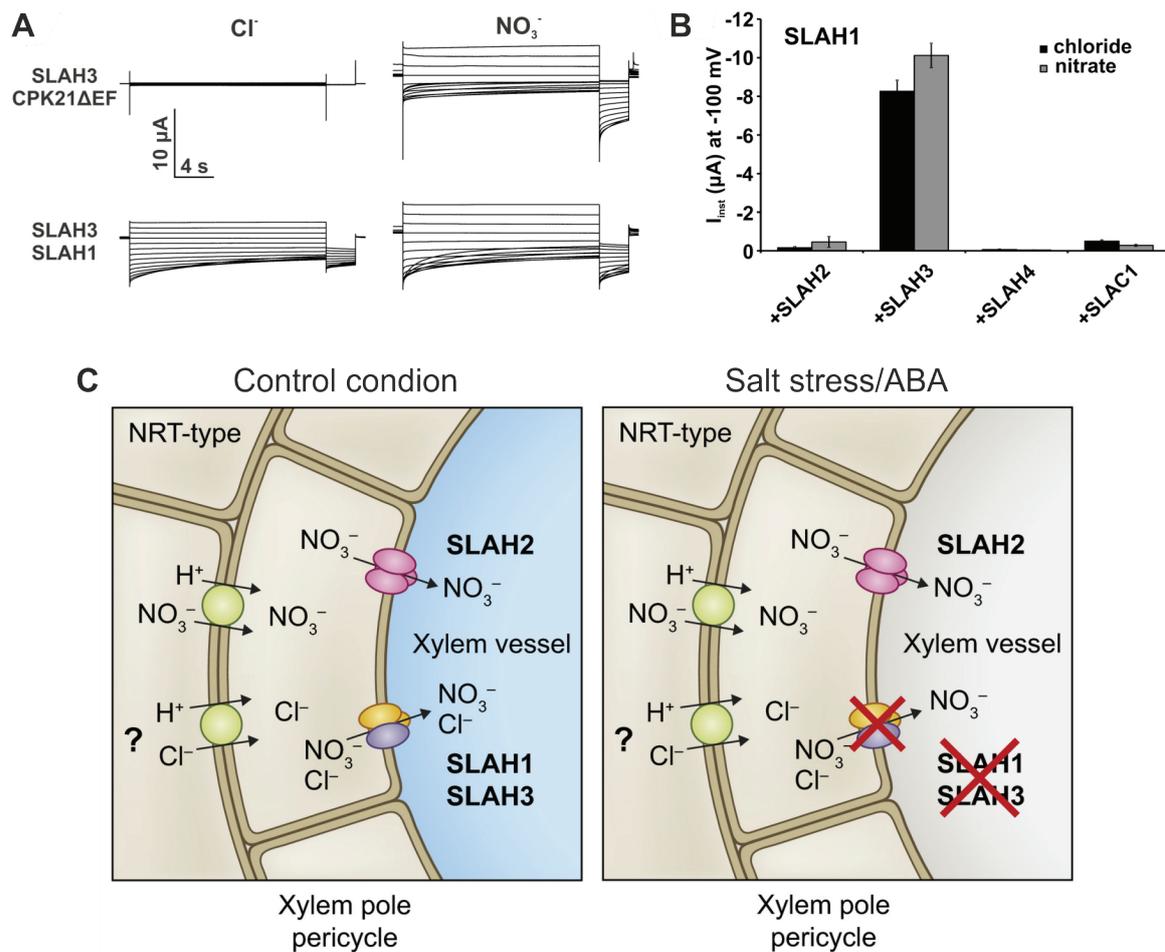


Abb. 1.2: Elektrophysiologische Charakterisierung und Funktionsmodell von SLAH1, SLAH2 und SLAH3. (A) Stromantwort von SLAH3 bei DEVC-Messungen in *Xenopus laevis* Oozyten. Die Messungen wurden in Cl⁻- oder NO₃⁻-haltigen Puffern (30 mM) durchgeführt. (A oben) SLAH3 wird nitratabhängig durch die calciumabhängige Proteinkinase 21 (CPK21ΔEF) aktiviert (CPK21ΔEF ist eine Calcium-unabhängige Variante). (A unten) Die Heteromerisierung von SLAH3 und dem elektrophysiologisch inaktiven SLAH1 führt zu nitrat- und kinase-unabhängigen Anionenströmen sowohl in Chlorid- als auch in Nitrat-basierten Puffern. (B) Instantanströme von Oozyten, welche SLAH1 mit verschiedenen Mitgliedern der SLAC/SLAH-Familie koexprimierten. Unter Abwesenheit von Proteinkinasen sind lediglich mit SLAH3 makroskopische Anionenströme messbar. Aufgenommen bei -100 mV und unter Anwesenheit von 100 mM Cl⁻ oder NO₃⁻. (C) Im Modell zur SLAH-basierten Xylembeladung beladen SLAH2 und SLAH3 mit SLAH1 unter Kontrollbedingungen das Xylemgefäß in der Wurzel mit Cl⁻ und NO₃⁻. In Anwesenheit von ABA/Salzstress wird die Genexpression von SLAH1 und SLAH3 herunterreguliert, worauf der nitratspezifische SLAH2 die Beladung des Xylems mit NO₃⁻ weiterhin gewährleistet. Die Abbildung ist übernommen (A und B) aus „Cubero-Font, et al., 2016“ [24] und (C) aus „Hedrich, et al., 2017“ [21].

Der Oligomerisierungsgrad von identischen Untereinheiten beziehungsweise die Heteromerisierung von unterschiedlichen Untereinheiten kann die Aktivität und die elektrischen Eigenschaften eines Ionenkanals grundlegend verändern und so die Diversität der Aktivierbarkeit von Ionen-leitenden Kanälen stark erhöhen [28]. Die Aktivierbarkeit von SLAH3 durch SLAH1 [24] und die Röntgen-Kristallstruktur von *HvTehA* [3] legten die Vermutung nahe, dass auch die pflanzlichen SLAC/SLAHs als Homo- oder Heteromere vorliegen können. Neben einer Heteromerisierung mit einem sekundären Interaktionspartner, kann auch die Protonenkonzentration der Umgebung eine Veränderung des Polymerisierungsgrades hervorrufen. Während der pH-Wert im Zytosol (7,2) und im Apoplast (5,6) der Pflanze unter Kontroll-Bedingungen konstant ist [29-31], konnte eine Veränderungen der Protonenkonzentration im Zytosol durch äußere Stressfaktoren bereits mit der Öffnung von Anionenkanälen und einer Depolarisierung der Plasmamembran in Verbindung gebracht werden [29, 32]. Die Protonenkonzentration im Zytosol kann dabei direkt die Aktivität von S-Typ Anionenkanälen beeinflussen [33]. Erste Untersuchungen, in denen SLAH3 durch zytosolische Ansäuerung aktiviert werden konnte, weisen darauf hin, dass der Oligomerisierungsgrad des Kanals, abhängig vom Stimulus, dynamisch sein kann und dabei den Aktivitätszustand der Anionenkanäle signifikant beeinflusst. Die Depolarisierung der Plasmamembran wiederum ist universell, um verschiedene Stressreaktionen miteinander zu assoziieren [34].

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten nun hochauflösende Mikroskopietechniken eingesetzt werden, um Heteromerisierungs- und Polymerisierungsgrade der SLAC/SLAH-Anionenkanäle zu untersuchen.

1.2 Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Die Lichtmikroskopie stellt eine Untersuchungsmethode dar, mit breitgefächerter Anwendbarkeit und Vielseitigkeit. Als Teil der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie weitestgehend minimalinvasiv und eine extrem leistungsfähige Methode um eine biologische Probe zu untersuchen. Grundlegend muss dafür eine zelluläre Komponente mit einem Fluorophor hochspezifisch markiert werden, wodurch im Vergleich zu einer Durchlichtaufnahme eine hochkontrastreiche Unterscheidung zwischen der gefärbten Komponente und der nichtfluoreszierenden Umgebung möglich wird. Die Analyse von Expressionsmustern und der Lokalisation von Proteinen im Pflanzengewebe, im speziellen von Anionenkanälen lassen erste Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins zu [24]. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet hierfür weitreichende Möglichkeiten. Neben wirkungsortspezifischen Analysen mittels konfokalem Laserrastermikroskop (CLSM), bieten hochspezialisierte Mikroskopieapplikationen Einblicke in die molekulare Funktionalität eines Proteins. Höhere Auflösung bietet differenziertere Einblicke in die Verteilung oder Kolo-kalisation spezifisch gefärbter Strukturen und

Moleküle [35]. Die Etablierung neuer Techniken wie Expansions-Mikroskopie (ExM) bieten insbesondere in Bezug auf pflanzliche Proben den Vorteil, dass ein hochaufgelöstes Bild, bei reduziertem Hintergrundsignal mit Hilfe eines konventionellen CLSM generiert werden kann [36]. Die Lokalisationsmikroskopie bietet mit PALM ein mikroskopisches Werkzeug, mit welchem sich der Polymerisierungsgrad von Proteinen bestimmen lässt [37].

Die angewendeten Mikroskopiertechniken, das Vorgehen und die entsprechenden Grundlagen werden in diesem Abschnitt (Kapitel 1.2) näher thematisiert.

Färbemethoden

Die Färbemethoden für die Fluoreszenzmikroskopie sind umfangreich und bieten eine große Diversität für unterschiedlichste Fragestellungen. In dieser Arbeit wurden zur Markierung genetisch kodierte fluoreszierende Proteine (FPs) oder Protein-Tags (Snap-, Clip- und Halo-Tag), Immunfärbung und Farbstoffe verwendet, welche zielmolekülspezifisch binden.

Markierung mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen

Bei der Färbung mit Hilfe eines fluoreszierenden Proteins können Proteins von Interesse (PVI) hochspezifisch markiert werden. Zuerst muss hierfür ein Plasmid-DNA-Konstrukt hergestellt werden, welches mindestens die Sequenz eines Promotors des Expressionssystems, die des PVI und die des FPs beinhaltet. Alle FPs verfügen als native Proteine über die „beta-barrel“-Tertiärstruktur, welche einen Chromophor umschließt. Die Auswahl an fluoreszierenden Proteinen mit unterschiedlichsten photophysikalischen Eigenschaften ist groß und bietet neben den normalen FP auch beispielsweise PALM-fähige, photokonvertierbare/-schaltbare FPs [38]. Nach Einbringung der Plasmid-DNA in das Zelllumen eines nativen Organismus wird das PVI und FP in der Zelle exprimiert. Das FP kann dadurch kovalent an das Zielprotein gekoppelt werden, sofern die DNA-Sequenz auf dem Plasmid entsprechend gewählt wird. Es ist ebenfalls möglich, FP und PVI nach der Expression zu trennen, wodurch das FP meist frei im Cytosol vorliegt. In diesem Fall ist lediglich die erfolge Expression nachweisbar. Die Detektion des FP liefert dann entsprechend keine Information über die Position und Funktion des PVI in der Zelle. Das methodische Vorgehen ist in Kapitel 3 (Material und Methoden) genauer thematisiert.

Markierung mit Hilfe von Protein-Tags

Neben der hochspezifischen Markierung eines Proteins von Interesse (PVI) mit Hilfe eines Fluoreszierenden Proteins (FP) können Proteine mittels kommerziell erhältlichen Tags mit einem anorganischen Farbstoff markiert werden. Die Einbringung in den Organismus ist dabei kongruent mit dem Vorgehen bei der FP-Markierung. Jedoch handelt es sich bei Snap- und Clip-Tag um ein Derivat des menschlichen

DNA-Reparaturproteins O⁶-Alkylguaninalkyltransferase, welches irreversibel die Alkylgruppe seines Substrats mit einer seiner Cystein-Reste verbindet. Als Substrat dient das O⁶-Benzylguanin-Substrat (BG) oder das O⁶-Benzylcytosin-Substrat (BC), welches zuvor mit einem beliebigen Farbstoff gekoppelt in das Zellinnere eingebracht wird, wodurch die spezifische Färbung eines PVI möglich ist [39, 40]. Das Prinzip der Farbstoffkopplung an das PVI ist in Abb. 1.3 schematisch erklärt.

Das Prinzip für die Färbung eines PVI mit Hilfe eines Halo-Tags ist vergleichbar. Jedoch ist der Halo-Tag eine bakterielle Haloalkandehalogenase, welche als Hydrolase fungiert und reaktive Chloralkan Bindestellen aufgrund einer genetischen Modifikation irreversibel an sich bindet. Die reaktive Bindestelle kann wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden werden, wodurch die spezifische Färbung eines PVI möglich wird [41]. Durch die spezifische Kopplung anorganischer Farbstoffe wie beispielsweise Alexa647 oder ATTO655 sind dann lokalisationsmikroskopische Aufnahmen mit der *direct stochastic optical reconstruction microscopy*-Technik (*dSTORM*) möglich [42, 43].

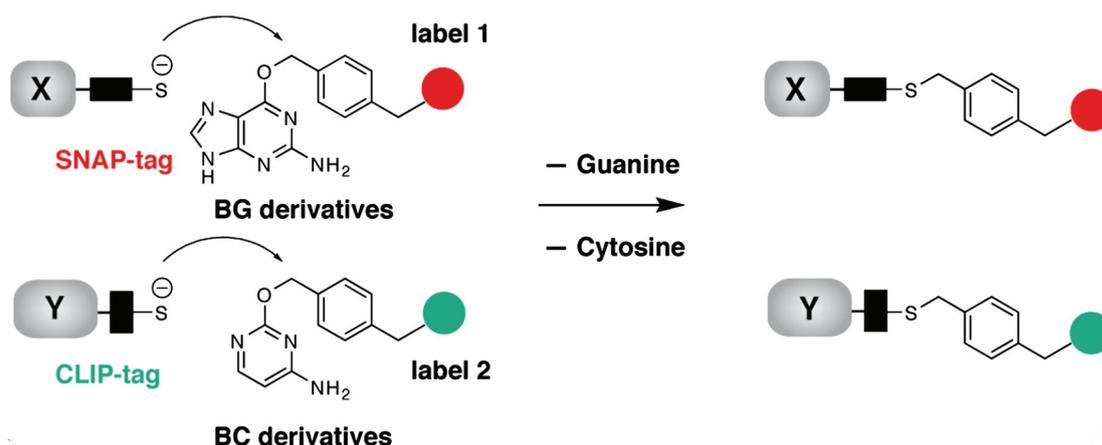


Abb. 1.3: Spezifische Färbung von Proteinen mit Hilfe von Protein-Tags. Die Protein-Tags (SNAP-Tag oder CLIP-Tag) werden bei der Genexpression an die Proteine X oder Y gebunden. Durch die Zugabe von farbstoffgekoppelten (label 1 und label 2) Benzylguanin- (BG) oder Benzylcytosin-Derivaten (BC) können die Farbstoffe kovalent an die Cystein-Reste (S⁻) der Protein-Tags gekoppelt werden. Bei der Reaktion kommt es zur Abspaltung von Guanin oder Cytosin des jeweiligen Derivates. Die Abbildung ist übernommen aus „Gautier, et al., 2008“ [40].

Immunfärbungen

Im Gegensatz zu den oben genannten Färbemethoden werden bei der Immunfärbung die Fluorophore nicht kovalent an die Zielstruktur gebunden. Außerdem ist die stöchiometrische Färbung (Ein-Fluorophor-Ein-Zielmolekül) nicht möglich. Bei der Immunfärbung kommen Antikörper oder Einzeldomänenantikörper (*Nanobodies*) [44] zum Einsatz, welche spezifisch an ein Epitop des PVI binden. Der an das Epitop bindende Antikörper ist der Primärantikörper. Das PVI wird sichtbar gemacht, indem man entweder an den Primärantikörper einen Fluorophor bindet, oder einen fluorophor-markierten Sekundärantikörper einsetzt, welcher an den Primärantikörper bindet [45].

Markierung mit zielmolekülspezifischen Farbstoffen

Außerdem bieten eine Vielzahl sehr gut charakterisierter, fluoreszierender Farbstoffe die Möglichkeit, nicht nur Proteine sondern viele Zellkomponenten wie Zellorganellen [46], Nukleinsäuren [47] und viele mehr. Hier wurde der plasmamembran-impermeable Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) verwendet, welcher in Pflanzenproben bei intakter Plasmamembran den Bereich der Zellwand markiert und bei permeabilisierter Plasmamembran mit der DNA interkaliert und diese markiert. PI zeichnet sich durch ein Emissionsmaximum bei 590 nm aus, welches sich auf 617 nm verschiebt, sobald PI in DNA interkaliert [48, 49]. Außerdem wurde Calcofluor-weiß (CFW) verwendet. CFW bindet an 1-3- β - und 1-4- β -Polysaccharide, welche unter anderem in der Zellwand von Pflanzen vorkommen, wodurch spezifisch die Zellwand markiert werden kann [50]. Mit beiden Farbstoffen konnten somit hochspezifisch charakteristische Strukturen gefärbt werden, um die Lokalisation der PVIs klar zuzuordnen und in einen strukturellen Zusammenhang bringen zu können.

Das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie

Ein Manko der Lichtmikroskopie ist das begrenzte Auflösungsvermögen, weshalb zwei Punkte nicht voneinander unterscheidbar sind, sobald sich diese näher als ~ 200 nm beieinander befinden. Das Abbe-Limit ist für die Lichtmikroskopie fundamental und beschreibt mit $d = \frac{\lambda}{2 NA}$ die Abhängigkeit der beugungsbegrenzten Auflösung von der verwendeten Wellenlänge und der Numerischen Apertur (NA) des Objektivs [51]. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie werden Lichtstrahlen nicht an den Objekt-umgebenden Nahfeldern gebeugt, sondern es werden Fluorophore eingesetzt. Das bedeutet, dass hier selbstleuchtende Punkte als Beugungsmuster auf einem Detektor abgebildet werden. Das Intensitätsmaximum im Beugungsmuster eines abgebildeten Fluorophors wird als Beugungsscheibchen bezeichnet und hängt von der Punktspreizfunktion (PSF) ab. Das Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie kann durch das Rayleigh Kriterium $d = \frac{1,22 \lambda}{2 NA}$ berechnet werden und beschreibt, dass zwei emittierende Punkte gerade noch voneinander getrennt werden können, solange das Maximum des einen Beugungs-

scheibchens im ersten Minimum des anderen Beugungsscheibchens liegt [52] (s. Abb. 1.4). Auf die Relevanz des Rayleigh-Kriteriums wird im Kapitel „1.2 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie durch die Lokalisation einzelner fluoreszierender Moleküle“ nochmals näher eingegangen.

Bestimmung des Auflösungsvermögens

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops kann mit Hilfe der Formel des Rayleigh Kriteriums zwar berechnet werden, die experimentelle Bestimmung ist jedoch schwierig und aufwändig, da zwei Fluorophore immer näher beieinander positioniert werden müssten, bis das Auflösungslimit erreicht ist. Zudem ist die korrekte Anpassung der PSF ebenfalls nicht trivial. Die Vermessung der PSF mit Hilfe einer Gaussfunktion bietet hier eine wesentlich einfachere Methode zur experimentellen Bestimmung des Auflösungsvermögens. Wird ein Fluorophor verwendet, welcher kleiner ist als das Auflösungsvermögen (<150 nm) so ist die PSF eine beugungsbegrenzte Abbildung des Fluorophors. Wird die PSF nun mit Hilfe einer Gaussanpassung vermessen kann die Halbwertsbreite (FWHM; *full width of half maximum*) der PSF bestimmt werden. Die Halbwertsbreite ist dabei nahezu identisch mit dem Auflösungsvermögen anhand des Rayleigh Kriteriums, weshalb das Auflösungsvermögen auch mit der Halbwertsbreite der Gaussfunktion mit $FWHM = \frac{0,51 \lambda}{NA}$ berechnet werden kann [53]. Die experimentelle Bestimmung des Auflösungsvermögens ist somit an fluoreszenzmarkierten und abgebildeten Strukturen möglich, sofern die Struktur kleiner als das Auflösungsvermögen des jeweiligen Mikroskops ist. Hierbei wird die Intensitätsverteilung vermessen, mit einer Gaussfunktion angepasst und die FWHM bestimmt. Hierfür können sowohl punkt- als auch linienförmige Strukturen verwendet werden. Die Zusammenhänge von PSF, Rayleigh Kriterium und Gaussfunktion ist in Abb. 1.4 skizziert. Die FWHM der Gaussanpassungen von fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Strukturen werden aufgrund der oben genannten Bedingungen, in dieser Arbeit als Wert für Strukturdimensionen oder das Auflösungsvermögen bestimmter Mikroskopischer Aufbauten angegeben.

Die räumliche Verteilung vieler biologischer Strukturen liegt unterhalb dieses Auflösungsvermögens. Seit nunmehr fast drei Jahrzehnten wurden deshalb unterschiedlichste Methoden entwickelt, um das Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie zu verbessern.

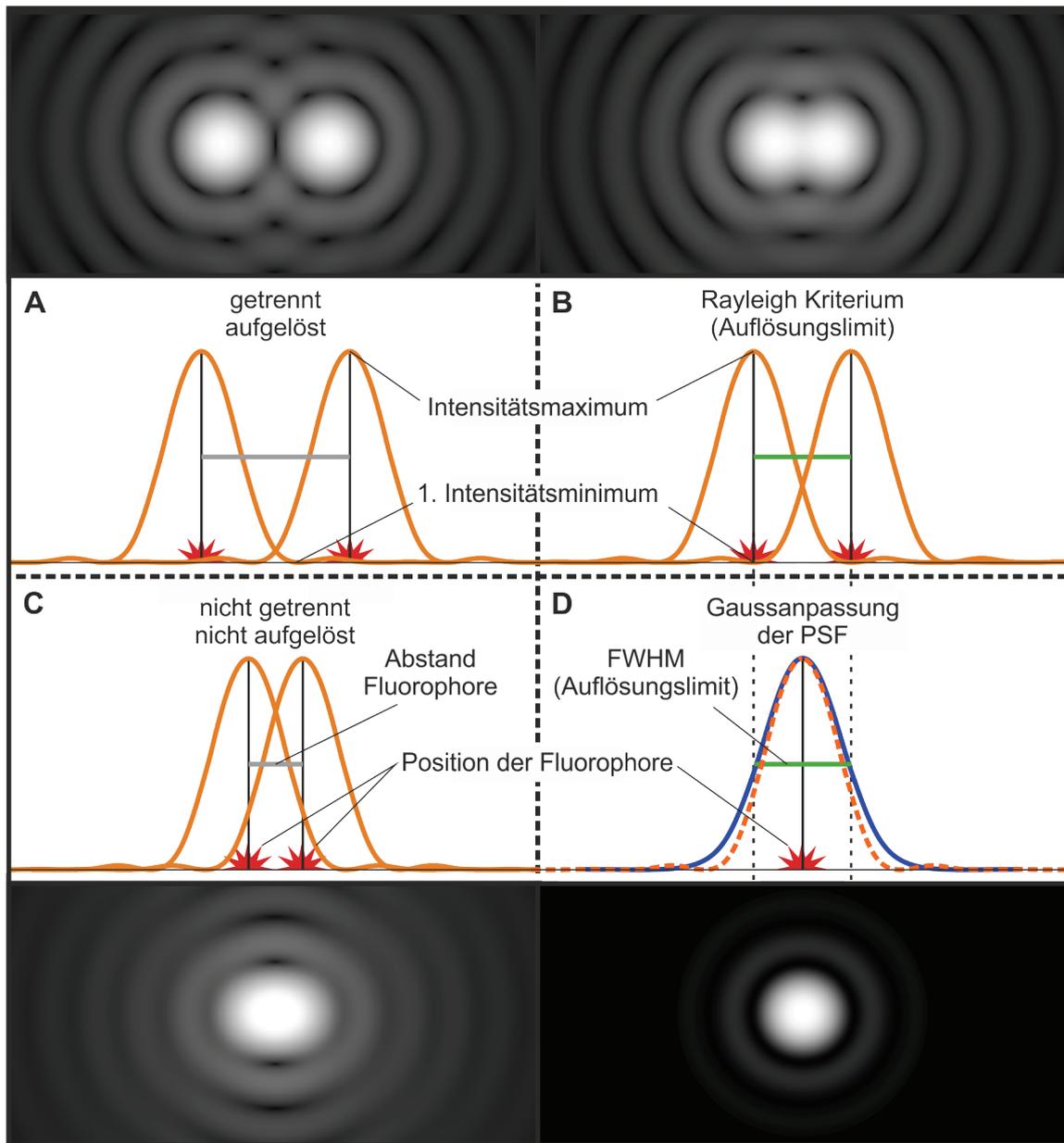


Abb. 1.4: Zusammenhänge von Punktspreizfunktion, Rayleigh Kriterium und Gassanpassungen zur Bestimmung des Auflösungsvermögens von Fluoreszenzmikroskopen. Abgebildet sind die Beugungsscheibchen von Fluorophoren (stilisiert) und die jeweiligen Punktspreizfunktionen im Profil (PSF, orange), welche der Intensitätsverteilung entsprechen. **(A)** Liegen die Fluorophore ausreichend weit voneinander entfernt, können beide Fluorophore aufgelöst werden. **(B)** Das Rayleigh Kriterium beschreibt, dass zwei Fluorophore gerade noch voneinander getrennt und aufgelöst werden können, sofern sich das Intensitätsmaximum des einen Fluorophors genau auf dem ersten Intensitätsminimum des zweiten Fluorophors befindet. **(C)** Liegen die Fluorophore näher beieinander sind sie nicht mehr getrennt auflösbar. **(D)** Passt man die PSF (orange----) eines einzelnen Fluorophors mit Hilfe einer Gaussfunktion an (blau), entspricht die Halbwertbreite der Gaussfunktion (FWHM, grün) dem Rayleigh Kriterium und somit dem Auflösungsvermögen eines Fluoreszenzmikroskops. Auffällig ist hier, dass die Gaussfunktion die PSF nicht perfekt anpasst, die FWHM jedoch dem Rayleigh Kriterium entspricht. Die selbst-erstellte Abbildung basiert auf [52, 53][54][55].

Konfokale Laserrastermikroskopie

Die Etablierung des konfokalen Laserrastermikroskops (CLSM) führte zu einer relativ geringen Verbesserung der Auflösung, jedoch zu einer massiven Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, was oftmals schon die Darstellung einer bestimmten Struktur ausreichend ermöglichen konnte [56]. Hierbei wird durch den Einsatz einer Lochblende (*pinhole*), einem konfokalen Anregungsvolumen und das Abrastern der Probe, die Detektion des Fluoreszenzsignals verbessert und Streulicht von Schichten oberhalb und unterhalb der Fokalebene reduziert. Lokalisationsstudien und Expressionsmusteranalysen von lebenden oder fixierten Pflanzenproben lassen sich so sehr gut durchführen. Einzelzellen und Zellorganellen, wie Plasmamembran, Chloroplasten oder Zellwände sind dabei gut voneinander zu unterscheiden. Die zeiteffiziente Aufnahme von mehreren markierten Organellen sowie die Verbindung mit zusätzlichen Durchlichtaufnahmen bei geringem Photobleichen sind maßgebliche Vorteile eines CLSM. Die Aufnahme von Z-Stacks ermöglicht zudem die dreidimensionale Abbildung einer Struktur oder Verteilung eines Proteins. Hierbei werden Stapel von Einzelbildern in aufeinanderfolgenden Z-Ebenen aufgenommen. Die Auflösung in der z-Achse ist dabei der limitierende Faktor und ist für CLSM-Aufnahmen etwa 2-3x schlechter als in der x- und y-Achse (~800 nm), weshalb kleinere Schritte in der z-Ebene zwischen den Einzelbildern nicht praktikabel sind.

Förster-Resonanzenergietransferuntersuchungen in Kombination mit Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie

Die Kombination eines LSM mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) ermöglicht die Durchführung von FRET-FLIM Analysen. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine Methode, bei welcher die Assoziation, Konformation und Separierung von Molekülen anhand eines Fluoreszenzsignals gemessen werden können. Dabei wird das biophysikalische Phänomen des nicht-radiativen Energietransfers von einem Donor auf einen Akzeptor, welche sich in einer räumlichen Nähe von 1-10 nm befinden müssen ausgenutzt [57]. Das bedeutet, dass anhand dieser Messung zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen geprüft sowie Abstände zwischen Molekülen auf einer nm-Skala abgeschätzt werden können. Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die mittlere Verweildauer im angeregten Zustand eines Fluorophors, bevor ein Photon emittiert wird. Die Fluoreszenzlebensdauer kann neben der Fluoreszenzintensität ebenfalls bildlich dargestellt werden und wird als Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (FLIM) bezeichnet. Der Zusammenhang beider Techniken besteht darin, dass der Förster-Resonanz-Energietransfer die Fluoreszenzlebensdauer des Donors verkürzt [58-61]. Kombiniert man FRET mit FLIM wird lediglich die Fluoreszenzlebensdauer des Donors detektiert. Kommt es bei FRET-Kontakt, also der räumlichen Nähe von Donor und

Akzeptor (<10 nm) zur Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors, deutet dies beispielsweise auf die Interaktion zweier Proteine hin [62]. Wichtig ist beim FRET-Kontakt die Orientierung der Fluorophore zueinander. Liegen die beiden Fluorophore orthogonal zueinander, kommt es nicht zum Energietransfer und die Fluoreszenzlebensdauer des Donors bleibt unbeeinflusst. Inwieweit die Orientierung der FRET-FLIM-Paare die Messung beeinflusst ist jedoch sehr schwierig vorherzusagen [63].

Als Donor/Akzeptor-Paar können fluoreszierende Proteine verwendet werden, welche an die jeweiligen Proteine von Interesse translational fusioniert wurden [64]. Hier diente das GFP-Derivat tSapphire als Donor [65] und mOrange als Akzeptor [66]. Protein-Protein-Interaktionsstudien konnten mit diesem FRET-Paar im lebendem Pflanzengewebe in der Epidermis von *Nicotiana benthamiana* bereits durchgeführt werden [25]. Außerdem konnte die Interaktion des SLAH3 mit SLAH1 mit dieser Technik und Expressionssystem erörtert werden [24].

In dieser Arbeit wurden weitergehende Interaktionsstudien mittels FRET-FLIM-Messungen der SLAC/SLAH-Kanäle durchgeführt. Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie kann bei FRET-FLIM zudem die Eindringtiefe erhöht, das Bleichen der Probe und der Hintergrund, durch die reduzierte Anregung außerhalb des Fokuspunkts verringert werden. Der Donor wird dabei mit der doppelten Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Fluorophors angeregt. Die Anregung erfolgt durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen. Hierfür sind sehr hohe Photonendichten innerhalb des Fokuspunkts erforderlich [67]. Außerdem ist keine Lochblende mehr notwendig, und das gesamte Fluoreszenzsignal kann genutzt werden.

Verbessertes Auflösungsvermögen durch strukturierte Beleuchtung

Die strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie (*structured illumination microscopy*, SIM), ist ebenso wie die CLSM mit Hilfe von gewerblich erhältlichen Messaufbauten möglich, die einfach zu bedienen sind und ein Werkzeug bieten, wodurch das Auflösungsvermögen verbessert werden konnte. Hierbei kommt es zum Einsatz einer strukturierten Beleuchtung. Die strukturierte Beleuchtung wird durch die Positionierung eines Gitters im Anregungsstrahlengang generiert. Die Interferenzen der am Gitter erzeugten Beugungsordnungen ermöglichen dabei die axiale und laterale Strukturierung des Anregungslichtes. Das Anregungslicht und somit auch die emittierte Fluoreszenz wird dadurch entlang des Musters moduliert [68, 69]. Die Verschiebung, Rotation und Überlagerung dieses Rasters führt zu Interferenzmustern (Moiré-Effekt). In Kombination mit der Fourier-Transformation der Einzelbilder können Zusatzinformationen in Bezug auf die Position eines emittierenden Moleküls erhalten werden. Die nachträgliche Rekonstruktion eines Bildes aus den Einzelbildern der unterschiedlichen Beleuchtungsmuster ermöglicht die Darstellung eines hochaufgelösten Fluoreszenzbildes mit halbiertem Auflösungsvermögen. Je nach verwendeter Wellenlänge (beispielsweise 405 nm) bedeutet dies, dass

eine Auflösung von ~ 90 nm erreicht werden kann [70, 71]. Von einer detaillierteren Beschreibung des technischen Vorgehens bei der SIM wird hier abgesehen, da es nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit liegt die entsprechenden physikalischen Grundlagen zu thematisieren. Guerra, et al. konnten bereits 1995 erstmalig mit dem Ansatz der strukturierten Beleuchtung ein 50 nm-Gitter auflösen und das Potential der Technik aufzeigen [72]. Der große Vorteil im Gegensatz zu CLSM ist, dass die Verbesserung der Auflösung ohne den Verlust von Emissionslicht erreicht wird. Außerdem ist die Bildgebung der SIM verhältnismäßig schnell. Die Verdopplung der Auflösung bei biologischen Strukturen konnte erstmalig durch Abbildungen des Aktinskeletts in HeLa-Zellen von Gustaffson, et al. gezeigt werden [71]. In Anbetracht der Publikationen der letzten Jahre, ist die Anwendung von hochauflösender Fluoreszenz-mikroskopie im pflanzlichen Gewebe eine große Herausforderung. SIM bietet besonders in Bezug auf pflanzliche Fragestellungen dabei eine Technik mit dem größten Potential. Im Jahr 2017 waren insgesamt 55 SIM-basierte Publikationen und lediglich 6 Publikationen mit allen anderen hochauflösenden Techniken veröffentlicht. SIM wurde dabei in allen Gewebsstrukturen angewendet, wie die Untersuchung der Architektur von Zellulose-Mikrofibrillen, Plasmodesmata in den Blättern oder Untersuchungen der Zellteilung [35].

Grundlagen der Expansionsmikroskopie

Die Expansionsmikroskopie (ExM) ist in den letzten Jahren zu einer wichtigen, hochauflösenden Mikroskopiemethode herangewachsen. Sie beruht auf dem einfachen Prinzip, nicht die Fluorophore mit höherer Auflösung darzustellen, sondern die Probe zu vergrößern. Dabei werden bei allen ExM-Varianten vier grundlegende Probenpräparationsschritte durchgeführt. Zuerst werden molekulare Anker für die spätere Vernetzung (Schritt 3) kovalent an die Biomoleküle der biologischen Probe gebunden. Es ist ebenfalls möglich, diese Anker lediglich an den Fluorophoren der Probe anzubringen. Daraufhin wird die Probe in einer Monomerlösung inkubiert, die dann zu einem Gel auspolymerisiert und die Probe in ein Gel einbettet. Die Netzstruktur des Gels verbindet sich dabei mit den vorher angebrachten molekularen Ankern. Danach wird die Probe mit Hilfe eines enzymatischen Verdaus oder durch chemische Denaturierung homogenisiert. Zuletzt wird die gelierte Probe in einem Wasserbad (ddH_2O) inkubiert, was zum Schwellen des Gels und somit zur Expansion der Probe führt. Je nach Präparationsprotokoll kann die Probe dadurch 2x-20x expandiert werden, entsprechend verbessert sich das Auflösungsvermögen. Wurden die Anker an den Biomolekülen der Probe angebracht, wird die Gesamtstruktur des Gewebes expandiert. Wurden die Anker an den Fluorophoren angebracht, werden lediglich diese homogen expandiert. Die Bildgebung anhand der Fluorophore ist dann in diesem Fall trotz Zerstörung des Gewebes immernoch möglich. Die Markierung bestimmter Biomoleküle kann vor dem Anbringen der Anker (Schritt 1) oder nach der Expansion der Probe (Schritt 4) durchgeführt werden.

Mittlerweile sind hierfür viele verschiedene Fluorophore, sowohl FPs als auch organische Farbstoffe für Immunfärbungen charakterisiert [36].

Zum einen konnten in tierischen Proben bereits herausragende Ergebnisse mit ExM erzielt werden. Die Expansion ganzer Maushirnschnitte, einhergehend mit einer 3-Farben Bildgebung (gefärbte Proteine: Bassoon, Homer, Thy1) des Hirngewebes und einer Auflösung von ~70 nm konnte dabei bewerkstelligt werden [73]. Durch die Kombination von ExM mit Lokalisationsmikroskopie (U-ExM) konnte sogar der ultrastrukturelle Aufbau von Zentriolen fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden [74]. Zum anderen wurden ExM-Versuche bisher noch nicht mit Pflanzengewebe durchgeführt. Ein problematischer Präparationsschritt für die ExM im Pflanzengewebe könnte die Homogenisierung der Probe darstellen, da Pflanzengewebe, insbesondere die Zellwand eine extrem stabile Struktur darstellt (s. Kapitel 1.3 Pflanzenanatomie und Molekularbiologie der Pflanzen). Deshalb wurde in dieser Arbeit bei ersten ExM-Versuchen die Isotropie der Expansion geprüft. Isotropie der Expansion bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die strukturelle Verteilung der Probe (Position der Proteine, Zellwand, Plasmamembran, Fluorophore, etc.) vor und nach der Expansion im Verhältnis unverändert/deckungsgleich bleibt. Außerdem wurden verschiedene methodische Herangehensweisen (Kombination aus enzymatischer und denaturierungsbasierter Homogenisierung) getestet und geprüft. Zwei der für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von Pflanzenproben wesentlichen Vorteile dieser Methode könnten die Minimierung der Hintergrundfluoreszenz (beispielsweise Chloroplasten oder Zellwand) und die Verwendung von Standardmikroskopiemethoden (beispielsweise CLSM) für die Bildgebung sein [36].

Enzymatische Homogenisierung der ExM-Probe

Neben der Homogenisierung mit der Proteinase K, was bereits für ExM-Experimente mit tierischen Proben beschrieben ist [75], muss eine pflanzliche Probe zusätzlich mit pflanzenspezifischen Verdauungsenzymen behandelt werden, um insbesondere die Zellwände zu verdauen.

Die Proteinase K ist eine breitspektrum Serinprotease des Schlauchpilzes *Engyodontium album*, welche Peptidbindungen an den Enden und innerhalb von Proteinen spaltet. Sofern die Inkubationszeit lange genug und die Konzentration des Enzyms groß genug ist, führt die Behandlung zu einer umfassenden Homogenisierung einer biologischen Probe [76, 77]. Allerdings kann die Proteinase K keine Zellwände verdauen und reicht deshalb zu Homogenisierung einer pflanzlichen Probe nicht aus.

Die Struktur der Zellwände in Pflanzen ist komplex und weist oft gewebespezifische Eigenschaften auf. Die Bestandteile der Zellwand variieren dabei jedoch nur in einem verhältnismäßig geringen Maße. Da bei ExM-Experimenten das Hauptinteresse ist, die Probe zu homogenisieren, sollen hier die Bestandteile und mögliche Enzyme zur Homogenisierung pflanzlicher Präparate kurz thematisiert werden. Grundlegend bilden

Polysaccharide (Mehrfachzucker) das Grundgerüst pflanzlicher Zellwände. Polysaccharide sind mittels glycosidischer Bindung polymerisierte Einfachzucker. Die involvierten Einfachzucker sind dabei namensgebend für die Zuckerpolymer. Die Cellulose ist in der pflanzlichen Zellwand das am meisten vorhandene Polysaccharid, welches aus dem Einfachzucker β -D-Glucose gebildet wird. Es macht dabei 15-30 % der Trockenmasse von primären Zellwänden aus. Es liegt in Mikrofibrillen aus parakristallinen Baugruppen von mehreren tausend, über Wasserstoffbrücken verbundenen (1-4)- β -D-Glucanketten vor. Die Mikrofibrillen können dabei bis zu 2-3 μ m lang werden. Dieses Geflecht wird durch quervernetzende Glycane, sogenannte Hemicellulosen und Pektine verbunden.

Die Hauptvertreter der Hemicellulosen der Blütenpflanzen sind die Xyloglucane (XyGs) und die Glucuronoarabinoxylane (GAXs). Beide Vertreter bestehen aus linearen (1-4)- β -D-Glucanketten mit einigen angrenzenden Einfachzuckereinheiten.

Pektine sind ebenfalls Polysaccharide die im Wesentlichen aus (1-4)- α -glycosidisch verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten bestehen.

Die Callose bildet im Gegensatz zur Cellulose (1-3)- β -D-Glucanketten, welches helikale Duplexe und Triplexen ausbilden kann. Die Callose tritt meist nur lokal in bestimmten Bereichen auf und wird von der Pflanze als universelles Abdichtungsmaterial genutzt [22].

Die Aufspaltung dieser Polysaccharide stand im Fokus für die Präparation der pflanzlichen Proben für die ExM-Experimente. Da Pflanzen für eine Vielzahl von Organismen eine Nahrungs- oder Nährstoffquelle darstellen, was den Verdau von Pflanzengewebe impliziert, gibt es eine Vielzahl verfügbarer Verdauungsenzyme, welche aus unterschiedlichsten Organismen, wie Pilzen, Bakterien und Protozoen extrahiert werden konnten.

Cellulasen besitzen die Fähigkeit, (1-4)- β -D-glycosidische Bindungen zu hydrolysieren. Zu den Cellulasen gehören drei verschiedene Enzymtypen, die Endocellulasen, die Exocellulasen und die Cellobiasen/ β -Glucosidasen. Erst das Zusammenspiel aller drei Enzymtypen ermöglicht die Aufspaltung der sehr stabil miteinander verbundenen riesigen Cellulosemoleküle. Die Endocellulasen sind die einzigen Vertreter, welche innerhalb der Zuckerpolymer angreifen können und spalten dabei willkürlich nicht-kristalline Bindungen auf und generieren somit eine größere Anzahl von Kettenenden. Die Exocellulasen spalten von den Kettenenden Di- oder Tetrasaccharide ab, welche von Cellobiasen/ β -Glucosidasen letztendlich zu Monosacchariden hydrolysiert werden [78]. Die Cellulasen, mit der Eigenschaft Cellulose sowie Hemicellulosen aufzuspalten zu können, gehören somit zu den wichtigsten eingesetzten Verdauungs-enzymen.

Neben den Cellulasen wurden außerdem Pektinasen/Pectolyasen, welche die Pektine [79] verdauen, und Xylanasen [79], welche speziell die Vertreter der Hemicellulosen aufspalten [80], eingesetzt. Gewerblich erhältliche Enzymmischungen wie Driselase und Macerozyme enthalten eine Mischung aus den oben genannten zellwandspezifischen

Verdauungsenzymen und gewährleisten somit die umfassende Verdauung der Zellwand. In Verbindung mit dem zusätzlichen Einsatz der Proteinase K könnte dadurch eine ausreichende Homogenisierung der Pflanzenprobe für ExM-Experimente gegeben sein.

Denaturierungsbasierte Homogenisierung der ExM-Probe

Natriumdodecylphosphat (SDS) ist ein stark Protein-denaturierendes, anionisches Tensid, welches konzentrations-, temperatur- und ionenstärkeabhängig Micellen in wässriger Lösung ausbildet [81]. Durch die Auswaschung von Lipiden mit Hilfe von SDS-Micellen, konnten in ein Hydrogel eingebettete Maushirne durchsichtig und für die Fluoreszenzmikroskopie tief im Gewebe brauchbar gemacht werden, da Lichtstreuung im Hirngewebe minimiert wurde. Die PVI werden dabei in das Acrylamid-Hydrogel fixiert und in ursprünglicher Position gehalten. Zusätzlich bleiben durch den lediglich temporären Verlust der Sekundär-/Tertiärstruktur aufgrund der Denaturierung der Proteine, Bindestellen für Antikörper intakt und FP als Fluoreszenzmarker weiterhin nutzbar [82]. SDS unterbricht nichtkovalente Bindungen innerhalb von Proteinen, wodurch im Gegensatz zum enzymatischen Verdau die Primärstruktur nicht verändert wird. Ersetzt man SDS durch eine physiologische Lösung, ist davon auszugehen, dass Proteine wieder in ihre native Form zurückkehren. Durch die denaturierungsbasierte Homogenisierung einer tierischen Gewebeprobe waren ExM-Experimente bei Probenvolumen-abhängiger Inkubation (Inkubationszeit und Temperatur) in SDS-Puffern möglich [83].

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie durch die Lokalisation einzelner fluoreszierender Moleküle

Mit Hilfe der Detektion und Lokalisation einzelner Moleküle entstand die Idee, die beugungsbegrenzte Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie zu umgehen [84].

Grundlagen der Lokalisationsmikroskopie

Fluorophore zeichnen sich in ihrer Molekülstruktur meist durch ein delokalisiertes π -Elektronensystem aus und besitzen die photophysikalische Eigenschaft, durch ein bestimmtes Lichtspektrum angeregt werden zu können. Der Mechanismus und die verschiedenen Zustände werden im Folgenden erklärt und sind in einem vereinfachten Jablonski-Diagramm [85] (Abb. 1.5) schematisch dargestellt. Die hier erklärten Mechanismen gelten für Rhodaminfarbstoffe (Alexa647) und Oxazinfarbstoffe (ATTO655). Bei der Anregung eines Fluorophors kommt es durch die Absorption eines Photons (k_{abs}) zur Anhebung eines Elektrons vom Grundzustand (F_0) in ein höher gelegenes Orbital (F_1). Beim elektronischen Übergang vom höheren zum niedrigeren Energieniveau kann es zur Emission eines Photons kommen (k_{fl}), was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist aufgrund des *Stokes-Shift* rotverschoben [86] und kann deshalb in einem mikroskopischen Strahlengang, insbesondere mit Hilfe des dichroischen Spiegels vom Anregungslicht getrennt werden. Bei organischen Farbstoffen kann dann das Elektron im angeregten Zustand außerdem mittels *intersystem crossing* (k_{isc}) in den Triplett-Zustand (F_3) übergehen. Hierbei kommt es zur Spinumkehr des Elektrons, weshalb der Triplett-Zustand einen Anregungszustand mit veränderter Multiplizität darstellt. Wird der Farbstoff im Triplett-Zustand mit Hilfe eines Thiols (RSH) reduziert ($k_{\text{red}}(\text{RSH zu RS}^-)$), kommt es zum Übergang in einen stabilen farblosen Zustand. Der Farbstoff bildet dabei ein semireduziertes Farbstoffradikal ($F\bullet$) [87]. Dieser Zustand kann bei Oxazin Farbstoffen noch weiter reduziert (k_{red}) werden und führt zur Formierung des Leuko-Zustandes (F_{H}). Die Generierung dieser stabilen, langlebigen, farblosen Zustände der Farbstoffe ist für *d*STORM-Aufnahmen von integraler Bedeutung. Aufgrunddessen werden hierbei Farbstoffe verwendet, welche sich durch eine hohe Triplettquantenausbeute, das heißt Farbstoffe, welche sich durch eine hohe Wahrscheinlichkeit auszeichnen mittels *intersystem crossing* in den Triplett-Zustand überzugehen. Dies wird durch den Einsatz hoher Anregungslaserintensitäten zusätzlich positiv beeinflusst, da hierbei die Anregungsrate ($k_{\text{abs}}/k_{\text{fl}}$) und somit die Wahrscheinlichkeit für den Übergang in den Triplettzustand nochmals erhöht wird [45, 86]. Der Farbstoff kann durch Aussendung eines Photons, sogenannter Phosphoreszenz oder über die Reaktion mit molekularem Sauerstoff in den Grundzustand zurückkehren ($k_{\text{ph/ox}}$). Aus den farblosen Zuständen können die Farbstoffe lediglich über die Reaktion mit molekularem Sauerstoff (k_{ox}) wieder in den Grundzustand zurückkehren.

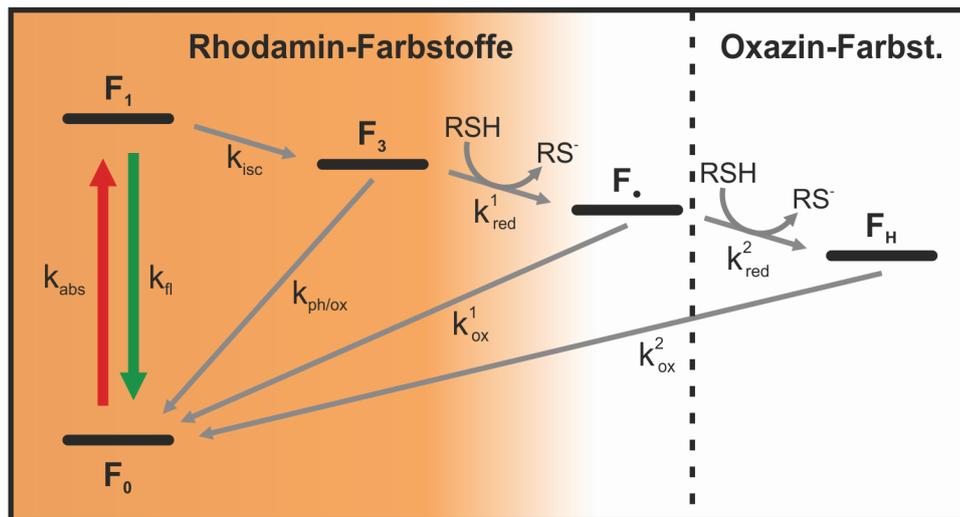


Abb. 1.5: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm und Reaktionsschema für die Schaltprozesse von Fluorophoren. Der Fluorophor wird durch die Absorption der Energie eines eingestrahnten Photons mit der Rate k_{abs} angeregt und gelangt vom Singulett Grundzustand (F_0) in einen energetisch höherliegenden Zustand (F_1). Fluoresziert daraufhin mit der Rate k_{fl} und kehrt in seinen Grundzustand zurück oder geht mit der *intersystem-crossing*-Rate k_{isc} in den Triplettzustand (F_3) über. Zum einen kann der Fluorophor von hier aus mittels Phosphoreszenz oder die Reaktion mit Sauerstoff mit der Rate $k_{\text{ph/ox}}$ wieder in den Grundzustand zurückkehren, zum anderen reagiert er mit einem Thiol (RSH/RS^-) mit einer Rate k_{red}^1 und formiert ein semireduziertes Farbstoffradikal (F_\bullet). Dies ist ein stabiler und farbloser Zustand des Farbstoffes. Rhodaminfarbstoffe können nicht weiter reduziert werden. Oxazinfarbstoffe hingegen können zudem über die Reaktion mit einem Thiol weiter reduziert werden und gelangen mit der Rate k_{red}^2 in den ebenfalls farblosen und sehr stabilen Leukozustand (F_{H}). Von den farblosen Zuständen gelangen die Farbstoffe über die Reaktion mit Sauerstoff und einer Rate k_{ox} wieder in den Grundzustand. Die selbst erstellte Abbildung basiert auf „van de Linde, et al., 2011“ [87].

Auf einem Detektor werden die ausgesendeten Photonen eines einzelnen Fluorophors als Beugungsscheibchen abgebildet. Das Beugungsscheibchen ist dabei die beugungsbegrenzte Abbildung des Fluorophors. Die Halbwertsbreite (Gaussianpassung) des abgebildeten Beugungsscheibchens entspricht der Auflösungsgrenze eines Fluoreszenzmikroskops (s. Abb. 1.4) und ist von der Wellenlänge des Emissionslichts und der Numerischen Apertur des Objektivs abhängig. Mit Hilfe einer zweidimensionalen (xy) Gaussianpassung kann der Mittelpunkt und damit die Position des Fluorophors bestimmt werden. Je mehr Photonen ein Fluorophor aussendet, desto präziser kann mit Hilfe der Gaussianpassung der Mittelpunkt des Beugungsscheibchens bestimmt werden. Die Lokalisationspräzision des Mittelpunkts kann unter optimalen Bedingungen ~ 10 nm betragen. Bei der Lokalisationsmikroskopie werden alle Fluorophore einer Probe einzeln detektiert und lokalisiert. Hierfür ist die räumliche Trennung der Fluorophore im Sinne des Rayleigh-Kriteriums notwendig. Um alle Fluorophore lokalisieren zu können, werden viele Einzelbilder aufgenommen, in welchen sich jeweils nur eine kleine Teilmenge der

Fluorophore im Emittierenden-Zustand befindet. Die Verweildauer eines einzelnen Fluorophors in einem nicht-fluoreszierenden beziehungsweise in einem nicht-detektierbaren Zustand ist essentiell für die zeitliche Trennung der Einzelbilder [45, 88, 89].

Fluorophore für die dSTORM

Für Aufnahmen bei der *direct stochastic optical reconstruction microscopy* (dSTORM) werden organische Farbstoffe verwendet. Prädestinierte dSTORM Fluorophore wie beispielsweise Alexa647 sind hell, emittieren also pro Zeiteinheit eine große Anzahl Photonen, sind extrem photostabil und zeichnen sich durch einen sehr langen, nichtfluoreszenten Aus-Zustand aus. Fluorophore mit hoher Triplettausbeute und der Einsatz hoher Anregungsintensitäten erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Tripletzübergangs. Zudem ermöglichen die Inkubation der Probe in thiolhaltigen, reduzierenden Schuttpuffern während der Messung die langen Aus-Zustände der Fluorophore. Die Schaltrate der Fluorophore wird zudem durch den pH des Schuttpuffers beeinflusst. Der An-Zustand, während Photonen emittiert werden, ist bei organischen Fluorophoren vergleichsweise kurz. Deshalb können bei dSTORM-Aufnahmen Bildraten von ~10 ms für ~30 000 Einzelbilder eingesetzt werden, um ein hochaufgelöstes Bild zu generieren. Im Vergleich zu einer CLSM-Aufnahme (~1 min) ist die Dauer für die Aufnahme eines dSTORM Bildes lange (~5 min), im Vergleich zu PALM-Messungen (~50 min) wiederum kurz [45].

Fluoreszierende Proteine für die photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM)

Bei der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (*photoactivated localization microscopy*, PALM) werden spezielle fluoreszierende Proteine eingesetzt, welche entweder photoschaltbar oder -konvertierbar sind. Durch den Einsatz sehr großer Laserintensitäten werden die Fluorophore nach einer bestimmten Zeit gebleicht und eine neue Teilmenge kann durch den Einsatz von 405 nm Laserlicht angeschaltet/konvertiert werden. Dadurch ist auch bei dieser Technik die räumliche Trennung aller einzelner Fluorophore über die Zeit gegeben und können in vielen Einzelbildern detektiert werden. Fluoreszierende Proteine sind vergleichsweise dunkel und die Schaltkinetik langsam, weshalb mit Bildraten von ~100 ms aufgezeichnet werden muss. Im Gegensatz zu dSTORM können PALM-Aufnahmen in pH neutralen Phosphatpuffer (pH 7,4) durchgeführt werden [89]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das konvertierbare FP mEOS2 verwendet. mEOS2 zeichnet sich vor Konvertierung durch ein Fluoreszenzspektrum von $\lambda_{\text{Abs}} = 508 \text{ nm} / \lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ und eine helle, grüne Fluoreszenz aus. Dadurch kann die Expression in einer Zelle sehr einfach geprüft werden. Durch den Einsatz von 405 nm Laserlicht wird mEOS2 konvertiert und ändert den Spektralbereich in den gelb-roten Wellenlängenbereich mit $\lambda_{\text{Abs}} = 570 \text{ nm} / \lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$. Unter diesen Bedingungen ist das nicht-konvertierte, grüne mEOS2 mit einer Anregungswellenlänge von 560 nm aufgrund der weit voneinander getrennten Absorptionsmaxima nicht anregbar und schließt neben dem Einsatz von Emissionsfiltern den Effekt des

Durchblutens (*crossstalk*) aus. Die photoschaltbaren/-konvertierbaren Proteine, insbesondere mEOS2 verfügen ebenso wie die organischen Farbstoffe über eine Blinkcharakteristik [90, 91], die sich mit dem Vier-Zustände-Modell (*four-states-model*, s. Abb. 1.6) sehr gut beschreiben lässt [37]. Dabei befindet sich das FP zuerst im nicht-aktivierten (unkonvertierten) Zustand und geht durch die Absorption von 405 nm in den aktivierten/fluoreszierenden Zustand über. Von dort kann das FP x-Male zwischen einem aktivierten/nicht-fluoreszierenden Zustand und dem aktivierten/fluoreszierenden Zustand wechseln. Untersuchungen von „Lando, et al., 2012“ ergaben, dass 18 % der aktivierten mEOS2 zweimal blinken und mEOS2 bis zu 9-mal (1%) blinken kann. Das bedeutet, dass das FP mEOS2 im Mittel zwei mal pro Aktivierung blinkt [92]. Letztlich wird das FP photobleicht und in Bezug auf die Fluoreszenzemission zerstört [93, 94].

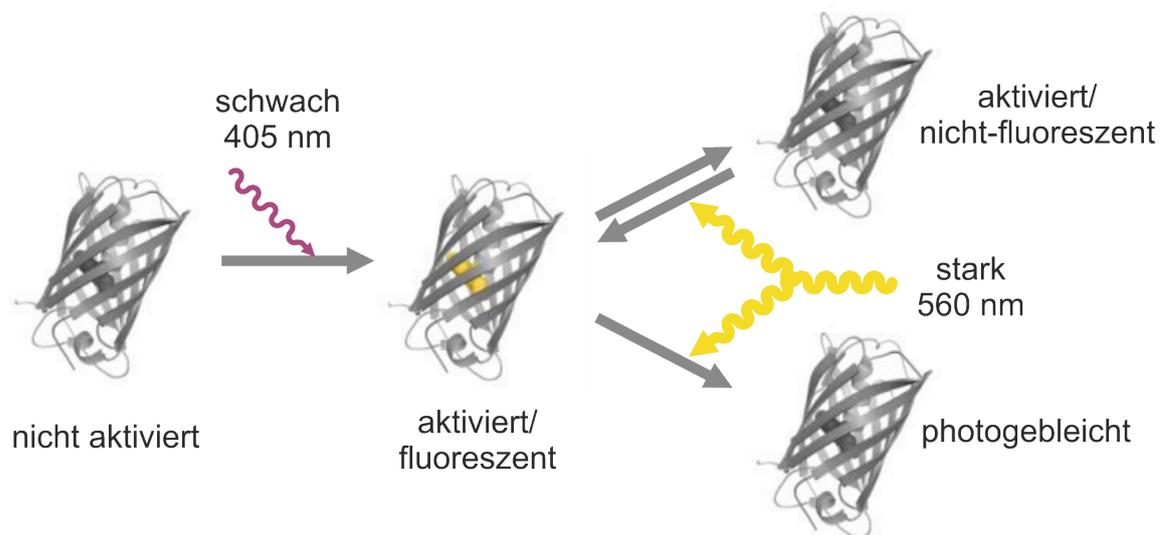


Abb. 1.6: Vier-Zustände-Modell. Das FP (mEOS2) befindet sich im nicht-aktivierten Zustand und kann mit schwacher UV-Beleuchtung (405 nm) aktiviert (konvertiert) werden. Hier kann das FP mit 560 nm Laserlicht angeregt werden. Im aktivierten Zustand kann es zwischen einem nicht-fluoreszierenden Zustand und dem fluoreszierenden Zustand mehrfach wechseln (schalten). Dies ist als „blinken“ zu erkennen. Der Einsatz extremer Anregungslichtintensitäten führt nach einer Zeit zum photobleichen des FP, welches dadurch unwiederbringlich zerstört wird. Die Abbildung ist verändert nach „Fricke, et al. 2015“ [37].

Rekonstruktion lokalisationsbasierter hochaufgelöster Bilder

Nach der Aufzeichnung werden sowohl bei *d*STORM, als auch bei PALM die einzelnen Beugungsscheibchen der Fluorophore mit Hilfe einer softwarebasierten zweidimensionalen Gaußanpassung lokalisiert und anhand einer Koordinatenliste ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. Parametereinstellung und Software sind im Kapitel 3 Material und Methoden (s. 3.9.1 Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisationsmikroskopischen Messungen) näher thematisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Helligkeit der eingesetzten Fluorophore und der daraus resultierenden maximalen Lokalisationspräzision, ist das Auflösungsvermögen für die beiden Techniken mit ~10 nm (*d*STORM) und ~30 nm (PALM) unterschiedlich [45].

Messaufbau für die Lokalisationsmikroskopie und Beleuchtungsmodi

Bei der Lokalisationsmikroskopie kommt ein Weitfeldmikroskopaufbau zum Einsatz. Prinzipiell werden bei einem Weitfeldmikroskop alle Fluorophore, die sich im Bildausschnitt des Detektors befinden, gleichzeitig angeregt. Die Anregung der Fluorophore wird dabei durch den Einsatz von Laserlicht gewährleistet. Um die Beleuchtung des gesamten Bildausschnitts zu gewährleisten, wird das parallele Laserlicht mit Hilfe von Sammellinsen erst aufgeweitet und dann auf die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert, wodurch paralleles Anregungslicht aus dem Objektiv austritt.

Durch den Einsatz einer sogenannten TIRF-Schiene (s. Beleuchtungsmodi; folgender Absatz) kann die Position des Fokuspunkts des Anregungslichts auf der hinteren Fokalebene variiert und dadurch der Beleuchtungsmodus der Probe verändert werden. Der Beleuchtungsmodus hängt vom Austrittswinkel des Anregungslichts aus dem Objektiv ab. Man unterscheidet dabei drei wesentliche Beleuchtungsmodi, welche im Folgenden erläutert werden.

Beleuchtungsmodi

Die Epi-Beleuchtung, bei welcher das Deckgläschen und die darauf liegende Probe orthogonal von unten nach oben belichtet wird [16].

Beim HILO-Modus (*highly inclined and laminated optical sheet*) trifft das Anregungslicht in einem Winkel unterhalb von 90° auf das Deckgläschen (meist nahe der Totalreflektion), wird daran gebrochen und belichtet die Probe nunmehr als nahezu liegendes Lichtblatt im Bereich der Glasoberfläche des Deckgläschens. Der Vorteil ist hierbei, dass durch die Verringerung des Anregungsvolumens zum einen die Intensität des Anregungslichts pro Kubikzentimeter ansteigt. Zum anderen wird durch die Generierung des Lichtblattes die Hintergrundfluoreszenz erheblich verringert, da nur die Fluorophore im Bereich der Fokalebene gezielt angeregt werden [95].

Zuletzt können die Fluorophore im TIRF-Modus (Interne Totalreflexionsfluoreszenz; *total internal reflection fluorescence*) angeregt werden. Wird dies bei mikroskopischen Aufnahmen eingesetzt spricht man von der Internen Totalreflexionsfluoreszenz-

mikroskopie (TIRFM). Hierbei wird das Anregungslicht unterhalb des Grenzwinkels der Lichtbrechung auf das Deckgläschen gerichtet (Einsatz TIRF-Schiene), wodurch es zur Totalreflektion des Anregungslichts an der Grenzfläche von Deckglas zu Probenmedium kommt. Dabei bildet sich ein elektromagnetisches Feld innerhalb der Probenkammer aus, welches als evaneszente Welle bezeichnet wird. Die evaneszente Welle zeichnet sich durch die gleiche Frequenz wie das verwendete Anregungslicht aus und dringt nur wenige hundert Nanometer in die Probenkammer ein. Dies ermöglicht die explizite Anregung von Fluorophoren unmittelbar an der Glasoberfläche des Deckgläschens und führt aufgrund des extrem kleinen Anregungsvolumens zur Minimierung des Hintergrundsignals. Zudem kann die Anregung der Fluorophore im TIRF-Modus bei wechselnden Probenkammern sehr reproduzierbar gestaltet werden [96].

PALM-Messungen zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen

Neben der verbesserten Auflösung von lokalisationsmikroskopischen Aufnahmen und der Möglichkeit, strukturelle Verteilungen besser darstellen zu können, werden durch die Lokalisation eines jeden Fluorophors zusätzlich quantifizierbare Daten erzeugt. Für die Erhebung des Oligomerisierungsgrades eines Proteins sind einige Grundsätze für die PALM-Aufnahmen essentiell.

Grundlagen für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM

Eine Voraussetzung für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM ist die Detektion von ~99 % aller exprimierten Fluorophore. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die PALM-Messungen bis zu 200 000 Einzelbilder umfassen und dadurch zeitlich sehr aufwendig werden, wobei während der langen Aufnahmezeiträume kein Abweichen der Fokalebene (*drift*) stattfinden darf. Zudem muss zu Beginn einer stöchiometrischen Analyse der Messaufbau, insbesondere die Messparameter anhand bekannter Stöchiometrien eines Monomers und Dimers (beispielsweise Monomer: CD86 und Dimer: CTLA4) kalibriert werden. Insbesondere die Laserleistung des Anregungslichts ist ein entscheidender Faktor, da hierüber die Photophysik des Fluorophors (blinken und bleichen) beeinflusst wird. Die Anregung der Fluorophore im TRIF-Modus bei gleichbleibender Laserleistung bietet hierfür sehr stabile und reproduzierbare Messparameter [37].

Sofern die erforderlichen Messparameter eingestellt sind und eine PALM-Aufnahme unter oben genannten Grundsätzen durchgeführt wurde, kann eine Koordinatenliste der lokalisierten Fluorophore angefertigt werden. Die Koordinatenliste sollte dabei mit einem sehr niedrigen Schwellenwert (63 Photonen) angefertigt werden, damit bei der Lokalisation keine Fluorophore verloren gehen und der obere Grundsatz der umfassenden Detektion der Fluorophore diskriminiert wird. Anhand der Koordinatenliste kann zuerst nur die Anzahl der Lokalisationen in einem Bild bestimmt werden, jedoch nicht der

Oligomerisierungsgrad eines Proteins. Grundsätzliche sind drei wesentliche Modifizierungen des Datensatzes notwendig. (i) Es müssen lange An-Zustände des FP, welche über mehrere Einzelbilder reichen, zu Einzellokalisationen zusammengefasst werden, da in jedem Einzelbild unabhängig voneinander die Emissionsmuster der Fluorophore lokalisiert wurden. Hierfür werden die Emissionen in einem Radius von 30 nm (Lokalisations-präzision) verfolgt und zu Einzellokalisationen zusammengefasst (s. Abb. 4.29). (ii) Das Hintergrundsignal muss extrahiert werden, was ebenfalls auf der unter (i) beschriebenen Emissionsverfolgung basiert. Da zur Rekonstruktion der PALM Bilder ein verhältnismäßig niedriger Schwellenwert verwendet wurde, ist es möglich, dass Fehllokalisationen aufgrund von Hintergrundfluoreszenz detektiert werden. Deshalb müssen die Messparameter zu Beginn so eingestellt werden, dass das FP über mindestens drei Einzelbilder im An-Zustand verweilt. Alle verfolgten Emissionen, welche nur auf maximal zwei Einzelbilder detektiert wurden, werden deshalb verworfen (s. Abb. 4.29). (iii) Es muss eine räumliche Einschränkung der Quantifizierung vorgenommen werden. Zum einen gilt dabei für Oligomerisierungsanalysen ausschließlich den Bereich des Expressionssystems miteinzubeziehen (Zellumriss). Zum anderen müssen die Mono-/Polymere mittels PALM vereinzelt (nicht in Gruppierungen) auf der Zellmembran dargestellt werden können. Die Mono/Polymere werden dabei in einer PALM-Abbildung als Ansammlung von Lokalisationen dargestellt. Diese Ansammlungen müssen nun unter strikten Bedingungen (Größe, Helligkeit, Form, Abstand, etc.) ausgewählt werden, um die darin liegende Anzahl der Lokalisationen bestimmen zu können. Die Gesamtheit der Anzahl an ermittelten Lokalisation innerhalb dieser Ansammlungen können dann in einem Histogramm aufgetragen werden (s. Abb. 4.31). Diese Histogramme sind mathematisch anpassbar und lassen Rückschlüsse auf den Oligomerisierungsgrad eines Proteins zu [28].

Die mathematische Anpassung beruht auf einer Anpassungsfunktion mit zwei Konstanten. Diese beiden Konstanten werden zu Beginn der Versuchsreihe durch die Charakterisierung eines bekannten monomeren Proteins (CD86) und eines bekannten dimeren Proteins (CTLA4) bestimmt. Man erhält die Werte für die Konstanten in zwei Schritten. Zuerst wird das Histogramm des Monomers (CD86) mit freien Fitparametern angepasst. Da die Fitfunktion (s. MM; Datenauswertung; Anpassungsfunktionen für bekannte Stöchiometrien) neben den Standardvariablen nur die Konstante p enthält, erhält man dadurch den Wert für die Konstante p . Danach wird das Histogramm des Dimers (CTLA) angepasst. Hierfür fixiert man den Wert der Konstante p auf den vorher erörterten Wert. Die Konstante q wird wiederum frei angepasst. Dadurch erhält man durch die Anpassung den Wert für die Konstante q (Übersicht s. Abb. 3.3) [28].

Plasmidkonstrukte für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM

In dieser Arbeit wurde der Oligomerisierungsgrad von pflanzlichen Anionenkanälen der SLAC/SLAH-Familie bestimmt. Die Expression in tierischen Säugerzellen wurde dabei durch die Herstellung von Plasmidkonstrukten und die transiente Transfektion ermöglicht. Die Plasmide umfassten neben dem gewöhnlichen Plasmidrückgrat den tierischen CMV-Promotor, die Sequenz für das pflanzliche Kanalprotein und die des FP mEOS2.

Ein maßgeblicher Vorteil der transienten Transfektion, der Expression und der translationalen Markierung des PVI mit einem FP ist die Tatsache, dass jedes PVI genau mit einem einzigen Fluorophor markiert ist. Betrachtet man nun ein einzelnes gefärbtes Protein A kann man sehr einfach den Oligomerisierungsgrad des Proteins A bestimmen, sofern man den Fluorophor lokalisiert und das Blinkverhalten des Fluorophors bekannt ist. Solange nur ein Protein A involviert ist, bleibt die Bestimmung des Polymerisierungsgrades auch von sehr vielen Proteinen A verhältnismäßig einfach. Problematisch wird es, sobald ein Protein B involviert ist und weiterhin nur ein Fluorophor (mEOS2) zur Verfügung steht. In diesem Fall kann man nicht mehr zwischen Protein A und B unterscheiden. Das Hauptproblem dabei ist, dass weder die korrekte Expression, noch die Verhältnismäßigkeit des Expressionsgrades zwischen den beiden Proteinen verifiziert werden kann. Da dies Schlüsselbedingung für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von zwei unterschiedlichen Proteinen ist, wurden sogenannte P2A-Konstrukte für diese Fragestellung hergestellt, welche im Folgenden näher erläutert werden.

Das selbst-schneidende Peptid P2A ist ein Oligopeptid des *Porcin Teschovirus*, welches 19 Aminosäuren (ATNFSLLKQAGDVEENPGP) umfasst und ribosomal zwischen Glycin (G) und Prolin (P) geschnitten wird. Die Positionierung des P2A zwischen zwei Genen bietet die Möglichkeit, mehrere Proteine unter nur einem Promotor und somit zu gleichen Anteilen in einer Zelle exprimieren zu können. P2A ist ein sehr kleines Peptid, wodurch die Funktion der zu beiden Seiten des P2A liegenden Proteine nicht beeinflusst werden sollten. Außerdem ist das P2A in allen eukaryoten Zelltypen funktionell, da die Struktur des Ribosoms evolutionär hochkonserviert ist [97]. Dadurch konnte die Expression von zwei unterschiedlichen Anionenkanälen zu gleichen Anteilen gewährleistet werden und dadurch Stöchiometrieartefakte durch inhomogene Proteinexpression ausgeschlossen werden. Die Expression kann anhand der Fluoreszenz des FP überprüft werden.

1.3 Pflanzenanatomie und Molekularbiologie der Pflanzen

Landpflanzen sind in ihrem im Vergleich zu Algen vergleichsweise trockenen Habitat stetig vor die Problematik der Wasseraufnahme, Wasserverlust, Nährstoffaufnahme und Gasaustausch gestellt. Die phänotypische Ausbildung von spezialisierten Gewebestrukturen, insbesondere der Tracheophyten wie Sprossachse, Blätter, Wurzel, Leitgefäße, Epidermis und Stomata, sind dabei perfekte evolutionäre Anpassungen an ihren Lebensraum.

Werden mikroskopische Aufnahmen herangezogen, um Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins anhand dessen Lokalisation zu ziehen, erfordert eine gute Kenntnis der Pflanzenanatomie. Insbesondere bei der Verwendung von hochauflösenden Mikroskopietechniken, ist es von essentieller Bedeutung den Aufbau der Pflanze sehr gut zu verstehen. Im Folgenden werden deshalb alle Strukturen erläutert, welche in mehreren Kapiteln dieser Arbeit von großer Relevanz sind. Hierbei werden vor allem der Aufbau der Pflanzenwurzel, des Blattes und alle relevanten Organellen der Pflanzenzelle thematisiert.

1.3.1 Struktureller Aufbau der Landpflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (*At*), eine Brassicaceae, und *Nicotiana benthamiana* (*Nb*), eine Solanaceae, sind Vertreter der Dikotyledonen. Dikotyledonen zeichnen sich durch die drei Grundorgane Sprossachse, Blatt und Wurzel aus. Die Versorgung der Pflanze mit Wasser wird durch die Wurzeln und der Aufbau organischer Stoffe durch die Blätter gewährleistet. Die Sprossachse verbindet über die Leitgefäße die beiden anderen Grundorgane miteinander und wird hier nicht weiter thematisiert.

Die Pflanzenwurzel

Wurzeln sind Pflanzenorgane, die typischerweise unterhalb der Erdoberfläche wachsen und dort unterschiedlichsten umweltbezogenen Stressfaktoren und Widrigkeiten ausgesetzt sind und darauf reagieren. Sie nehmen Nährstoffe und Wasser aus dem Boden auf, weshalb eine angepasste Wurzel-Entwicklung, -Wachstum und -Funktion für die Pflanze überlebenswichtig und fundamental ist [98]. Dabei sind unter anderem die Pflanzenhormone Abscisinsäure (ABA) und Auxin (IAA) essentiellen Regulatoren, welche die Zellteilung in den Meristemen und die Elongation von Wurzelzellen maßgeblich beeinflussen [99, 100]. Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ist sehr gut kultivierbar und die zelluläre Organisation der Wurzel ist verhältnismäßig einfach (s. Abb. 1.7). Deshalb ist die *At*-Wurzel ein hervorragendes Zielobjekt für wissenschaftliche Fragestellungen in Bezug auf die biochemische, molekulare und strukturelle Organisation.

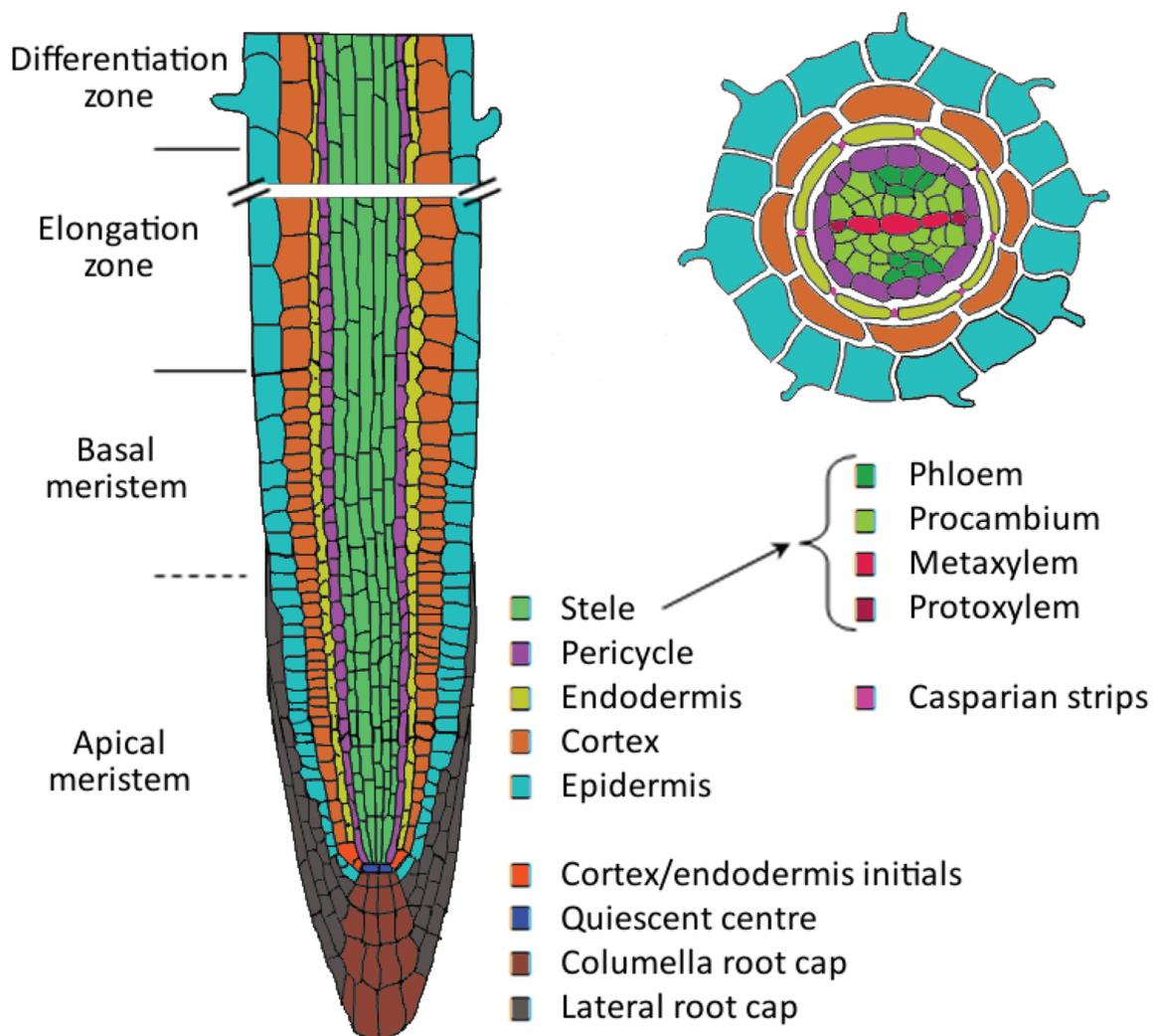


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des *At* Wurzelbaus. (Links) Der Längsschnitt verdeutlicht die apikal-basal Polarität der Wurzel. Die verschiedenen Zelltypen (verschiedenfarbig gekennzeichnet) bilden konzentrisch angeordnete Schichten um die Stele, welche die Leitgefäße beinhaltet. Die verschiedenen Entwicklungszonen bilden sich entlang der Wachstumsrichtung aus. Die Zellteilung findet in den Meristemen, insbesondere im Apikalmeristem statt. In der Elongationszone kommt es zur Zellstreckung. Die Ausdifferenzierung der Zellen findet in der Differenzierungszone statt. **(Rechts)** Die radiale Polarität ist anhand eines Wurzelquerschnitts im Bereich der Differenzierungszone dargestellt. Die ringförmige Anordnung der Epidermiszellen mit Wurzelhaaren, Kortezellen, die Endodermis mit dem Casparischen Streifen und die unterschiedlichen Zelltypen der Stele (Phloem, Procambium, Meta- und Protoxylem) sind dargestellt. Der verhältnismäßig einfache Aufbau der Wurzel ermöglicht die Unterscheidung der einzelnen Zelltypen bei der mikroskopischen Bildgebung ohne zellspezifische Färbung. Die Abbildung ist übernommen und verändert nach „De Smet, et al., 2015“ [101].

Das Blatt

Die Anatomie des Blattes ist in Abb. 1.8 schematisch dargestellt. Blätter sind auf Photosynthese und Transpiration spezialisierte laterale Auswüchse des Sprosses und perfekt an die Umweltbedingung einer Pflanze angepasst. Es zeichnet sich durch die Epidermis und den darin liegenden Stomata (vornehmlich in der unteren Epidermis), das Palisadenparenchym, Schwammparenchym und ein Gefäßsystem aus [22].

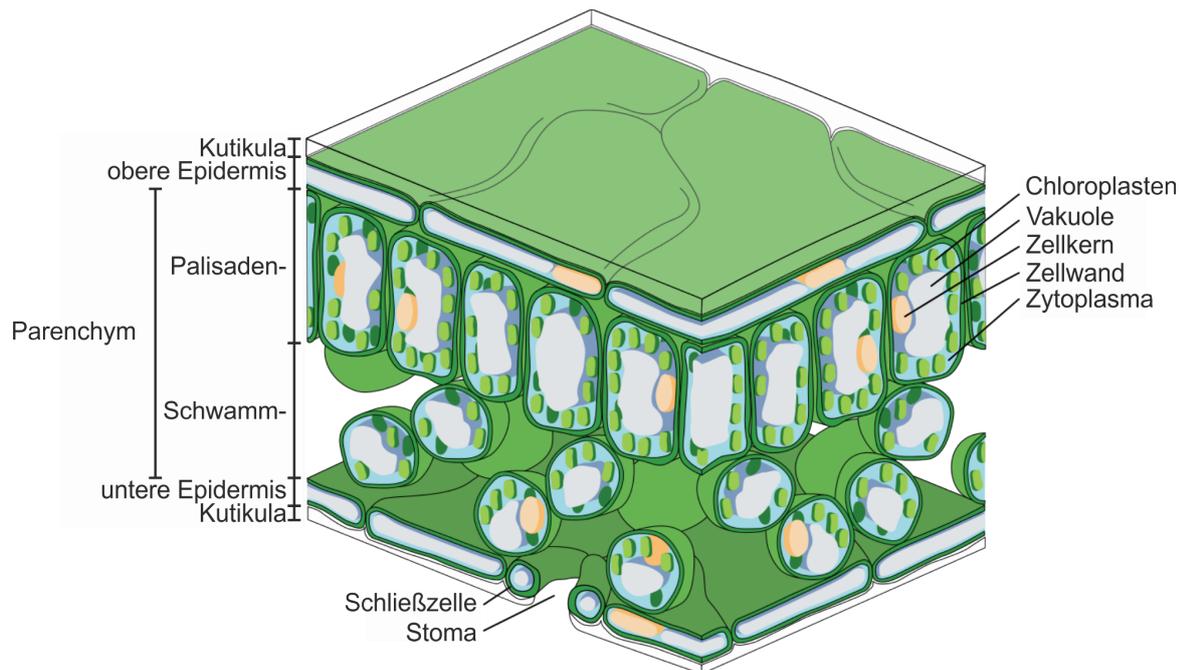


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Blattanatomie. Die von der Kutikula bedeckte Epidermis umfasst das Palisadenparenchym und Schwammparenchym und schirmt somit das Blatt nach außen hin ab. Die einzigen Öffnungen nach außen sind die aus zwei Schließzellen gebildeten Stomata, welche vornehmlich in der unteren Epidermis liegen und den Gasaustausch ermöglichen. Der photosynthetisch aktivste Bereich ist das Palisadenparenchym und zeichnet sich durch vertikal verlängerte, regelmäßig aneinandergereihte Zellen aus. Das Schwammparenchym, zeichnet sich durch einen lockeren Zellverbund von verästelten Einzelzellen aus. Die daraus resultierenden großen, luftgefüllten Hohlräume zwischen den Zellen ermöglichen die freie Diffusion und Speicherung von Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff. Das im Parenchym liegende Gefäßsystem ist hier nicht dargestellt. Die Abbildung ist übernommen aus [102].

1.3.2 Die Pflanzenzelle

Die Pflanzenzelle zeichnet sich (von außen nach innen) durch Zellwand, Plasmamembran, Zytosol, Zellkern, Zytoskelett (Mikrotubuli (MT)), Plastiden (beispielsweise Chloroplasten) und weiteren Zellorganellen, sowie einer Vakuole aus. Die Zellwand gibt der Pflanzenzelle ihre äußere Form und wurde bereits im Kapitel „1.2 Grundlagen der Expansionsmikroskopie“ genauer thematisiert [22].

Die Plasmamembran

In einer Pflanzenzelle liegt die Plasmamembran unter Normalbedingungen direkt an der Zellwand an, was durch den Turgordruck innerhalb der Zelle hervorgerufen wird. Sie beinhaltet Membranproteine, wie z.B. Rezeptoren, Kanäle oder Transporter. Die Lipid- und Proteinzusammensetzung ist dabei hochvariabel. Mit dieser Eigenschaft kontrolliert die Zelle den Transport von Molekülen in und aus der Zelle, überträgt Signale aus der Umgebung in das Zellinnere, ist an der Synthese und Formierung von zellwand-spezifischen Molekülen beteiligt und unterstützt die physikalische Verbindung von Bestandteilen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix [22].

Membrantransport

Die Plasmamembran ist impermeabel für hydrophile und geladene Moleküle/Ionen, was den Großteil der Nährstoffe und Metabolite umfasst. Dies führt zu einer unterschiedlichen Stoff- und Ladungsverteilung innerhalb und außerhalb der Zelle, und infolgedessen generiert sich ein negatives Membranpotenzial, welches von einer Zelle durch das Öffnen/Schließen von Pumpen, Kanälen und Transportern spezifisch manipuliert werden kann. In *Arabidopsis thaliana* sind ~30% von insgesamt 26 000 Genen membranproteinspezifisch, dabei werden 1 300 Proteinsequenzen eine Transportfunktion zugeschrieben. Der Membrantransport für Membranimpermeable Moleküle/Ionen wird ausschließlich durch spezifische Membrantransporter und Ionenkanäle ermöglicht und beinhaltet für die Pflanze wesentliche, unter anderen im Folgenden beschriebene Prozesse [22].

Die Aufnahme anorganischer Nährstoffe über die Plasmamembran der Wurzelzellen, insbesondere die Stickstoffaufnahme in Form von Nitrat, Ammonium oder Harnstoff, ist für die Aminosäure- und Metabolitbiosynthese und somit für den Aufbau der Biomasse der Pflanze essentiell.

Die Pflanze generiert über die spezifische Anreicherung von Salzen im Zellinneren und das daraus resultierende Einströmen von Wasser nach osmotischen Regularien, einen Turgordruck. Die Kationen K^+ , Na^+ , sowie die Gegenspieler-Anionen Cl^- und NO_3^- sind dabei die wesentlichen, involvierten Ionen. Der ausgeglichene Einsatz von Kationen und

Anionen ermöglicht dabei Ladungsneutralität beziehungsweise die Aufrechterhaltung des Membran-potentials.

Außerdem werden Umwelteinflüsse und hormonelle Signale, welche Pflanzenwachstum und Pflanzenentwicklung beeinflussen, über Veränderungen des Membranpotentials der Plasmamembran weitergeleitet.

Chloroplasten

Die im Zytosol liegenden Chloroplasten sind spezialisierte Plastiden, welche mittels Photosynthese für die Energiegewinnung der Pflanze zuständig sind. Die grüne Farbe eines Blattes basiert auf der Absorption von blauem und roten Licht des Chlorophylls a/b, welche jeweils zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{Abs}} = 430/454 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Abs}} = 662/643 \text{ nm}$ besitzen. Chlorophyll a/b fluoresziert zudem im roten Wellenlängenbereich mit Emissionsmaxima von $\lambda_{\text{Em}} = 669/644 \text{ nm}$ (in Diethyleter) [103]. Die Chlorophyll-fluoreszenz der Chloroplasten kann oftmals als Anhaltspunkt bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nützlich sein, allerdings aufgrund des sehr hellen Fluoreszenzsignals, insbesondere bei Einzelmolekül-Anwendungen, die Messungen empfindlich stören.

Das Zytosol

Im Gegensatz zur tierischen Zelle, ist das Volumen des Zytosols der meisten Pflanzenzellen relativ klein, da der Großteil des Zelllumens von der Vakuole eingenommen wird. Das Zytosol wird also von Plasma- und Vakuolenmembran umschlossen. Betrachtet man nur das Zytosol einer Pflanzenzelle, wäre dies somit nur als Umriss der Zelle innerhalb der Plasmamembran sichtbar. Im Bereich des Zellkerns ist eine linsenförmige Einbeulung sichtbar. Da sich alle Zellorganellen im Zytosol befinden, sind diese, neben zytosolischen Proteinen und dem Zytoskelett, sofern fluoreszenzmarkiert, entsprechend nur in diesem Bereich an der Zellwand sichtbar [22].

Das Zytoskelett

Das Zytoskelett durchzieht das Zytosol einer Pflanzenzelle als dynamisches, filamentöses Netzwerk. Es besteht aus Mikrotubuli (MT) und Aktinfilamenten. Es fungiert dabei unter anderem als Anker für Proteine. Das Zytoskelett ist ebenfalls an der Weiterleitung externer Stimuli beteiligt, indem es beispielsweise mit Membranrezeptoren assoziiert ist. Mikrotubuli und Aktinfilamente sind riesige Proteinpolymere, welche nichtkovalent miteinander verbunden sind. MT sind tubusförmige, α - β -Tubulin-Heterodimer-Polymere und haben eine polare Orientierung mit Minus- und Plusende [22]. Das Zytoskelett wird für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen aufgrund seiner klaren, filamentösen Organisation oftmals als Modellstruktur genutzt. Eine große Bandbreite von

Färbemethoden sind bereits etabliert und ermöglichen vielseitige Markierungsmöglichkeiten mit Fluoreszenzfarbstoffen. Zudem ermöglicht die Lage im Zytosol meist eine gute Zugänglichkeit für lichtmikroskopische Untersuchungen [104].

In dieser Arbeit konnten verschiedene Mikroskopietechniken angewendet und in der Pflanze etabliert werden. Es wurden pflanzliche Modellstrukturen charakterisiert, Auflösungsgrenzen bestimmt, mögliche Grenzen einzelner Techniken thematisiert, sowie neue Einblicke anhand hochauflösender Mikroskopietechniken gezeigt. Die S-Typ Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie [21] waren in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Die Lokalisation von SLAH2 und SLAH4 konnte in der Pflanze detaillierter beschrieben werden. Insbesondere konnte der Oligomerisierungsgrad von SLAC/SLAH-Homo- und Heteromeren, in Abhängigkeit des zytosolischen pH-Werts mittels PALM in COS7-Zellen bestimmt werden.

2 Zielsetzung

Elektrophysiologische Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten demonstrierten, dass der S-Typ Anionenkanal SLAH3 durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden kann. Zum einen wird er durch die Phosphorylierung Calcium-abhängiger Kinasen in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat stimuliert und zum anderen aktiviert er durch eine schwache zytosolische Ansäuerung ohne die Notwendigkeit eines Phosphorylierungsereignisses. Im Gegensatz dazu führt eine Heteromerisierung von SLAH3 mit der elektrophysiologisch inaktiven SLAH4 Untereinheit zu einer Inhibierung der SLAH3 Aktivität unabhängig davon ob der Anionenkanal durch eine Phosphorylierung oder durch eine zytosolische Ansäuerung aktiviert wurde. Ein Heteromer zwischen SLAH3 und der elektrisch stillen Untereinheit SLAH1 wiederum aktiviert SLAH3 in einer Nitrat- und Phosphorylierungs-unabhängigen Art und Weise. Obwohl also die Familie biophysikalisch bereits sehr gut untersucht und verstanden ist, ist auf molekularer Ebene noch nicht einmal bekannt, ob sie Monomere, Dimere oder sogar Trimere bilden. Genauso wenig ist verstanden, ob der Oligomerisierungsstatus fix ist oder dynamisch sich den äußeren Gegebenheiten anpasst. Einzelkanalströme konnten bisher in keinem heterologen Expressionssystem aufgezeichnet werden, so dass definierte Aussagen über das Verhalten einzelner Kanäle oder Kanalassemblies auf elektrophysiologischer Ebene nicht weiterführten. Selbst die zelluläre sowie die subzelluläre Lokalisation war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vollständig bekannt.

Deshalb war die Zielsetzung dieser Arbeit, anhand von lichtmikroskopischen Anwendungen die Lokalisation und die Funktionsweisen von SLAC/SLAH-Kanälen auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Zum einen sollten dabei zelluläre sowie subzelluläre Expressionsstudien von SLAC/SLAH-Kanälen Rückschlüsse auf deren Funktion zulassen. Dafür sollten neben der konventionellen Lichtmikroskopie auch verschiedene hochauflösende, fluoreszenzmikroskopische Anwendungen wie SIM und *d*STORM in pflanzlichen Geweben etabliert und optimiert werden. Die besondere Herausforderung dabei bestand in der unzureichenden Auflösung und den oft störenden Hintergrundfluoreszenz im Pflanzengewebe. Deshalb wurde die Etablierung der Expansionsmikroskopie an pflanzlichen Geweben angestrebt, um eine vielversprechende Alternative zu anderen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Techniken für subzelluläre Lokalisationen tief im Gewebe zu realisieren.

Aufgrund der starken funktionellen Abhängigkeit von SLAH3 von seinen Interaktionspartnern SLAH1 und SLAH4 wurden FRET-FLIM Messungen im pflanzlichen Gewebe angestrebt. Diese Co-Expressionsansätze sollten weitere Einblicke in die Steuerung und Interaktion der SLAC/SLAH-Untereinheiten liefern. FRET oder FRET-FLIM Interaktionsstudien erlauben die Identifikation von interagierenden Anionenkanaluntereinheiten aber diese Techniken lassen keinerlei Aussagen über den Oligomerisierungsgrad und die Stöchiometrie zwischen den beteiligten Untereinheiten zu. Deshalb war die Erhebung stöchiometrischer Daten für SLAC/SLAH Homomere und Heteromere von besonderem Interesse. Hierfür sollte die Lokalisationsmikroskopiemethode PALM verwendet werden, um die Stöchiometrie zwischen den einzelnen Kanaluntereinheiten zu bestimmen und zu klären, ob externe Stimuli die Zusammensetzung putativer Heteromere oder Homomere dynamisch verändern.

Durch das grundlegende Verständnis der Funktionsweise, Lokalisation und Heteromerisierungsstatus dieser essentiellen Anionenkanäle sollte schließlich der komplexe Mechanismus der Nährstoffaufnahme in die Pflanze und der Langstreckentransport zum Sproß besser verstanden werden. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Anpassung der Anionenkanalaktivität,- lokalisation, und -heteromerisierung unter Stressbedingungen gelegt.

3 Material und Methoden

3.1 Klonierung und DNA Herstellung

Für die Herstellung der verwendeten DNA Plasmide wurde die erweiterte Uracil-Entfernungsmethode (*uracil-specific excision reagent cloning technique* (USER) [105]) angewendet.

Für alle SLAC/SLAH-Konstrukte sowie für AtRem1.3 und ZmSUT1, welche für die Transfektion tierischer Zellen verwendet wurden, wurde der pcDNA3.1 Vektor mit dem CMV Promotor genutzt. Für die Markierung der Zielproteine wurde vornehmlich mEOS2, aber auch Dronpa, schnell faltendes Dronpa (ffDronpa), photoaktivierbares GFP (PA-GFP) und mCherry (PAmCherry) sowie verschiedene Tags (Clip-, Snap-(NEB), Halotag (Promega)) verwendet. Für CD86-mEOS2 und CTLA4-mEOS2 wurde der IRES-puro2 Vektor (Addgene Plasmide #98284 (CD86-mEOS2) und #98285 (CTLA4-mEOS2)) verwendet.

Ebenfalls wurde der pcDNA3.1 Vektor verwendet, um P2A-Konstrukte herzustellen [97], um eine Doppeltransfektion mit zwei unabhängigen Plasmiden zu umgehen und die Expression zweier Zielproteine zu gleichen Anteilen zu gewährleisten. Die Zielproteine wurden hier mit mEOS2 markiert.

Für die transiente Transformation der Tabakpflanzen wurde der modifizierte pCAMBIA3300 Vektor mit dem pUQ10 Promotor [105] verwendet. Dabei wurden die Zielproteine gegebenenfalls mit dem FRET-FLIM-Paar tSapphire oder mOrange markiert.

Bei allen Konstrukten wurden zuletzt die Kodierungssequenz der Zielproteine mit Markierung (Eurofins Genomics Germany GmbH) und die vorliegende DNA-Konzentration (NanoDrop, Thermo Scientific) überprüft.

Herstellung linearisierter Vektoren

Dafür wurden 50 µl DNA-Lösung einer Mini Präparation (Promega/Qiagen) vorgelegt und 120 µl BPC, 8 µl Pac1 Enzym, 20 µl NEB1-Puffer, 2 µl 100x BSA hinzugegeben und bei 37 °C, ÜN inkubiert. Daraufhin wurden 2 µl Pac1 Enzym, 4 µl Nt.BvC1 hinzugegeben und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die linearen

Plasmide mit Hilfe eines Kits aufgereinigt (Promega/Qiagen) und in 50 µl BPC oder EB-Puffer mit 50 µl Glycerol (87 %) eluiert und bei -20 °C gelagert. Die Qualität der linearisierten Plasmide wurde gelektrophoretisch kontrolliert. Das Augenmerk lag dabei auf der Sichtbarkeit einer einzelnen Bande im Gel. Für die PALM/dSTORM Versuche wurden Konstrukte hergestellt, bei welchen sich die PacI Kasette sowohl N- als auch C-terminal einer entsprechenden Markierung (FP, Tag) befand.

In vitro Transkription Polymerase-Kettenreaktion (IVT PCR)

Die DNA Konstrukte der zu inserierenden Proteine wurden mit Hilfe einer IVT PCR unter Verwendung der PhuCx-Polymerase mit einer Denaturierungstemperatur (*denaturation*) von 98 °C, 25 s, einer Aufsetztemperatur (*annealing*) von 57 °C, 25 s und einer Elongationstemperatur (*elongation*) von 72 °C, 20-40 s/1000 bp hergestellt, gegebenenfalls wurden die Temperaturen entsprechend angepasst. Die PCR-Produkte wurden danach mittels Gelektrophorese auf Qualität und Länge des DNA Fragments kontrolliert.

Endonukleaseverdau von methylierter DNA mittels DPN1 und USER-Reaktion

Dieses PCR-Produkt wurde daraufhin für 1 h, 37 °C und 20 min, 80 °C mit dem DPN1-Enzym verdaut. Das PCR-Produkt wurde dann durch die USER-Reaktion (1 µl USER-Enzym, 1,5 µl linearisierter Vektor, 3,5 µl PCR Produkt mit USER-Überhängen, 4 µl TE-Puffer (30 min, 37 °C und 30 min, 25 °C) in den linearisierten Vektor integriert und dieser somit geschlossen.

Plasmid-Amplifizierung, Transformation und-Aufreinigung

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurde das Produkt der USER-Reaktion in kompetente MRF⁻-E-coli Bakterien eingebracht. Hierfür wurden die MRF⁻-Bakterien (-80 °C) auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 10 µl USER-Produkt resuspendiert, für 45 s bei 42 °C mit einem Hitzeschock transformiert, danach 3 min auf Eis gestellt, auf vorgewärmten LB-Agar Petrischalen ausplattiert und bei 37 °C ÜN inkubiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in LB-Medium ÜN, 37 °C leicht schüttelnd inkubiert. Auf den Plasmiden befanden sich Antibiotikaresistenzen, wodurch die positiv transformierten Bakterien durch Zugabe entsprechender Antibiotika zum LB-Medium isoliert werden konnten. Die Plasmide wurden aus den ÜN-Kulturen mit Hilfe eines Mini/Midi-Prep Kits (Promega/Qiagen) isoliert und aufgereinigt.

Die Erstellung von Vektorkarten, Primerdesign und die Erhebung von Plasmid-datenbanken wurde mit Hilfe von *Vector NTI* (Invitrogen Corporation) durchgeführt.

Folgende Plasmide wurden hergestellt (s. Tab. 1):

Tab. 1: Plasmidkonstrukte. Liste der hergestellten Plasmidkonstrukte für die transiente Transfektion.

Verw. Kürzel	Markierung	Zielprotein	Vektor (Promotor)
Plasmide für die transiente Transfektion tierischer Zellen in Zellkultur			
mEOS2::SLAC1		SLAC1	
mEOS2::SLAH2		SLAH2	
SLAH3::mEOS2		SLAH3	
mEOS2::SLAH3	mEOS2		
SLAH3-HK::mEOS2		SLAH3-H330K H454K	
SLAH3-HA::mEOS2		SLAH3-H330A H454A	
SLAH3-HF::mEOS2		SLAH3-H330F H454F	
SLAH4::mEOS2		SLAH4	
SLAC1::Snap			
SLAC1::Clip		SLAC1	
SLAC1::Halo			pcDNA3.1 (CMV)
SLAH1::Snap		SLAH1	
SLAH1::Clip			
SLAH3::Snap		SLAH3	
SLAH3::Clip	Tag		
SLAH3::Halo			
SLAH3-DG::Snap			
SLAH3-DG::Clip		SLAH3-G264D	
SLAH3-DG::Halo			
SLAH4::Snap		SLAH4	
SLAH4::Clip			
ZmSUT1opti::Snap		ZmSUT1 optimiert	
Plasmide für die transiente Transfektion tierischer Zellen in Zellkultur mit P2A-Konstrukten			
SLAH1::mEOS2--P2A--			
SLAH3::mEOS2		SLAH1 und SLAH3	
SLAH3::mEOS2--P2A--			
SLAH1::mEOS2			
SLAH3::mEOS2--P2A--		SLAH3 und SLAH4	pcDNA3.1 mit P2A (CMV)
SLAH4::mEOS2	mEOS2		
SLAH4::mEOS2--P2A--			
SLAH3::mEOS2			
SLAH1::mEOS2--P2A--		SLAH1	
SLAH1::mEOS2			
SLAH1::mEOS2--P2A--			
SLAH4::mEOS2		SLAH1 und SLAH4	
SLAH4::mEOS2--P2A--			
SLAH1::mEOS2			

Material und Methoden

Plasmide für die transiente Transformation (Inokulation) von Tabakpflanzen			
mO::tS::SLAH3	mOrange und tSapphire	SLAH3	
mO::SLAH1		SLAH1	
SLAH3::mO		SLAH3	
mO::SLAH3	mOrange	SLAH3	pCAMBIA
SLAH4::mO		SLAH4	3300
mO::SLAH4		SLAH4	(pUBQ10)
SLAH3::tS		SLAH3	
tS::SLAH3	tSapphire	SLAH3	
SLAH4::tS		SLAH4	
tS::SLAH4		SLAH4	

3.2 Probenvorbereitung pflanzlicher Präparate

Es wurde ausschließlich mit den Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (*At*) und *Nicotiana benthamiana* (*Nb*) gearbeitet, welche beide zu den höheren Pflanzen gehören. Dabei wurde nach folgendem Prinzip vorgegangen (Übersicht s. Abb. 3.1).

Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana*

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wurde auf eckigen 120 mm Petrischalen durchgeführt. Hierzu wurden diese unter sterilen Bedingungen ~5 mm hoch mit 1x Murashige und Skoog (MS) Medium (500 ml Medium mit 2,207 g MS versetzt mit Vitaminen und MES (Duchefa, Nr MO255.0050, Konz. 4905,19 mg/l) 2 % Saccharose, pH auf 5,9 mit NaOH und 1,2 % Kobe-Agar zugeben) gegossen. Die *At* Samen wurden 15 min bei RT in 2 ml Sterilisationslösung (6 % Natriumhypochlorid (NaCOH) und 0,02 % Triton X-100) im Überkopffrotator sterilisiert. Danach mit sterilem Leitungswasser 3x gespült und bei 4 °C gegebenenfalls für 1-7 Tage gelagert. Die Samen wurden unter Zuhilfenahme einer 1 ml Pipette unter sterilen Bedingungen ausplattiert, dabei wurde auf genügend Platz zwischen den einzelnen Samen (ca. 20-40 Samen/Platte) geachtet. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 1-3 Tage zum stratifizieren bei 4 °C aufbewahrt, um eine gleichmäßige Keimung zu gewährleisten. Die Platten wurden dann in aufrechter Position im Klimaschrank bei 16/8 h, Licht/Dunkel, 22 °C und 60 % Luftfeuchte für 1-2 Wochen inkubiert.

Die *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 16/8 h Licht/Dunkel in Erde bei 26/22 °C Licht/Dunkel und einer Photonenflussdichte von 600 $\mu\text{mol } \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Die 5-14 d alten Setzlinge wurden dann für die weiteren Versuche verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen mindestens den dritten Blattstand aufwiesen.

Fixierung von Pflanzengewebe

Die Fixierung der Pflanzengewebestücke oder ganzen *At*-Pflänzchen wurde basierend auf [106] durchgeführt. Dafür wurde das Pflanzenmaterial in 2 % FA (4 % FA für Dünnschnitte/4 % FA mit 0,25 % GA für ExM-Versuche), 0,1 % Triton X-100 in MTSB (Mitrotubuli-Stabilisierungspuffer (100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 90 mM KOH, pH 7 (mit 10 M KOH))) gebracht und 2x (bis 6x) für 2 min (bis 5 min) ein Vakuum angelegt, bis die Probe auf den Grund des Reaktionsgefäßes abgesunken war. Dafür wurde das offene Reaktionsgefäß mit der Pflanzenprobe in einen Excikator gestellt und das Vakuum mit Hilfe einer Vakuumpumpe angelegt. Die genaue Beobachtung der Pflanzenteile bei diesem Schritt ist essentiell, da nur so beurteilt werden konnte, ob die Fixierlösung in das gesamte Pflanzengewebe eindringen konnte.

Problematisch sind hier die luftgefüllten Hohlräume in den Blättern, insbesondere das Schwammparenchym sowie die stark hydrophobe Kutikula. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C unter leichtem schütteln für 30-100 min in der Fixierlösung inkubiert. Bei ExM-Versuchen wurde die Probe bis zu 96 h bei 4 °C in der Fixierlösung belassen. Dieser Schritt war von den folgenden Versuchen und des Probenquerschnitts abhängig. Zuletzt wurde für mindestens 10 min in ddH₂O in einem frischen/anderen Reaktionsgefäß gewaschen. Danach folgten weitere Probenvorbereitungsschritte.

Zellwandverdau und Permeabilisierung von Pflanzengewebe

Da das Pflanzenzellgewebe schlecht durchlässig für größere Moleküle wie Antikörper oder auch Farbstoffe ist, wurde zuerst die Zellwand teilweise verdaut und die Zellmembran permeabilisiert. Der Zellwandverdau wurde standardmäßig mit 0,2 % Driselase (Sigma, #D8037) und 0,15 % Macerozyme R-10 des *Rhizopus sp.* (Serva, #28302) in 2 mM MES (Sigma, M8250) bei pH 5 für 30-60 min bei 37 °C durchgeführt. Bei einigen Versuchen wurde Driselase durch Cellulase „onozouka“ R-10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltd, Lot. 121129-02) ersetzt.

Die Permeabilisierung wurde mit 3 % Triton X-100, 10 % DMSO in MTSB, 15-20 min bei 37 °C durchgeführt. Für eine etwas schonendere Permeabilisierung wurde 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween® 20 (Sigma, #9005-64-5) in MTSB 15-20 min bei 37 °C eingesetzt. Anschließend wurde je 3 min, 4x mit MTSB gewaschen.

3.3 Färbungen von Pflanzenproben

Um eine bildliche Darstellung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops zu ermöglichen, wurden verschiedene Strukturen oder Einzelproteine in Pflanzen oder Pflanzenteilen mit den im Folgenden beschriebenen fluoreszenten Markern versehen.

3.3.1 Fluoreszierende Proteine als Markierung

Hier werden zwei Umsetzungen unterschieden. Zum einen wurden stabile Pflanzenmutanten verwendet, zum anderen wurden die Pflanzen transient mit einem entsprechenden Plasmid transformiert.

Stabile Pflanzenmutanten

Es wurden stabile Pflanzenmutanten verwendet, die ein mit einem FP markiertes Zielprotein in sich tragen. PIN1::GFP, PIN2::GFP, SLAH2-prom::3xYFP, und SLAH2-prom::SLAH2-gen::YFP. Es handelt sich dabei um Taiwan trans. *At*-Mutanten,

welche vom Lehrstuhl für Botanik 1 (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurden. Für die Messungen wurden die Pflanzen wie in Kapitel 3.2 „Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana*“ beschrieben kultiviert, für sekundäre Färbungen wie folgt präpariert (s. 3.3.2; 3.3.3) oder gemessen (s. 3.6).

Transiente Transformation von Tabakblättern

Nb Pflanzen wurden transient transformiert. Dafür wurden die Blätter der Tabakpflanzen mit dem kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 nach [107, 108] inokuliert, wodurch die Expression eines Zielproteins (s. Tab. 1) insbesondere in den Blatt-Epidermiszellen ermöglicht werden kann. Diese Technik besticht durch seine hohe Effizienz unter dem Gesichtspunkt der leichten Zugänglichkeit der Blattoberflächen bei bildgebenden Messmethoden.

Herstellung kompetenter Agrobakterien

Die Agrobakterien wurden in 5 ml YEB-Medium, ÜN bei 28 °C unter schütteln herangezogen. Davon wurde jeweils 1 ml abzentrifugiert (1 min, RT, max. Geschw.) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem Leitungswasser gelöst und wieder abzentrifugiert, dieser Waschschrift wurde insgesamt 5-mal wiederholt. Das gewaschene Pellet wurde zuletzt in 100 µl Wasser gelöst und alle 5 Ansätze dann wieder in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt. Sollte hier die Menge an beinhaltenen Agrobakterien nicht ausreichen, besteht die Möglichkeit, nochmals zu zentrifugieren und einen Teil des Überstands (~200 µl) zu verwerfen. Dieses Produkt wurde zu je 45 µl aliquotiert und auf Eis gestellt.

Transformation der Agrobakterien

Die 45 µl Aliquots mit Agrobakterien wurden mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids (~10 ng/µl) vermischt und in eine 2 mm/2500 V Elektroporationsküvette überführt. Die Küvetten wurden dafür vorher ebenfalls auf Eis gekühlt (gegebenenfalls vor der Elektroporation trocken reiben). Die Elektroporation wurde mit dem Electroporator 2510 (Eppendorf) durchgeführt, dafür wurde 2 Pulse appliziert, dabei sollte die Zeitkonstante >5 angezeigt werden. In die Küvette wurde nun 350 µl SOC-Medium hinzugegeben, vermischt und das Gesamtvolumen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 1 h bei RT mit 500 UpM geschüttelt und letztlich auf Agarplatten mit YEB-Agar, Gentamycin, Rifampicin und Kanamycin ausgestrichen. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, 2-4 Tage bei 28 °C inkubiert und dann bei 4 °C bis zu 3 Wochen gelagert.

Inokulation von Tabakblättern

Man impft 15 ml YEB-Medium mit Gent/Rif/Kan in einem 50 ml Falconröhrchen mit den transformierten Agrobakterien an und inkubiert bei 28 °C, ÜN. Dieses für 10 min, 2500 g, 20 °C zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Pellet in 10 ml sterilem ddH₂O lösen. Nochmals zentrifugieren, den Überstand verwerfen und in 5 ml Agromix

(10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,6 (KOH) und 150 µM Acetosyringone in sterilem ddH₂O) lösen. Diesen Ansatz 2 h in Dunkelheit bei RT auf dem Taumelschüttler inkubieren. Um eine immergleiche Agrobakterienmenge bei der Inokulation zu gewährleisten, muss nun die Konzentration bestimmt werden. Dafür wird die optische Dichte einer 1:10 Verdünnung bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt (NanoDrop, Thermo Scientific). Für die Inokulation wurden nun die Agrobakterien auf einen OD₆₀₀ von 1 eingestellt (mit Agromix verdünnt) und im Verhältnis 1/6 19K *enhancer* Agrobakterium und 5/6 Agrobakterium mit Plasmid (bei Doppelinokulation 2,5/6 Konstrukt A und 2,5/6 Konstrukt B) eingesetzt.

Für die Inokulation wurde eine 1 ml Spritze verwendet. Diese wird an die Blattunterseite der Tabakpflanze gesetzt, und mit leichtem Gegendruck eines Fingers von der Blattoberseite wurden die Agrobakterien in das Schwammparenchym via der Stomata eingebracht. Die infiltrierten Bereiche des Blattes sind direkt nach Inokulation sehr gut sichtbar und wurden gegebenenfalls markiert. Eine Verletzung des Blattgewebes im direkten Bereich des Spritzenkontakts ist nicht zu verhindern, diese Stellen wurden jedoch nicht für weitere Versuche verwendet.

3.3.2 Färbung mit organell-spezifischen Farbstoffen

Färbung mit Propidium Iodide

Mit Propidium Iodide (PI, Sigma, #81845) kann entweder der Zellkern oder die Zellmembran mit 10 µg/ml PI in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 für 5 min bei RT gefärbt werden. Zur Färbung des Zellkerns wurden die permeabilisierten und fixierten Pflanzen/-teile verwendet. PI kann bei diesen Proben die Zellmembran durchdringen und wirkt als Nukleinsäureinterkalator. Zur Färbung der Zellmembran wurde lebendes Pflanzen-gewebe, welches weder permeabilisiert oder der Zellwandverdau durchgeführt wurde, verwendet da PI die intakte Plasmamembran nicht durchdringen kann. Anschließend 3x in entsprechendem Medium (Tris-HCl, MTSB, PBS, H₂O) waschen.

Färbung mit Calcofluor-weiß

Mit Calcofluor-weiß (CFW, fluorescent brightener, Sigma, #F6259) lassen sich spezifisch Zellwände (cellulose) anfärben. Die Pufferbedingungen variierten dabei für intakte und fixierte Pflanzen mit 0,4 µg/ml CFW in 10 mM Tris-HCl, pH 9,2 für 5 min bei RT/37 °C und für die Färbung der Dünnschnitte, 0,1 mg/ml CFW in PBS für 10 min bei RT. CFW wurde als stock (1 mg/ml) in DMSO gelöst. Anschließend 3x in entsprechendem Medium (Tris-HCl, MTSB, PBS, H₂O) waschen.

3.3.3 Immunfärbung

Die spezifische Bindung von Antikörpern kann optimiert werden, indem man mögliche Bindestellen für den Antikörper blockiert. Dafür wurden die Proben für die Immunfärbungen vorher mit 2 % BSA (Sigma, #A3983) in MTSB/PBS, die Dünnschnitte zuerst mit 50 mM Glycin in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,6 für 5 min inkubiert, dann mit 0,1 % BSA, 0,05 % TWEEN 20 in 50 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,6, blockiert. Das Blockieren wurde immer direkt nach dem Probenvorbereitungsschritt „Permeabilisierung und Verdau“ (s. Kapitel 3.2, „Zellwandverdau und Permeabilisierung von Pflanzengewebe“) durchgeführt.

Folgende Antikörper wurden für die Immunfärbung verwendet:

Tab. 2: Antikörper. Im Folgenden sind die Primären-und Sekundären Antikörper aufgelistet, welche für die Immunfärbung der Pflanzenproben verwendet wurden. Die Antikörper wurden für verschiedene Anwendungen benutzt: für die Färbung von unbehandelten *At*-Wurzeln (*d*STORM MT), Expansions-Mikroskopie vor der Gelierung (ExM v. Gel.) Expansions-Mikroskopie nach Verdau (ExM n. Vd.), Expansions-Mikroskopie nach Denaturierung (ExM n. Den.).

Primäre Antikörper					
Zielprotein	Spezifikation	Konz. Stock [µg/ml]	Eingesetzte Verdünnung	Anwendung	Vertreiber
Anti β-Tubulin	Mouse mAb	2000	1:1000	<i>At</i> -Wurzel	Sigma, #T8328
Anti α-Tubulin	Rabbit	1000	1:200	ExM v. Gel. ExM n. Den.	Abcam, #ab18251
Sekundäre Antikörper					
Markierung	Spezifikation	Konz. [µg/ml]	Eingesetzte Verdünnung	Anwendung	Vertreiber
Alexa Fluor 647	Goat anti Mouse IgG	2000	1:200	<i>At</i> -Wurzel	Life technologies #A21237
Alexa Fluor 532	Goat anti Rabbit IgG	2000	1:200	ExM n. Den.	Life technologies, #A11009
Alexa Fluor 488	Goat anti Rabbit F(ab') ₂	2000	1:400	ExM v. Gel. ExM n. Den.	Life technologies, #A11070

Standardproben

Zur Immunfärbung der *At*-Wurzeln wurde der primäre Antikörper für 3 d bei 4 °C, der sekundäre Antikörper für 3 h bei RT inkubiert. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in MTSB verdünnt. Dazwischen wurde 2x (20 min/2 h) mit 1 % BSA in MTSB gewaschen.

Expansionsmikroskopie

Die Immunfärbung der ExM Proben wurden entweder vor der Gelierung oder nach dem Verdau beziehungsweise der Denaturierung der gelierten Probe durchgeführt.

Immunfärbung vor der Gelierung

Die Antikörper wurden dafür in 2 % BSA in PBS verdünnt (s. Tab. 2) und die Probe für 24 h bei RT inkubiert. Dazwischen und danach wurde 3x mit PBS gewaschen. Damit eine Positionsänderung des Fluorophors in der Probe ausgeschlossen werden kann wurde hier mit 0,25 % GA in PBS für 20 min bei RT nachfixiert.

Immunfärbung nach dem Verdau/Denaturierung der gelierten Probe

Für die Immunfärbung der bereits verdauten beziehungsweise denaturierten und gelierten Probe wurde der primäre und sekundäre Antikörper wie in Tab. 2 angegeben in PBS verdünnt. Dazwischen wurde 3x für je 2 h mit PBS gewaschen. Das Gel wurde mit beiden Antikörpern für 18 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (60 UpM) inkubiert. Danach wurden die Gele in eine große Petrischale mit ddH₂O zur Expansion überführt.

Dünnschnitte

Der Antikörper wurde mit 0,1 % BSA, 0,05 % TWEEN 20 in 50 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,6 verdünnt und 30 min bei RT auf die Probe gegeben. Danach wurde mit dem gleichen Puffer (ohne Antikörper) 3x 5 min gewaschen und zuletzt mit ddH₂O gewaschen und gespült. Danach wurde die Probe in Mowiol® 10-98 (Sigma, #10852) eingelassen, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack verschlossen.

3.4 Dünnschnitte von Pflanzenwurzeln

Die Präparationsschritte wurden auf Grundlage von [109] durchgeführt. Dabei wurde das fixierte und mit PBS gewaschene *At*-Wurzelstück 15 min bei RT mit 50 mM NH₄Cl (Sigma, #A9434) in PBS abgesättigt, 5x 3 min in H₂O gewaschen und auf 4 °C herabgekühlt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Pflanzenproben spätestens in ein Glasgefäß überführt. Die Entwässerung wurde in fünf Einzelschritten mit verschiedenen EtOH-Konzentrationen durchgeführt. Bei 70 % und 90 % EtOH wurde 0,2 % Uranylacetat (Serva) hinzugegeben. Letztlich wurde mit einem harten LR-White Resin (Agar scientific, AGR1280) infiltriert. Bei allen Arbeitsschritten wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Proben nicht austrocknen, da dies zur Zerstörung des Präparats führen würde. Die Proben wurden dann in Gelatine kapseln mit LR-White überführt, verschlossen und für min 3 d bei 40 °C im Wärmeschrank polymerisiert (s. Tab. 3).

Die eingebetteten Pflanzenwurzeln wurden grob mit einer Rasierklinge getrimmt, und die Dünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (EM UC7, Leica) mit einer Dicke von 100-500 nm geschnitten.

Tab. 3: Präparationsschritte für Dünnschnitte. Entwässerung, Infiltrierung und Polymerisationsschritte zur Einbettung von Pflanzenpräparaten in LR-white Resin.

EtOH in H ₂ O [%]	Inkubationszeit [min]	Temperatur [°C]	Präparationsschritt
30	2x 15	4	Entwässerung
50	2x 30	-20	
70 + UA	2x 30	-20	
90 + UA	2x 30	-20	
100	2x 60	-20	
100/LR-white 1:1	ÜN	4	Infiltrierung
LR-white	1 h	4	
LR-white	3-4 h	4	
LR-white	ÜN	4	
LR-white	3-4 h	RT	Polymerisierung
LR-white	< 3 d	40	

3.5 Expansionsmikroskopie

Basierend auf den bereits etablierten Präparationsprotokollen für Expansionsmikroskopie (ExM) [73, 75] wurde hier versucht, durch entsprechende Änderungen des Protokolls die ExM von Pflanzenproben zu ermöglichen. Beim Waschen der Probe ($\leq 2 \times 15$ min) zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde diese meist in ein neues Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Pufferlösung überführt. Folgende grundlegende Schritte wurden durchgeführt.

Proteine verknüpfen

Um später alle Proteine einer Probe in das Gel zu verknüpfen, wurde entweder in 1 mM Metacrylsäure-N-hydroxysuccinimidester (MA-NHS, Sigma, #730300) für 1 h bei RT oder in 4 % FA, 30 % Acrylamid (AA, Sigma, #A9099) in PBS ÜN (bis zu 5 d) inkubiert. Ebenso wurde die Succinimidyl-ester der 6-((Acryloyl)amino)hexansäure (Acryloyl-X, SE, (AcX), Life Technologies, #A20770) verwendet. Dabei wurden 2 mg AcX (Aliquotiert, getrocknet, gelagert bei -20 °C) zuerst in 20 μ l DMF (10 mg /ml) gelöst und dann mit 1980 μ l, 100 mM MES, 150 mM NaCl in H₂O verdünnt (0,1 mg AcX/ml Puffer). Die fixierte, teilweise verdaute und permeabilisierte Probe wurde dann ÜN (bis zu 5 d) in dieser Lösung bei RT inkubiert. Danach wurde bei allen Ansätzen mit PBS gewaschen. Teilweise wurde nach diesem Schritt bereits eine Immunfärbung durchgeführt (s. 3.3.3).

Gelierung

Für die Gelierung wurde die Pflanzenprobe teilweise bereits Tage zuvor in Gelierungslösung (2,5 % Acrylamid (AA), 8,55 % sodium Acrylat (SA), 0,15 % Bis-Acrylamid (Bis-AA), 2 M NaCl in 1x PBS (Gelierungslösung mit 10x PBS ansetzen und mit H₂O verdünnen, da sonst die Osmolarität nicht stimmt)) inkubiert. Bei der eigentlichen Gelierung wurde die Probe auf Eis gestellt. Zur Gelierungslösung werden nacheinander jeweils 20 μ l, 10 %ige 4HT (Endkonzentration 0,2 %), 10 %ige TEMED (Endkonzentration 0,2 %) und 0,5 %ige APS (Endkonzentration 0,01 %) hinzugegeben. Wichtig ist, dass der Aktivator APS zuletzt hinzugegeben wird und dass alle Medien und Probengefäße ständig gut gekühlt werden, da es sonst zur frühzeitigen Polymerisierung des Gels kommen kann. Die Pflanzenprobe wird dann für 5 min bei 4 °C auf Eis inkubiert, bevor die Gelierungslösung gewechselt wird und weitere 25min -2h auf Eis inkubiert. Zur Polymerisierung wurden die Proben entweder im Reaktionsgefäß belassen (meist PDMS-Kammer), in eine aus Objektträgern und Deckgläschen gebauten Gelierungskammer [110], oder direkt auf Parafilm (Sigma, #P6543) in einem kleinen Tropfen Gelierungslösung, welcher mit einem runden Deckglas abgedeckt wird, überführt

und in einer Kammer mit hoher Luftfeuchte für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Gelierung wurde das Gel mit einer Rasierklinge auf eine Minimalgröße anhand der Umriss der Probe getrimmt.

Anmerkung: Eine Gelierung und entsprechende Expansion von *Xenopus laevis* Oozyten, an welchen die meisten elektroфизиologischen Messungen zu SLAC/SLAHs durchgeführt wurden, konnte nicht bewerkstelligt werden.

Verdau, Denaturierung und Expansion der ExM Proben

Es ist anzunehmen, dass der Verdau der gelierten Probe der wichtigste Arbeitsschritt für die erfolgreiche und homogene Expansion der Probe ist. Es gab zwei verschiedene Versuchsansätze: Zum einen den Verdau der Probe mittels Enzyme, zum anderen die der Denaturierung.

Enzymatischer Verdau

Bei einer Probe wurden die Zellwand und der Proteinverbund unabhängig voneinander verdaut. Die Reihenfolge der beiden Schritte wurde variiert. Die Zellwand wurde mit Hilfe von 0,5 % Cellulase, 0,5 % Driselase, 0,5 % Macerozyme und 0,05 % Pectolyase verdaut. Die Enzyme wurden dabei in unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt und in Celluloseverdaupuffer (Cellu-puffer) 50 mM MES, 1 mM EDTA (oder ohne EDTA), 0,5 % Triton X-100, 0,8 M Guanidin HCl (oder 0,8 M NaCl), pH 5 gelöst.

Der Verdau des Proteinverbundes wurde durch die Proteinase K (PK from *Tritirachium*, Sigma, #4850) bewerkstelligt. Die Proteinase K wurde dabei in einer Konzentration von 8 U/ml in PK-Puffer 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,8 M guanidin, pH 8 gelöst.

Da die Cellulaseaktivität und der Verdauungsgrad durch die PK mit Veränderung der Temperatur und pH beeinflusst wird [111], wurden die Pufferbedingungen, Enzymkonzentrationen, Inkubationszeiten (1 h-5 d) und Temperatur (RT-37 °C) variiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gel im Verdaupuffer frei schwimmen konnte (mindestens 10-faches Volumen des Gelvolumens).

Denaturierung

Das Aufweichen beziehungsweise das komplette Auflösen des Verbundes der Zellorganellen wurde außerdem mittels Denaturierung wie in [83] beschrieben durchgeführt. Hier wurde die Probe in 200 mM NaCl, 200 mM SDS (Natriumlaurylsulfat), 50 mM Tris, pH 9 für 24 h bei 37 °C, 4 h bei 70 °C und 16 h bei 95 °C inkubiert. Bei den denaturierten Proben wurde hier meist eine Immunfärbung durchgeführt (s. 3.3.3)

Expansion

Die verdaute Probe wurde nun in eine ausreichend große Petrischale mit ddH₂O überführt und bis zur vollständigen Expansion ~4 h bei RT inkubiert. Das Gel wurde bis zur CLSM-Messung darin aufbewahrt.

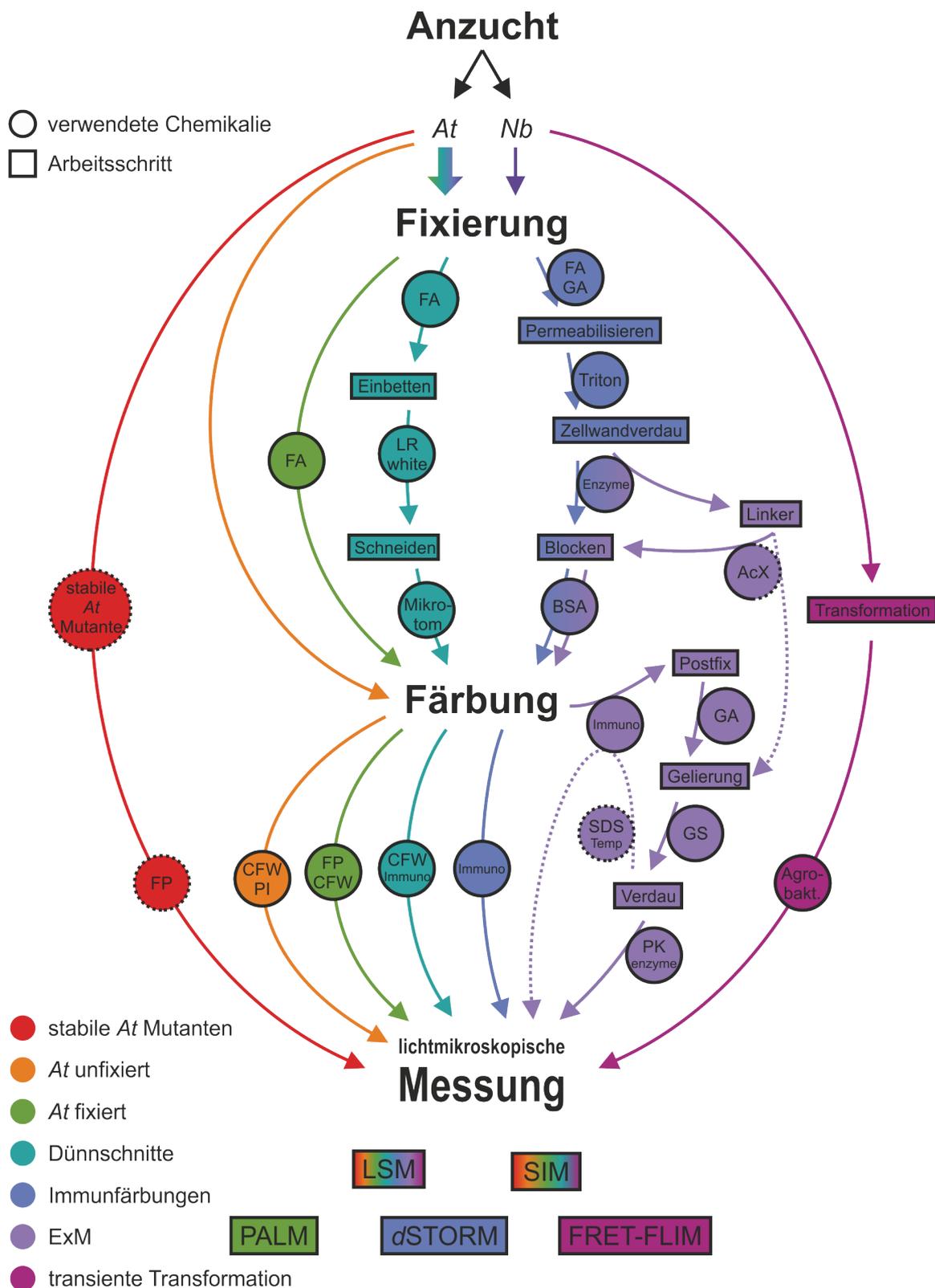


Abb. 3.1: Übersicht über die Pflanzenprobenpräparation. Hier sind die Einzelschritte der Probenvorbereitung aus Kapitel 3.2- 3.5 und die jeweils verwendete Messmethode skizziert.

3.6 Zellkultur und Probenvorbereitung von Säugerzellen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. COS7 (Nieren-Fibroblasten-Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze) wurden in DMEM F12 mit L-Glutamin (Sigma, #D8062), 10 % FBS (Sigma, #F7524) und 1 % Penicillin-streptomycin (Sigma, #P4333) kultiviert. HEK293 (menschliche embryonale Nierenzelllinie) sowie HeLa-Zellen (menschliche Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms) wurden in RPMI-1640 mit L-Glutamin (Sigma, #R8758) versetzt mit 1 % MEM nicht essentielle Aminosäurelösung (Sigma, #M7145), 1 mM Natriumpyruvat (Sigma, #S8636), 10 % FBS (Sigma, #F7524) und 1 % Penicillin-streptomycin (Sigma, #P4333) kultiviert. Für die mikroskopischen Messungen wurden die Zellen auf einem Deckglas mit 8 Kammern (8 well chambered coverglass, Nunc, Lab-Tek, Thermo Fisher Scientific, #155409) ausgesät. HEK293 Zellen wurden in serumfreiem Medium auf die zuvor Poly-D-Lysin beschichtete Glasoberfläche (2-4 h, RT, trocknen ÜN) ausgesät.

Färbung von Proben mit Tag

Für die Transfektion mit den Tag-Plasmiden wurden 2×10^4 HEK293 Zellen pro Kammer ausgesät und nach 12 h mit 250 ng DNA und 0,75 µl jetPRIME (Polyplus, #16Y0304K5) 8 min transfiziert. Nach 2-6 h wurde das Medium gewechselt und nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 4 % FA (Endkonzentration im Medium) zum Wachstumsmedium (CGM) für 20 min bei RT durchgeführt. Permeabilisiert wurde für 1 min bei RT mit 0,1 % Triton X-100. Die Färbung wurde dann zuletzt 1 µM Farbstoff mit Tag und 1 % BSA in PBS für 30 min bei RT bewerkstelligt. Zwischen den einzelnen Schritten und final wurde jeweils 3x mit PBS gewaschen.

Probenvorbereitung für PALM Messungen

Die PALM-Messungen wurden ausschließlich mit COS7 Zellen durchgeführt. $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer wurden nach 4 h mit dem Transfektionsmedium jetPRIME (Polyplus, #16Y0304K5) transfiziert. Anhand vorangegangener Versuche wurde die eingesetzte DNA Menge auf 250 ng DNA/Kammer und die Inkubationszeit auf 36 h festgesetzt. Die darauffolgende Fixierung der Zellen wurde auf Eis durchgeführt, um Proteinbewegungen während des Fixierungsprozesses zu minimieren. Um einen Temperaturschock zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Fixierung erst 10 min bei RT und dann 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit Fixierungspuffer (4 % FA (Sigma, #SHBJ4923) und 0.1 % GA (Sigma, #SLBS4196) in PBS) für 10 min auf Eis und 10 min bei RT fixiert, 3x mit PBS gewaschen und danach gemessen. Die zusätzliche Ansäuerung der verschiedenen SLAHx-Versuche wurden mit Ansäuerungspuffer (10 mM MES, 130 mM

NaCl, 2 mM MgCl₂ 2 mM CaCl₂ 10 mM NaAc (Sigma), pH auf 5.5 mit KOH eingestellt) durchgeführt. Der Ansäuerungspuffer wurde auf die lebenden Zellen gegeben und für 10 min bei 37 °C, 10 min bei RT und 10 min auf Eis inkubiert. Die Fixierung der Zellen wurde zuerst 10 min auf Eis in Ansäuerungspuffer (mit 4 % FA, 0,1 % GA) und danach für 10 min bei RT in Fixierungspuffer durchgeführt. Zuletzt ebenfalls 3x mit PBS gewaschen und schließlich bei neutralem pH in PBS gemessen.

Bei allen Medien- und Waschpufferwechsel wurde mit zwei 1 ml Pipetten gearbeitet (PPT, s. Abb. 3.1). Dabei dient eine dieser Pipetten als Frischmediumträger, die andere als Altmediumaufnehmer. Diese wurden in den gegenüberliegenden Ecken der Probenkammern angesetzt, das alte Medium wurde bis auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm in der Probenkammer aufgenommen, woraufhin langsam Frischmedium durch die andere Pipette eingelassen wurde. Eine Zeitlang wird so gleichzeitig Altmedium aufgenommen und Frischmedium zugegeben, bis keine Frischmedium in der Pipette verbleibt. Dies führt dazu, dass die Probenoberfläche niemals ohne Flüssigkeit verbleibt und die Intaktheit aller biologischen Strukturen, insbesondere Membran-Organellen wie Plasmamembran, ER und Golgi-Apparat, wurde dadurch gewährleistet.

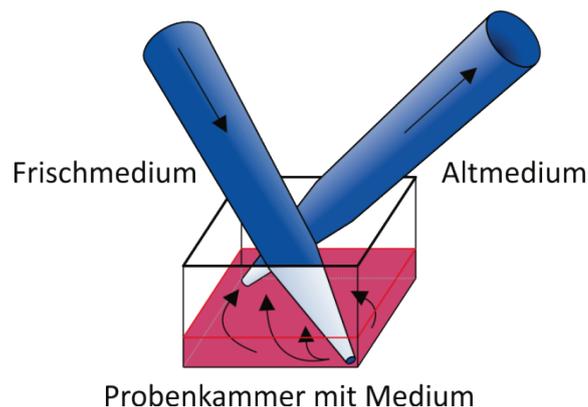


Abb. 3.2: Zwei Pipettenteknik (PPT). Die PPT ermöglicht den Austausch von zwei Medien in einer Probenkammer, ohne dass der Boden der Probenkammer trocken gezogen wird. → zeigen den Mediumfluss an.

3.7 Fluoreszenzmikroskopische Messungen

Für alle Fluorophore wurden Filter und Anregungswellen anhand der SearchLight-Fluoreszenzspektren (Semrock, <http://www.searchlight.semrock.com>) gewählt.

3.7.1 Hochauflösende Lokalisationsmikroskopie

Weitfeldmikroskopaufbau

Für die Erhebung lokalisationsmikroskopischer Daten wie PALM oder *d*STORM wurde ein selbstgebauter Weitfeldmikroskopaufbau verwendet. Als Mikroskop diente dabei ein inverses Olympus IX71 (Olympus). Als Anregungslaser wurden die Wellenlängen 405 nm, 488 nm (iBeam smart series, Toptica Photonics), 514 nm, 561 nm und 639 nm (0,5 W/0,5 W/1 W, Genesis MX STM Series, Coherent) verwendet.

Mit Hilfe entsprechender optischer Bauteile (Spiegel (BB1-E02, Thorlabs), Bandpassfilter (10 nm Bandbreite, Clean-Up-Filter, Semrock) und dichroitische Spiegel (multiplex procedure LaserMUX-filter, Semrock) wurde das Anregungslicht monochromatisiert und die Strahlengänge übereinander gelegt. In diesem Strahlengang wurde zusätzlich ein Neutraldichtefilter (ND Filter 100 mm D. 0.04-4.0 oD, Edmund Optics) positioniert, wodurch die Leistung aller Wellenlängen stufenlos verringert werden konnte. Wichtig war, dass der 405 nm Laser zusätzlich mit einem OD2-Neutraldichtefilter (Reflektierender ND Filter, Edmund Optics) zusätzlich auf 1 % Transmission abgeschwächt wurde.

Anhand zweier Sammellinsen wurde der Strahlengang des Anregungslichts zum einen aufgeweitet, zum anderen auf die hintere Brennebene des Ölimmersionsobjektivs (APON 60xOTIRF objektiv, Olympus (Immersionöl, 518 F, Zeiss AG)) über die wechselbaren dichroitischen Spiegel des Mikroskops (1. ZT405/514/635rpc, Chroma; 2. FF403/497/574-Di01 BrightLine, Semrock) und den passenden Emissionsfilter (1. R442/514/647; 2. 433/517/613, BrightLine, Semrock) fokussiert.

Das Objektiv und der Probenstisch wurden mit einem „nose-piece“ (IX2-NPS, Olympus) vom Gestell des Mikroskops entkoppelt, wodurch langsames Abwandern der Fokalebene (Drift) sowie Vibrationen minimiert wurden. Für die extrem lang dauernden PALM-Stöchiometriemessungen ist dieses Bauteil unverzichtbar. Eine Feldblende (SP60, Owis) ermöglichte die Anpassung der Belichtungsfläche, die Montage der beiden Sammellinsen auf einer TIRF-Schiene das schnelle Wechseln zwischen verschiedener Belichtungsmöglichkeiten (TIRF, HILO und Epi) der Probe.

Das rotverschobene Fluoreszenzlicht konnte den dichroitischen Spiegel passieren und wurde über verschiedene Linsen und den entsprechenden Lang-/Bandpassfilter (mEOS2/560 nm: 607/70; AlexaFluor647 und ATTO655/639 nm: LP 647, Semrock) auf den Chip der EMCCD Kamera (iXon Ultra 897, Andor Technology) fokussiert und von dieser detektiert. Die Bildfolgen wurden mit der Kamerasoftware Andor Solis (Andor) aufgezeichnet. Für die Durchlichtaufnahmen wurde die Probe von einer Weißlichtquelle oberhalb des Mikroskop-Tisches beleuchtet.

PALM Messungen

Die PALM-Messungen der tierischen Zellen wurden in dem Lab-Tek mit acht Kammern bei RT durchgeführt. Zu Beginn wurde sichergestellt, dass kein Drift stattfand. Positiv transfizierte Zellen wurden mit Hilfe des 488 nm Laser (mEOS2) gesucht und in Bildmitte positioniert. Die maximal verwendete Leistungsdichte betrug dabei $1,9 \text{ W/cm}^2$. Diese wurde möglichst gering gewählt um ein frühzeitiges konvertieren des FP-mEOS2 zu minimieren. Daraufhin wurde der Fokus anhand des Fluoreszenzsignals von mEOS2 durch Anregung mit 561 nm auf die basale Plasmamembran der Zelle eingestellt.

Es ist wichtig, dass hier kein Blinken oder Bleichen des FP stattfindet, weshalb die Laserleistung auf 13 W/cm^2 begrenzt wurde und dieser Prozess zügig erfolgt. Die Messung wurde dann gestartet und die Laserleistung des 561 nm Lasers daraufhin auf $1,87 \text{ kW/cm}^2$ eingestellt. So war sichergestellt, dass jedes FP-mEOS2 detektiert werden kann. Die Belichtungszeit betrug 100 ms/Einzelbild, die Frameanzahl wurde auf unendlich gestellt, das Signal wurde mit einem gain von 200 verstärkt und der Bildausschnitt der Kamera wurde auf 256×256 Pixel begrenzt. Nach augenscheinlichem Ermessen wurde dann die Anregung mit 405 nm in 4 Stufen von 2, 6, 10 W/cm^2 bis max. 14 W/cm^2 hinzugefügt. Es wurde darauf geachtet, dass sich nicht zu viele Fluorophore zur gleichen Zeit im An-Zustand befinden um Lokalisationsartefakte auszuschliessen [112].

Sofern nach einer Zeit (32 000-200 000 Frames) kein Fluoreszenzsignal über einem Schwellenwert von 1021 mehr detektierbar war, wurde die Messung beendet. Die verwendeten Leistungsdichten des Anregungslichts wurden zu Beginn des Projekts durch die Analyse des Oligomerisierungsgrades von CD86 und CTLA erörtert (s. Kapitel 3.9.1 „Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisations-mikroskopischen Messungen“ und 4.4 „Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von SLAC/SLAH“)

dSTORM Messungen

Die dSTORM-Messungen wurden üblicherweise wie in [45] beschrieben durchgeführt. Dabei wurde ein Messpuffer mit 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA-HCl, Applichem) in PBS, je nach Fluorophor mit 10 M KOH auf pH 7,4-7,8 eingestellt und auf die Probe gegeben. Die Leistungsdichte des Anregungslichts wurde dabei zwischen 1-10 kW/cm² eingestellt. Die Belichtungszeit betrug 10-50 ms bei einem Gain von 100. Diese Parameter waren insbesondere vom verwendeten Fluorophor und der Fluorophorendichte in der Probe abhängig.

Anmerkung: dSTORM Messungen von Proteinen in der *Xenopus-laevis*-oozyten-plasma-membran konnten nicht bewerkstelligt werden, da die Oozytenmembran bei Verwendung notwendiger Leistungsdichten des Anregungslichts für die hochauflösende Lokalisationsmikroskopie zerstört wurde. Die Anwendung von Fixierungs-, Einbettungs- und Entfärbungsprotokollen wie beispielsweise [82] zur Etablierung von lokalisationsmikroskopischen Aufnahmen an Oozyten scheint denkbar.

3.7.2 CLSM Messungen

Um die Verteilung von SLAC/SLAH-mEOS2-Konstrukten in den COS7-Zellen zu erörtern, wurden CLSM Aufnahmen durchgeführt. Dazu diente ein kommerziell erhältliches Zeiss LSM 700 (Zeiss AG). Das unkonvertierte mEOS2 wurde dabei mit einer 488 nm Laser-diode angeregt und ein SP640 Filter verwendet. Die Messungen wurden mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Die COS7 Zellen waren dabei fixiert (s. 3.6) in einem LabTek bei RT in PBS.

Ebenfalls wurden CLSM Aufnahmen von Pflanzenproben an einem kommerziell erhältlichen Leica TCS SP5 (Leica) durchgeführt. Das Mikroskop verfügt über die Anregungswellenlängen 405 nm Laser-Diode, ein Ar-Laser mit den Wellenlängen 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm und 514 nm, einen DPSS-Laser 561 nm und zwei HeNe-Laser mit 594 nm und 633 nm. Die *At* Setzlinge wurden teilweise direkt auf der Platte gemessen. Dafür wurde ein Tropfen MS-Medium oder Leitungswasser auf den Wurzelbereich gegeben und mit einem HCX IRAPO L 25,0x0,95 WATER Wassertauchobjektiv gemessen. Die weiteren Messungen wurden mit einem HCX PL APO CS 63,0x1,40 OIL UV Ölimmersionsobjektiv beziehungsweise HCX PL APO 63,0x1,20 WATER UV Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt. Die Pflanzenprobe wurde dafür in den verschiedenen Präparationsansätzen (lebende stabile Mutante, fixiert, gefärbt, geliert, expandiert, etc., (s. Übersicht: Abb. 3.1)) gegebenenfalls zugeschnitten, auf einen Objektträger in entsprechend physiologisches Medium (ddH₂O, H₂O, Leitungswasser, PBS, MTSB, MS-Medium) gelegt, ein Deckglas darüber platziert und gemessen. Insbesondere bei den CLSM-Aufnahmen von *Nb* ist dabei auf die Vermeidung von Luftblasen im Bereich der Pflanzenprobe zu achten.

3.7.3 FRET-FLIM Messungen

Die FRET-FLIM Messungen wurden basierend auf [24] durchgeführt. Das oben genannte Leica TCS SP5 war zusätzlich mit einem gepulsten Ti:sapphire Multiphotonen-Laser (Mai Tai, 2,5 W, 680-1300 nm, Spectra Physics) und mit einem LSM FLIM/FCS modul (PicoQuant) ausgestattet, wodurch FRET/FLIM Messungen an diesem Mikroskop möglich waren. Es wurde ein HCX PL APO CS 40,0x1,10 WATER UV Wasser-immersionsobjektiv (Leica) verwendet, um die *Nb*-Blätter, welche transient mit den mOrange- und tSapphire-Konstrukten transformierten wurden zu analysieren. Ein Blattstück ($\sim 1 \text{ cm}^2$) wurde dafür herausgeschnitten, auf einem Objektträger platziert und mit Leitungswasser und Deckglas bedeckt. Es wurden die Epidermiszellen der Blätter untersucht, wobei zuerst die Expression der Fusionsproteine anhand der tSapphire- (Anregung: 405 nm Laser-diode, Detektion 490–535 nm) und mOrange-Fluoreszenz (Anregung: 561 nm DPSSL; Detektion: 560-620 nm) geprüft wurde. Zusätzlich wurde bei diesen Kontrollaufnahmen noch die Chlorophyll-autofluoreszenz bei 630–750 nm aufgezeichnet. Für die FRET-FLIM-Messungen wurde lediglich tSapphire mit Hilfe des Multiphotonenlasers bei 800 nm angeregt, mit dem TCSPC-System PicoHarp 300 (PicoQuant) und der Software SymPho Time (PicoQuant) die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung aufgezeichnet. Es wurde darauf geachtet, dass die Detektionsrate von 1000 kCounts/s nicht überschritten wurde.

3.7.4 SIM Messungen

Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) wurde an einem kommerziell erhältlichen ELYRA S.1 (Zeiss AG) durchgeführt. Das Mikroskop verfügt über die Anregungswellenlängen einer 405 nm Laser-diode (50 mW), einem 488 nm OPSL (100 mW) und 561 nm OPSL (100 mW) sowie einer 642 nm Laser-diode (150 mW). Für alle Messungen wurde ein Plan-Apochromat 63x/1,40 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss AG) verwendet. Die strukturierte Beleuchtung des SIM-Mikroskops wurde bei allen Messungen mit fünf Rotationsschritten angewendet. Die Aufnahmen wurde mit Hilfe der Software ZEN black edition (Zeiss AG) aufgezeichnet sowie die Rohdaten prozessiert.

3.8 Patch-Clamp Experimente

Die Patch-Clamp Experimente wurden von Priv.-Doz. Dr. Ulrich Terpitz durchgeführt, die Zellkulturpräparation vom Autor. COS-7 Zellen wurden mit SLAH3::mEOS2 transfiziert (s. 3.6) und für 18-24 h in 24 well Schalen mit darin liegenden poly-D-lysine-beschichteten, runden Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) im Brutschrank inkubiert. Die Proteinexpression der einzelnen Zellen wurde anhand der Fluoreszenz des unkonvertierten mEOS2 verifiziert, dafür wurde mEOS2 mit einem 473 nm Laser angeregt. Die Patch-clamp Experimente wurden an einem Patch-Clamp-Aufbau und den Parametern, welche in [113] beschrieben sind durchgeführt. Kurzgesagt wurden Spannungsschritte von +60 mV bis -160 mV in "Ganzzellen- Konfiguration" (*whole-cell configuration*) appliziert, und die resultierenden Ströme wurden mit einer Rate von 100 kHz nach Filterung mit 5 kHz aufgezeichnet. Für die Abdichtung der Patchpipette („*sealing*“) wurde eine Außenpuffer mit 140 mM NaCl, 10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic Acid, HEPES, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ bei einem pH von 7,4 verwendet. Wohingegen für die Patch-Clamp- Messungen entweder ein nitratfreier Puffer (140 mM Natriumgluconat, 2 mM Magnesiumgluconat, 2 mM Calciumgluconat, 10 mM MES, pH 5,6) oder ein nitrathaltiger Puffer (5 mM Natriumnitrat, 135 mM Natriumgluconat, 10 mM MES, pH 5,6, 2 mM Magnesiumgluconat, 2 mM Calciumgluconate) verwendet wurde. Die Lösung der sauren Pipette (10 mM Kaliumnitrat, 120 mM Kaliumgluconat, 3 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA und 10 mM MES, pH 5,6) gewährleistete die Aktivität des SLAH3 bei Abwesenheit aktivierender Sekundärproteine. Die Daten wurden mit ClampFit 10.7 Software, Excel und Origin Pro 2016 64Bit analysiert.

3.9 Datenauswertung

Die Datenauswertung der verschiedenen fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurde mit Hilfe unterschiedlicher Programme durchgeführt.

3.9.1 Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisationsmikroskopischen Messungen

Um anhand lokalisationsmikroskopischer Daten den Oligomerisierungsgrad bestimmen zu können, waren mehrere Auswertungsschritte notwendig. Die Auswertung wurde dabei grundlegend wie in [28, 37, 114] beschrieben durchgeführt. Nachdem die PALM-Aufnahmen durchgeführt wurden (s. Kapitel 3.7.1 „Hochauflösende Lokalisationsmikroskopie“), musste das PALM-Bild rekonstruiert werden. Danach wurden die gefundenen Emissionen verfolgt, die Lokalisationen konvertiert, passende Proteincluster ausgewählt und die Anzahl der Lokalisationen innerhalb dieser Cluster bestimmt. Diese Daten wurden histogrammiert, angepasst und zuletzt der Oligomerisierungsgrad des Proteins bestimmt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in den theoretischen Grundlagen genau erläutert (s. Kapitel 1 „PALM-Messungen zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen“), in Abb. 3.3 aufgeführt und werden im Weiteren ausführlich beschrieben.

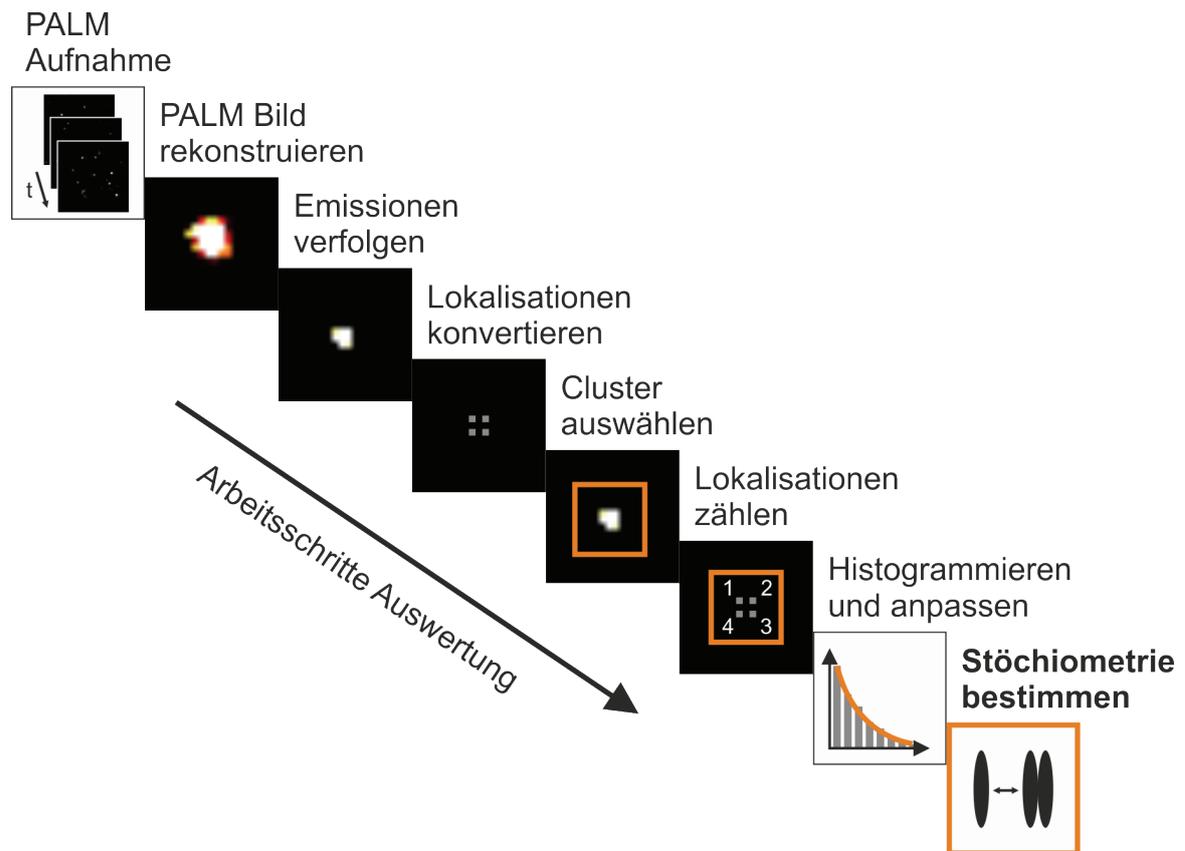


Abb. 3.3: Übersicht der Arbeitsschritte zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen anhand von PALM Daten.

Rekonstruktion lokalisationsmikroskopischer Daten

Um ein hochaufgelöstes Bild (PALM/*d*STORM) aus den Einzelbildern der Aufnahmen zu rekonstruieren, wurde die Software *rapidSTORM* (Steve Wolter, www.github.com/stevewolter/rapidstorm) genutzt. Hierfür wurde die Software im Experten-Benutzer-Niveau und die Funktion „Lokalisationen“ verwendet. Dabei wurden die automatischen Standardeinstellungen (Ausgabebaum: *dSTORM engine output (Count localizations; Display progress; Cache localizations (Expression filter (Image display; Localization file)))*) und Ausgabeoptionen übernommen sowie bestimmte Parameter wie in Tab. 4 beschrieben eingestellt, um die *.tif* Bilderfolgen einzuladen und auszuwerten. Es wurde dadurch eine bildliche Darstellung der PALM-Aufnahme generiert sowie ein Textdokument mit den Koordinaten der Lokalisationen erstellt. Die *d*STORM Daten wurden nicht zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades verwendet.

Tab. 4: *rapidSTORM*-Parameter-Einstellungen für die Rekonstruktion von lokalisationsmikroskopischer Aufnahmen. Hier sind lediglich die Parameter aufgeführt, welche im Zuge der Datenanalyse/Bildrekonstruktion verändert wurden. Alle weiteren Parameter wurden aus den Standardeinstellungen übernommen.

Parameter	PALM	<i>dSTORM</i>
Input options		
Join inputs on	In time	In time
Size of one input pixel	Mikroskopspezifisch: 128 nm/px	Mikroskopspezifisch: 128 nm/px
PSF FWHM	Fluorophorspezifisch: mEOS2: 320 nm YFP: 285 nm	Fluorophorspezifisch: Alexa647: 360 nm
Fit judging method	Fixed global threshold	Fixed global threshold
Intensity threshold	1021 ADC	4500-6000 ADC
Compute two kernel improvement	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Maximum two kernel improvement		0,1
Expression filter		
Maximum localization strength	1	0,1
Image display		
Save output image with key	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Save output image with scale bar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Display image with scale bar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Resolution in X/Y	10 nm	10 nm
Intensity cutoff	Bildspezifisch, sodass die scale bar von 0-10 k reicht	0,1-1

Emissionen verfolgen

Um spezifisch die mEOS2-Fluoreszenz von der Hintergrundfluoreszenz zu trennen und Mehrfachlokalisationen durch ein einzelnes mEOS2, welches lange im An-Zustand verweilt auszuschließen, wurden die Emissionen verfolgt (s. Abb. 4.29). Hierfür wurde das Koordinaten-Textdokument der vorher generierten Lokalisationsdaten (s. o.) verwendet und mit Hilfe des Programms *rapidSTORM* und der Funktion „*Replay*“ die Lokalisationsdaten vom vorherigen Schritt dahingehend modifiziert. Dabei wurde ein Ausgabebaum mit: *dSTORM engine output (Expression filter (Track emissions (Trace filter (Image display; Localization file))))* generiert und die Parameter wie in Tab. 5 beschrieben eingestellt. Auch hier wurde dadurch eine bildliche Darstellung als auch eine Koordinatenliste auf Textbasis errechnet. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass lediglich die Emissionen in das Bild aufgenommen wurden, welche mindestens auf drei aufeinanderfolgenden Einzelbildern (3 fr) in einem Bereich von 30x30 nm lokalisiert werden konnten. Die Laserleistungen für die PALM-Messungen (s. 3.7.1) wurden explizit deshalb so gewählt, dass der An-Zustand eines mEOS2 ≥ 300 ms (≥ 3 fr) betrug, um diesen essentiellen Auswertungsschritt zu ermöglichen.

Tab. 5: rapidSTORM-Parameter-Einstellungen für die Verfolgung von Emissionen aus den bereits rekonstruierten Lokalisationsdaten.

Parameter	Einstellung
Expression filter	
Number of expressions	2
Value to assign to (1)	sigmaposx
Expression to assign from (1)	30 nm
Value to assign to (2)	sigmaposy
Expression to assign from (2)	30 nm
Track emissions	
Distance threshold	3
Allowed blinking interval	0
Diffusion constant	0
Bobility constant	0
Trace filter	
Minimum number of emissions per trace	3
Delete trace information	<input type="checkbox"/>
Select trace by number	<input type="checkbox"/>
Image display	Standardeinstellungen übernehmen außer:
Save image to	Dateiname ändern
Save output image with key	<input type="checkbox"/>
Save output image with scale bar	<input type="checkbox"/>
Intensity cutoff	Bildspezifisch, sodass die scale bar von 0-10 k reicht
Localization file	
Write localizations to	Dateiname ändern

Lokalisierungen konvertieren

Um später die Anzahl der Lokalisierungen in einzelnen Signalansammlungen (Cluster) bestimmen zu können, wurde ein weiteres Bild mit Hilfe der Software *Lama* (*LoCaLization Microscopy Analyzer*, Sebastian Malkusch, www.github.com/SMLMS/Lama) generiert. In diesem Bild wurde die Anzahl der Lokalisierungen aus der Textdatei, bei welcher die Emissionen verfolgt wurden, in eine bildliche Darstellung konvertiert. Die Anzahl der Lokalisierungen pro Pixel wurde dabei mittels Grauwerten dargestellt und somit für Bildbearbeitungsprogramme auswertbar gemacht.

Für die Berechnung der Bilder wurde die Region von Interesse (ROI) mit dem Programm automatisch detektiert, jedoch darauf geachtet, dass der gesamte Bildbereich ausgewählt wurde und alle Einzelbilder berechnet wurden. Im Setup Bereich wurde der „*grayscale conversion factor into photons*“ auf 3 gestellt, die Pixelgröße auf 128 nm und die Belichtungszeit auf 0,1 s eingestellt (was den Einstellungen des Mikroskopaufbaus und den Messeinstellungen entsprechen muss). Die Visualisierungseinstellungen wurden auf eine Pixelgröße von 10 nm eingestellt, das Maximum manuell auf 255 festgesetzt und das Bild schließlich berechnet. Alle weiteren Einstellungen wurden nicht verändert.

Proteincluster auswählen und Bestimmung der Lokalisierungen pro Cluster

Die Auswahl der einzelnen Cluster wurde mit *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institute of Health) bewerkstelligt. Dafür wurden die 3 Einzelbilder (Bild aus rekonstruierter PALM Aufnahme, Emissionen verfolgen und Lokalisierungen konvertieren) in einem Bildstapel übereinandergelegt und dann miteinander verglichen. Mit der Tastenfunktion „t“ kann in imageJ eine Liste der ausgewählten Bereiche erstellt werden („*ROI Manager*“). Letztlich wurde im Bild der konvertierten Lokalisierungen die integrierte Dichte („*integrated density*“) mit der Funktion „*Measure*“ gemessen, was der Anzahl der Lokalisierungen in diesem Auswahlbereich entspricht, und man somit eine Liste der Lokalisierungen pro Cluster erhält. In Abb. 4.31 sind die Einzelschritte dargestellt. Folgende Auswahlkriterien wurden geprüft, um die Cluster auszuwählen (s. Tab. 6):

Tab. 6: Kriterien für die Auswahl der Cluster.

Auswahlkriterium	Erläuterung
Primäres Auswahlkriterium:	Darauf basierend wurden die weiteren Kriterien angewandt.
Korrelation zwischen dem PALM Bild und dem Bild der verfolgten Emissionen	Hier wurde die Positions- und Formtreue zwischen den Bildern geprüft.
Sekundäre Auswahlkriterien:	Das Auswahlkriterium musste für beide Bilder (PALM-, Em. verf.-Bild) anwendbar sein.
Abstand	Der Abstand zwischen den einzelnen Clustern musste mindestens 90 nm zueinander betragen. Mit der Ausnahme, dass sich Hintergrundsignal im PALM-Bild (welcher durch das Verfolgen der Emissionen herausgerechnet wurde) innerhalb dieses Bereichs befinden durfte.
Form und Umfang	Die äußere Form des Clusters musste geschlossen sein, also maßgeblich konvex gekrümmt. Außerdem sollte das Verhältnis zwischen Umfang und Fläche des Clusters möglichst klein sein.
Helligkeit	Das Cluster musste mindestens ein Pixel beinhalten, bei welchem der Helligkeitswert mindestens 10 k (weiß dargestellt) betrug.
Größe	Die Größe des Clusters durfte maximal 8x8 px betragen.
Zentrum	Das Cluster durfte lediglich ein einziges Helligkeitszentrum aufweisen.
Tertiäres Auswahlkriterium	Das Auswahlkriterium wurde nur am Bild der konvertierten Lokalisationen angewandt.
Bereich	Hier wurde geprüft ob alle Lokalisationen im Bereich des Clusters auf dem Bild der konvertierten Lokalisationen ausgewählt wurden.

Histogrammieren und anpassungsspezifische Auswertung

Zuletzt wurde die Liste der Lokalisationen pro Cluster ausgewertet. Dafür wurde das Programm *OriginPro* (2016G, OriginLab Corporation) verwendet. Die Werte der Lokalisationen pro Cluster wurden dabei von allen Messungen der verschiedenen Konstrukte histogrammiert. Um die Daten mit den folgenden Funktionen anpassen zu können, wurde der prozentuale Anteil berechnet. Außerdem wurde den „Lokalisationen pro Cluster“ der Wert für das Wiederkehren eines Fluorophors (blinken) zugeordnet, was dem Wert: „(Lokalisation pro Cluster) – 1“ entspricht. Einem Cluster mit einer einzigen Lokalisation wurde entsprechend der Wert 0 zugeordnet. Dieser Auswertungsschritt und die Anpassung der histogrammierten Daten mit den entsprechenden Anpassungsfunktionen wurde basierend auf [28] durchgeführt.

Anpassungsfunktionen für bekannte Stöchiometrien

Wie bereits in den theoretischen Grundlagen beschrieben, ist es notwendig, zuerst die Stöchiometrien eines bekannten Monomers (CD86) sowie eines Dimers (CTLA4) zu bestimmen, um die Variablen der Fitfunktionen festzusetzen.

Formel 1: Anpassungsfunktion Monomer (Anpassungsfunktion geometrische Verteilung):

$$y = p(1 - p)^x$$

aus der Anpassung von CD86 erhielt man daraus für

$$p = 0,29119$$

Formel 2: Anpassungsfunktion Dimer (negative Binomialfunktion):

$$y = p((1 - p)^{(x-1)}) \cdot (p(1 - q)x + q(1 - p))$$

Wenn $p = 0,29119$ (Monomer (CD86)) festgesetzt ist, erhielt man aus der Anpassung von CTLA4 für

$$q = 0,2647$$

Gewichtete Anpassungsfunktionen für unbekannte Proteinstöchiometrien

Sofern die Stöchiometrie eines Proteins nicht bekannt war, wurden gewichtete Anpassungsfunktionen (negative Binomialfunktionen) verwendet, mit welchen unterschiedliche stöchiometrische Wertigkeiten zu variablen Anteilen eines Proteins angepasst werden konnten. Außerdem wurden die Anpassungsfunktionen so gewählt, dass die Funktion über ausreichendes Potential zur Anpassung des höchsten oligomeren Zustandes dieses Proteins verfügte. Die Variablen p und q wurden aus der Analyse der Stöchiometrien von CD86 und CTLA4 auf $p=0,29119$ und $q=0,2647$ festgesetzt.

Formel 3: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer:

$$y = A(\text{Monomer}) + (1 - A)(\text{Dimer})$$

$$= A(p(1 - p)^x) + (1 - A)(p((1 - p)^{(x-1)})(p(1 - q)x + q(1 - p)))$$

Formel 4: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer-Trimer:

$$y = A(\text{Monomer}) + B(\text{Dimer}) + (1 - A - B)(\text{Trimer})$$

$$= A(p(1 - p)^x) + B(p((1 - p)^{(x-1)})(p(1 - q)x + q(1 - p))) + (1 - A - B) (1/2 p(1 - p)^{(x-2)} (p^2(x - 1)x + q^2(p(x + 1)(p(x + 2) - 4) + 2) - 2pqx(px + p - 2)))$$

Formel 5: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer-Trimer-Tetramer:

$$y = A(\text{Monomer}) + B(\text{Dimer}) + C(\text{Trimer}) + (1 - A - B - C)(\text{Tetramer})$$

$$= A(p(1 - p)^x) + B(p((1 - p)^{(x-1)})(p(1 - q)x + q(1 - p))) + C (1/2 p(1 - p)^{(x-2)} (p^2(x - 1)x + q^2(p(x + 1)(p(x + 2) - 4) + 2) - 2pqx(px + p - 2))) + (1 - A - B - C)(-1/6 p(1 - p)^{(x-3)} (p^3(-(x - 2))(x - 1)x + 3p^2q(x - 1)x(px + p - 3) + q^3(p(x + 1)(p(x + 2)(p(x + 3) - 9) + 18) - 6) - 3pq^2x(p(x + 1)(p(x + 2) - 6) + 6)))$$

Der durch die Anpassung berechnete Wert A entsprach dabei dem prozentualen Anteil Monomer der angepassten Daten. Je nachdem wie viele oligomerische Zustände angepasst werden sollten, wurden weitere Gewichtungen (die Variablen B und C) für die einzelnen Anpassungsfunktionen eingesetzt. Somit konnte auch für die weiteren oligomerischen Zustände der jeweilig prozentuale Anteil errechnet werden. Der Anteil des höchsten oligomerischen Zustands wurde aus dem Rest berechnet (beispielsweise Anteil Tetramer = $1 - A - B - C$). Somit erhielt man differenziert den Oligomerisierungsgrad eines Proteins aus den Messdaten der PALM-Aufnahmen.

3.9.2 Datenauswertung von CLSM und SIM Messungen

Die Auswertung der CLSM und SIM Messungen erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Firmensoftware der verschiedenen Setups. Die Messungen der CLSM-Aufnahmen des Leica TCS SP5 wurden mit *LAS-X Life Science* (Leica) und die Aufnahmen des Zeiss LSM 700 sowie Zeiss SIM Elyra S.1 mit *ZEN black edition* (Zeiss AG) ausgewertet, angepasst und bearbeitet.

3.9.3 Datenauswertung von FRET-FLIM Messungen

Die aufgezeichneten Daten der FRET-FLIM Messungen wurden mit Hilfe der Software *SymPho Time* (PicoQuant) wie in [24] beschrieben ausgewertet. Dabei wurde innerhalb der aufgenommenen FLIM-Bilder die Fluoreszenzlebensdauer Pixel für Pixel mit einer zweifach-exponentiellen Anpassungsfunktion angenähert. Dafür wurden zuerst die Bildbereiche ausgewählt, welche im Fluoreszenzbild auch das entsprechende Fluoreszenzsignal von tSapphire und mOrange zeigten und Bildbereiche verworfen, welche Chlorophyll- oder Zellwandfluoreszenz zeigten. Die Bildbereiche konnten sehr gut voneinander getrennt werden, da sich die Fluoreszenzlebensdauern (τ) dieser beiden Hintergrundsignale signifikant vom gesuchten tSapphire-Signal unterschieden (gemessene Werte/bekannte Werte: $\tau_{\text{Chlorophyll}}$: $\sim 0,5 \text{ ns}/0,25\text{-}1,5 \text{ ns}$ [115]; $\tau_{\text{Zellwand/Lignin}}$: $\sim 1,8 \text{ ns}/0,5 \text{ ns}$ [116]; $\tau_{\text{tSapphire}}$: $\sim 2,6 \text{ ns}/2,9 \text{ ns}$ [25]). Letztendlich wurde anhand dieser Daten ein Fluoreszenzlebensdauer-histogramm erstellt und ein Mittelwert für die gemessene Lebensdauer errechnet [25].

3.9.4 Bildbearbeitung und Bildanalyse

Zur Bearbeitung der erstellten Bilder sowie zur Analyse einzelner Bildbereiche wurden die Bildbearbeitungsprogramme *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institute of Health), *Corel Draw* (Corel Corporation) und *Imaris* (Bitplane) verwendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die bildliche Darstellung von Strukturen in biologischen Geweben mittels lichtmikroskopischer Messtechniken beinhaltet Informationen über Wirkungsorte und Funktionsweise von Proteinen. Dabei bieten verschiedene fluoreszenzmikroskopische Messmethoden unterschiedliche Möglichkeiten und Vorteile. In den folgenden Kapiteln wurden verschiedene Methoden an unterschiedlichen Pflanzenstrukturen etabliert und unterschiedliche Proteine untersucht. Dabei wurde der spezifische Wirkungsort von SLAH2 und SLAH4 untersucht (s. Kapitel 4.1), FRET-FLIM-Interaktionsstudien von SLAH3 und SLAH4 durchgeführt (s. Kapitel 0) und hochauflösende Mikroskopietechniken (SIM, *d*STORM und ExM) an unterschiedlichen Pflanzenproben angewendet (s. Kapitel 4.2). Insbesondere konnte anhand von lokalisationsmikroskopischen Studien (PALM) in COS7-Zellen der stöchiometrische Grundzustand und die stöchiometrische Flexibilität der SLAC/SLAH-Proteine untersucht werden (s. Kapitel 4.4). Die elektrophysiologische Funktionalitätsprüfung von SLAC/SLAH-mEOS2 Konstrukten mittels Patch-Clamp Versuchen und strukturelle Verteilungsanalysen von pflanzlichen Membranproteinen in Säugerzellen anhand von *d*STORM Aufnahmen mit Tag-Konstrukten waren dabei vorangegangene Kontrollversuche.

Zum besseren Verständnis sei hier erwähnt, dass in den folgenden Unterkapiteln meist eine kurze Hinführung zum Thema formuliert ist, dann werden die Ergebnisse aufgeführt und darauffolgend werden diese Ergebnisse auch direkt diskutiert. **Ergebnisse und Diskussion sind dabei in den Unterkapiteln (meist) durch eine leere Zeile getrennt.**

4.1 Lokalisation von SLAH2 und SLAH4 in funktionellen Unter-einheiten des Pflanzengewebes

Anhand von Durchlichtaufnahmen und Standardfärbungen der Pflanzenwurzel (CFW und PI) wurden zunächst Gewebe, Zellen oder die Zellwand räumlich dargestellt, um für die spätere Lokalisation Fluoreszenz-markierter Proteine (SLAH2, SLAH4) einzelnen Geweben oder Zellen zuordnen zu können.

Identifikation von Referenzstrukturen mittels Standardfärbungen

Die Zellwände, insbesondere die darin enthaltene Cellulose einer Pflanze, können mit CFW gefärbt werden, wodurch eine der wichtigsten Referenzstrukturen im Pflanzengewebe mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt werden kann [117]. Sofern das Pflanzengewebe fixiert und permeabilisiert ist, kann die gesamte Wurzelstruktur gefärbt werden. Wird das lebende Pflanzengewebe in wässriger CFW-Lösung gefärbt, wird die Pflanzenwurzel nur bis zu den Endodermiszellen (grenzen die Stele apoplastisch ab) gefärbt. In Abb. 4.1 A) wurde eine lebende *At*-Wurzelspitze mit CFW gefärbt und ein Z-Stack aufgenommen. Durch die Färbung der Zellwände ist die Oberflächenstruktur der Wurzelspitze sichtbar und die einzelnen Zellen sind gut voneinander trennbar. Eine weitere Standardfärbung ist mit PI. PI wirkt dabei in fixierten und permeabilisierten Pflanzenproben als Nukleinsäureinterkalator, wodurch die Lage des Zellkerns dargestellt werden kann [118]. Neben den gefärbten Zellen oder Zellbestandteilen können Durchlichtaufnahmen für eine Übersicht der gesamten Pflanzenprobe herangezogen werden.

In Abb. 4.1 B) ist ein Z-Stack einer fixierten, permeabilisierten und PI-gefärbten Wurzelspitze zu sehen. Viele einzelne, runde Zellkerne sind zu erkennen. Einige Zellen befinden sich augenscheinlich in einer der Teilungsphasen, weshalb sich die DNA außerhalb des Zellkerns aber weiterhin innerhalb der Einzelzelle befindet [22]. Die Durchlichtaufnahme im Kombinationsbild Abb. 4.1 C) (PI und Durchlichtaufnahme) bringt dabei die Zellkerne lediglich in den Kontext des Wurzelgewebes und demonstriert, dass die Wurzelspitze intakt ist. Einzelzellen sind dabei aufgrund der Komplexität der Struktur und der geringen Kontrasttiefe nur schwer auszumachen.

In Abb. 4.1 D) - F) wurde eine Aufnahme der Wurzel im Bereich der Reifungszone gemacht. Für diesen Bereich ist eine große Anzahl von Wurzelhaaren charakteristisch [22]. Die Wurzel wurde vorher fixiert und permeabilisiert, wodurch eine komplette Färbung mit CFW und die Färbung des Chromatins mit PI gewährleistet war. Die CFW-Färbung zeigt die gesamte Zellwandstruktur des Wurzelausschnitts. Besonders die leiterartige Struktur des Xylems, die beidseitig am Rande der Stele verläuft, ist auffällig. In der PI-Aufnahme Abb. 4.1 E) ist das Chromatin in den Zellkernen und Bereiche mit Heterochromatin erkennbar [119]. Auch hier ist die Leiterstruktur des

Xylems sichtbar, was jedoch als Autofluoreszenz der Xylemstruktur angenommen werden kann. Im Kombinationsbild ist erkennbar, dass die Zellkerne, welche eine stark ausgeprägte Ovalform zeigen sich immer nahe an einer Zellwand zeigen, wohingegen die rundlicheren Zellkerne zwischen zwei Zellwänden zu liegen scheinen.

Der schematische Aufbau einer Pflanzenwurzel ist anhand von Durchlichtaufnahmen und konfokalen Aufnahmen der Färbungen mit CFW/PI rekonstruierbar und können somit für weitere Referenzaufnahmen gut herangezogen werden.

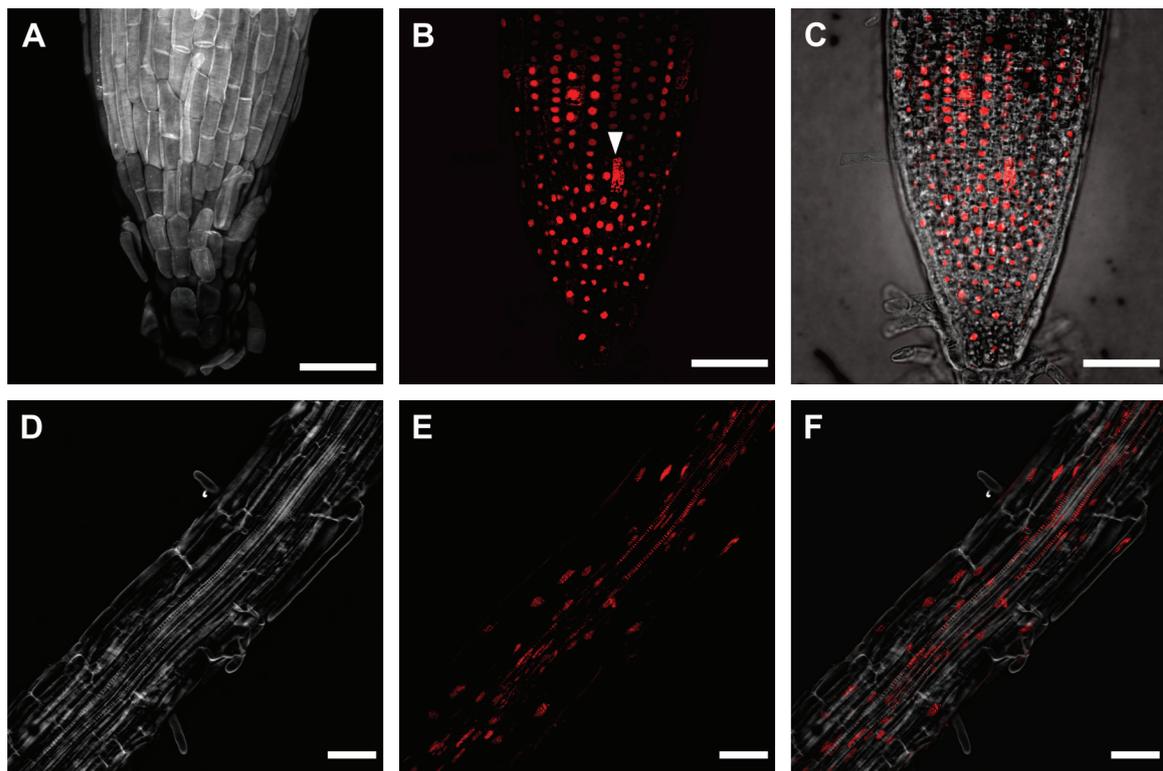


Abb. 4.1: Referenzstrukturen mittels Standardfärbungen. Die Darstellung von Pflanzenproben ist anhand von Standardfärbungen und Durchlichtaufnahmen strukturell nachvollziehbar, da spezifische Gewebe abgebildet werden können. **(A)** Lebende *At*-Wurzelspitze. CFW (weiß) färbt die Zellwände der Wurzelzellen, wodurch die Oberflächenstruktur und die Einzelzellen des Apikalen Wurzelmeristems zu sehen sind. In **(B)** wurde die Wurzelspitze mit PI (rot) gefärbt. PI interkaliert bei fixierten und permeabilisierten Pflanzenproben in die DNA der Zellen, wodurch meist die Zellkerne der Einzelzellen dargestellt werden können. Befindet sich eine Zelle in einer Teilungsphase, ist die DNA außerhalb des Zellkerns lokalisiert (**◄**). **(C)** zeigt die zugehörige (zu B)) Durchlichtaufnahme. Die charakteristische basal-apikale Aneinanderreihung der Einzelzellen im Apikalmeristem ist sichtbar und die Ausbildung von Epidermis, Kortex, Endodermis ist so nachvollziehbar. **(D-F)** zeigt ein *At*-Wurzel im Bereich der Reifungszone, welche insbesondere durch die Ausbildung der Wurzelhaare charakterisiert ist. Die Zellkerne (PI, rot) befinden sich wie erwartet innerhalb der Wurzelzellen (CFW, weiß). Epidermis, Kortex, Endodermis und Stele sind eindeutig voneinander zu unterscheiden. Maßstabsbalken= 50 μm .

Lokalisation von SLAH2 in der *At*-Wurzel

Die Wurzel eines ~10 d alten *At*-Setzlings verfügt über eine radiale und eine apikal-basale Polarität. Im radialen Zentrum der Wurzel liegen die Leitgefäße, die aus jeweils zwei Phloem- und zwei Xylem-Strängen bestehen. Phloem- und Xylemzellen sind dabei in Zellen des Procambium eingebettet und bilden damit das Leitbündel. Das Leitbündel wird von ringförmig angeordneten Zellgruppen umschlossen. Direkt an die Leitbündel angrenzend befinden sich die Perizykel-Zellen, welche die Ursprungszellen für die Seitenwurzelbildung sind. Diese wiederum werden von der Endodermis begrenzt, welche aufgrund des Casparischen Streifens den apoplastischen Nährstoff- und Wasser-Transport (durch die interzellulären Räume) aus dem Boden in das Leitgewebe unterbindet. Die Einlagerung des hydrophoben Biopolymers Suberin in die Endodermiszellwände wird als Casparischer Streifen bezeichnet und bildet eine impermeable Barriere für Wasser und Nährstoffe zwischen den Endodermiszellen, weshalb diese spätestens ab der Endodermis auf symplastischem Weg (durch den Zellkörper) in Richtung des Leitgewebes transportiert werden müssen [120]. Da die unspezifische Diffusion über die Plasmamembran der meisten Moleküle, insbesondere Ionen, nicht möglich ist, kann die Pflanze durch die Expression entsprechender endodermaler Transport- und Kanalproteine die Nährstoffaufnahme (beispielsweise Nitrat) sehr selektiv steuern [121]. Die Endodermis wird von den Kortezzellen umschlossen, welche Schutz und mechanische Stabilität bieten. Letztlich bildet die Wurzelepidermis (Rhizodermis) die Außenhülle der Wurzel [98, 122, 123].

Für die folgenden Versuche wurden zwei verschiedene stabile *At*-Mutanten hergestellt. Zum einen die *At* SLAH2-prom::3xYFP Linie, welche unter dem SLAH2-promotor drei miteinander fusionierte YFP-Moleküle exprimiert. Die YFP-Fusionen sind an kein Protein gebunden und befinden sich somit im Zytosol und dem Zellkern der Pflanzenzelle. Zum anderen wurde die *At*-Mutante SLAH2-prom::SLAH2-gen::YFP generiert, welche die Fusion von SLAH2 mit dem YFP unter der Kontrolle des SLAH2-Promotors exprimiert. Das bedeutet, dass die Markierung durch YFP kovalent an ein SLAH2 gebunden ist und somit in der Plasmamembran lokalisiert werden sollte. Da die Lokalisation von SLAH2 Anionenkanälen in der Arabidopsis Wurzel bisher nur mit GUS-Färbungen vorgenommen wurde [26] sollte in den folgenden Abbildungen Abb. 4.2, Abb. 4.3 und Abb. 4.4 die genaue Lokalisation von SLAH2 mit der Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie genauer untersucht werden.

Es wurden CLSM-Bilderfolgen in der z-Ebene (Z-Stacks) aufgenommen, welche in Abb. 4.2 gezeigt sind. In A) ist ein Einzelbild des Z-Stacks ausgewählt, welches im Längsschnitt auf der Mittelebene der Wurzel aufgenommen wurde. Das YFP-Signal im Zytosol zeigt den Umriss der Wurzelzellen. Dabei sind jeweils zwei aneinanderliegende Zellschichten sichtbar, wobei jeweils eine etwas breiter und eine schmaler erscheint (*). Die Längsschnitt-Betrachtung der Wurzel zeigt die Markierung der Endodermis und des

Perizykel. Das YFP-Signal zeigt in Bereichen innerhalb der jeweiligen Zellumrisse immer wieder ein intensives und flächiges Fluoreszenzsignal, was die Position des Nukleus und somit die freie Beweglichkeit des YFP im Zytosol nachweist. In B) wurden alle Einzelbilder des Z-Stacks montiert und man erhält eine Darstellung des Querschnitts der Wurzel. Das YFP-Signal befindet sich in Endodermis- und Perizykelzellen. Die ringförmige Anordnung der Zellen ist dabei nicht ganz geschlossen, da die Eindringtiefe des Objektivs nicht ausreichend war. Außerdem sind zwei Kortextzellen außerhalb der Endodermis- und Perizykelzellen markiert (◄). Setzt man diese beiden Fluoreszenzbilder in den Kontext einer Durchlichtaufnahme (C)), so sind die mit YFP-markierten Endodermis- und Perizykelzellen (*) von den Kortex- und Epidermiszellen (●) umgeben. In D) ist die Durchlichtaufnahme allein dargestellt.

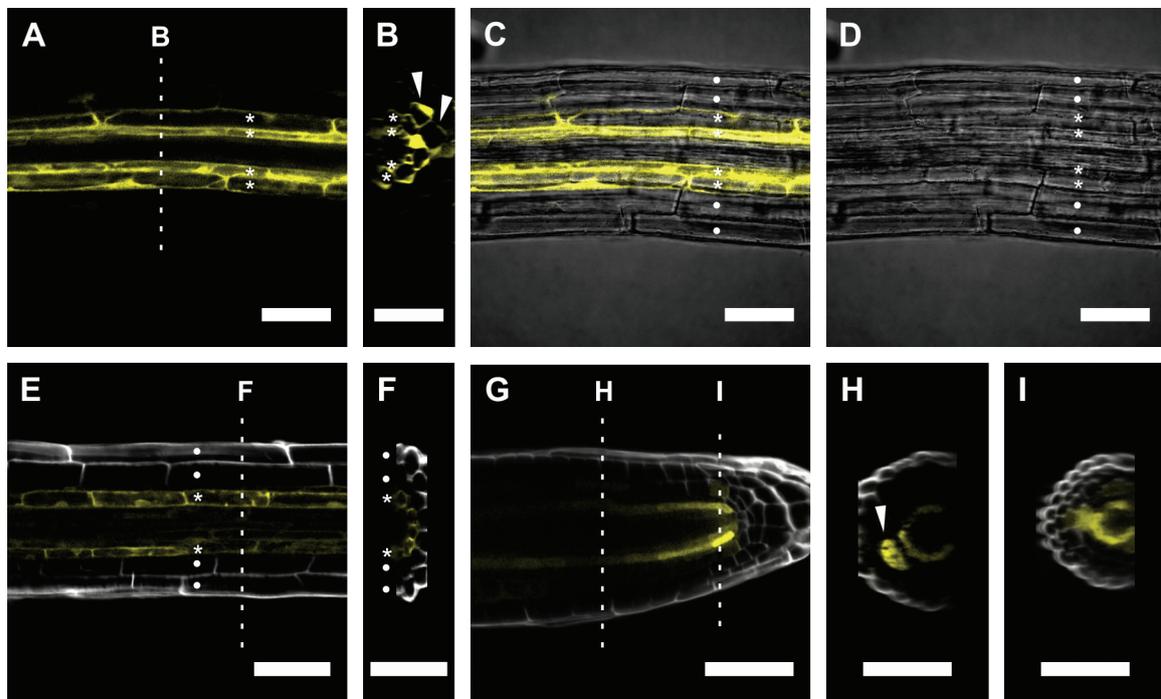


Abb. 4.2: Die SLAH2 Lokalisation in der Pflanzenwurzel anhand der SLAH2-Promotor induzierten YFP Expression. Die hier gezeigten Z-Stacks der At-Mutanten exprimieren drei YFP (gelb) unter dem SLAH2 Promotor, wodurch YFP im Zytosol der betreffenden Wurzelzellen vorliegt. (A) Die Längsschnitt-Darstellung zeigt die Expression von SLAH2 in der Endodermis und im Perizykel (*). (C-D) Der Abgleich mit der Durchlichtaufnahme zeigt die nicht fluoreszierenden, außerhalb liegenden Epidermis- und Kortextzellen (●). (B) Die Querschnittsdarstellung zeigt die ringförmige Anordnung der YFP exprimierenden Zellen. Auch in vereinzelt Kortextzellen ist ab und an YFP-Expression sichtbar (◄). (E-F) Die zusätzliche Färbung mit CFW verdeutlicht die Expression in der Endodermis (*), da im lebenden Wurzelgewebe aufgrund des Casparischen Streifens nur Epidermis- und Kortextzellen (●) mit CFW gefärbt werden. (G-I) In der Wurzelspitze wird YFP in den Kortex-/Perizykel-Initiationszellen neben dem „Ruhenden Zentrum“ exprimiert. (H) Auch hier ist Expression in vereinzelt Kortextzellen (◄) sichtbar. Maßstabsbalken= 50 µm.

In Abb. 4.2 E) ist ein Fusionsbild der YFP-Fluoreszenz (gelb) einer lebenden SLAH2-prom::3xYFP-Mutante, welche zusätzlich mit CFW (weiß) gefärbt wurde gezeigt. Die Färbung mit CFW ist unvollständig und reicht lediglich über zwei Zellschichten (●), von der Epidermis der Wurzel bis hin zu den Cortezellen. Die Zellen, welche durch YFP markiert wurden, zeigen sich in diesem Fall lediglich in den Endodermiszellen. Das Fluoreszenzsignal in den Perizykelzellen (vgl. A)) ist nur schwer oder gar nicht erkennbar. Die Darstellung des Querschnitts in F) bestätigt die Lokalisation des YFP. Veränderungen der Helligkeits- und Kontrasteinstellungen der Abbildung konnten die Expression des YFP in den Perizykelzellen zeigen (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Expression in den Perizykelzellen nur aufgrund des wesentlich geringeren Fluoreszenzsignals hier nicht abgebildet ist.

Betrachtet man die Wurzelspitze (G)) im Längsschnitt, wird die apikal-basale Polarität der Wurzel deutlich. Das YFP-Signal verläuft in den Endodermiszellen zweisträngig vom ruhenden Zentrum der Wurzel aus in Richtung Sproß. Das ruhende Zentrum ist dabei sehr gut durch CFW markiert, der restliche Teil der Wurzelspitze jedoch unvollständig. In den Querschnitten (H) und I)) erkennt man jeweils die ringförmige Anordnung des YFP-Signals und CFW wieder. In H) ist außerdem eine Zellstruktur außerhalb des innerhalb liegenden Ringes erkennbar (◀). Gründe können hier nicht detaillierter erörtert werden. Es ist denkbar, dass dies mit der späteren Formierung von Seitenwurzeln zusammenhängt. In I) ist der Querschnitt nahe des ruhenden Zentrums gezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass bereits in den Endodermis-Initiationszellen YFP exprimiert wird und eine geschlossen ringförmige Anordnung zu sehen ist. Auffällig ist, dass das Expressionslevel in diesen Zellen erhöht ist. Dies lässt sich von der erhöhten Fluoreszenzintensität in diesen Zellen ableiten.

In Abb. 4.3 A) - C) ist das Fluoreszenzsignal von YFP, welches kovalent an SLAH2 gebunden ist, das zugehörige Durchlichtbild und das resultierende Fusionsbild gezeigt. Das relativ schwache YFP-Signal ist weitestgehend als feine Linienstruktur erkennbar (A)). Im Fusionsbild B) ist das Fluoreszenzsignal direkt an der Innenseite der Zellwände lokalisiert und ist in C) als Detail nochmals dargestellt. Der gelbe Pfeil indiziert die Seite der Plasmamembran und des Zelllumens, der schwarze Pfeil, die ebenfalls in schwarz erkennbare Zellwand der entsprechenden Zelle. Die Verteilung des YFP-Signals als feine Linienstruktur (im Gegensatz zu Abb. 4.2) und die unmittelbare Nähe zur Zellwand (schwarze linienförmige Struktur), deutet auf die vermutete Lokalisation in der Plasmamembran hin. Die Wurzelzell-spezifische Lokalisation des YFP bestätigt die SLAH2-Lokalisation in der SLAH2-prom::3xYFP-Mutante. Die Abbildungen D) - G) (in Abb. 4.3) zeigen die radiale und apikal-basale Polarität des YFP-Signals innerhalb der einzelnen Wurzelzellen (◀).

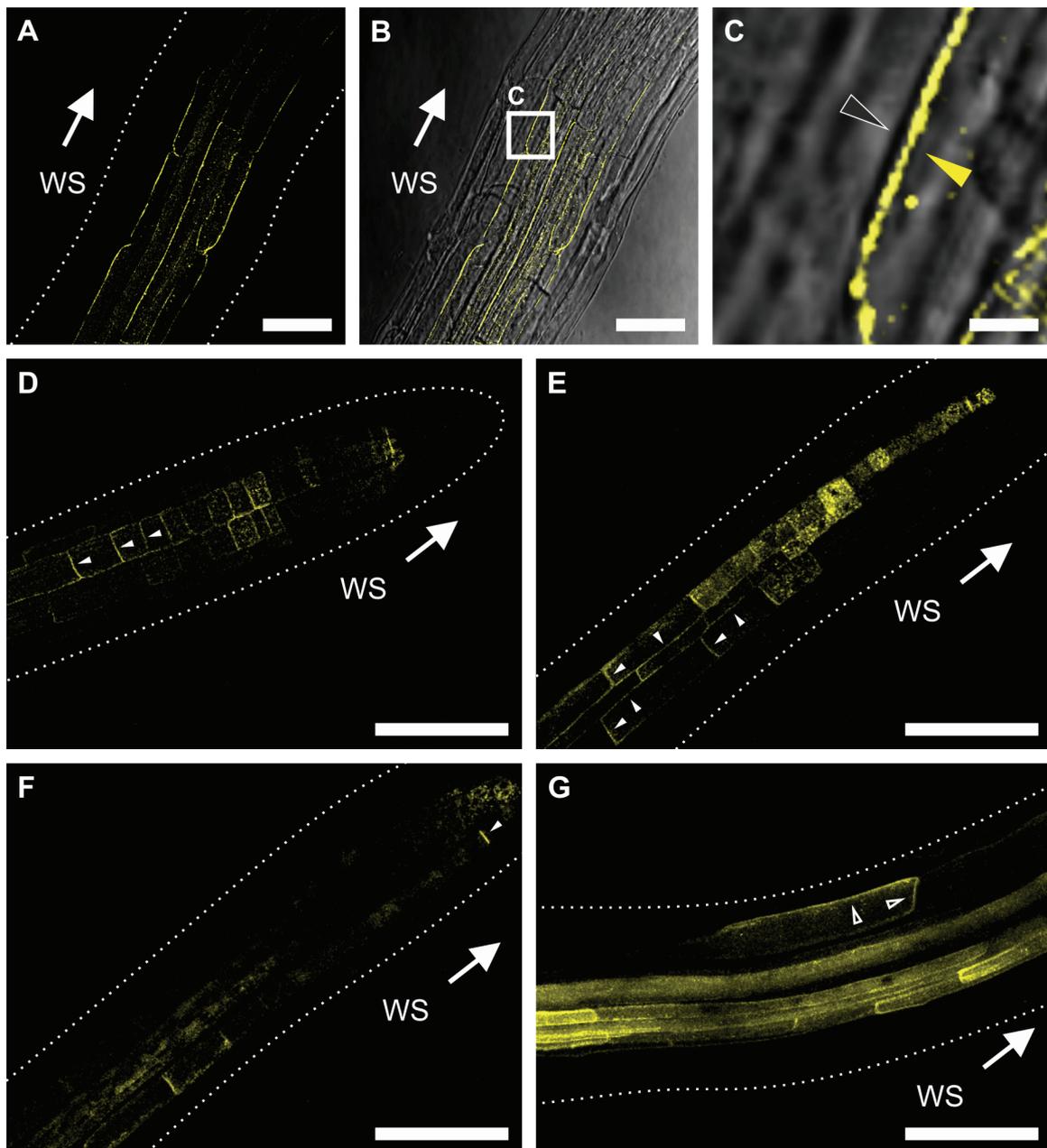


Abb. 4.3: SLAH2 Lokalisation in der Pflanzenwurzel anhand des SLAH2-YFP Fusionskonstrukts. (A) SLAH2-YFP zeigt einen feinen Umriss der Wurzelzellen. (A-G) Die SLAH2-Expression begrenzt sich auf Endodermis-, Perizykel- und vereinzelte Kortezellen, (B) was insbesondere mit Hilfe des Fusionsbildes erkennbar ist. (C) Das Detail zeigt die Nähe von Zellwand (schwarz) und YFP-Signal (gelb) weshalb SLAH2 in der Plasmamembran der Wurzelzellen lokalisiert ist. (D) SLAH2 zeigt in Perizykel- und Endodermiszellen eine apikal orientierte sowie (E) eine zu den Leitgefäßen orientierte Polarität (◄). (F) Die Lokalisation von SLAH2 ist dabei teilweise stark am Zellpol kondensiert (◄). (G) Die Polarität in den Kortezellen ist dagegen invers, heißt basal, und zur Wurzelaußenseite gerichtet (◄). In Endodermis und Perizykel bleibt die Polarität auch in der Elongationszone erhalten. Die Wurzelspitze ist angezeigt (WS →) und die gestrichelten Linien deuten den Umriss der Wurzel aus den Durchlichtbildern an. Maßstabsbalken= 50 μm (alle außer B) / 5 μm (B).

In D) ist die polare Verteilung des YFP-Signals in apikalmeristematischen Endodermis- und Perizykelzellen zu sehen. Ein helleres YFP-Signal befindet sich dabei am apikalen Pol (zum Sproß) der Zellen (◄). Anhand der meist U-förmigen Verteilung des Fluoreszenzsignals ist die polare Verteilung in Richtung des apikalen Pols der Zellen induziert und entsprechend des basalen Pols kontrainduziert (vgl. polare PIN-Verteilung, s. Abb. 4.8). In E) wird zudem eine radiale Polarität sichtbar, bei der das YFP Signal jeweils in Richtung der Nachbarzelle (also beispielsweise Endodermis zu Endodermis oder Perizykel zu Perizykel Nachbarzelle) oder teilweise in Richtung des Wurzelzentrums verstärkt zu sehen ist (◄▼/◄▲). Die apikal-basale Polarität bleibt in E) apikalgerichtet. Das YFP-Signal ist oftmals am Zellpol hochkondensiert (s. F) (◄). In G) ist ein Bereich der Elongationszone der Wurzel abgebildet. Wenige markierte Kortezellen (vgl. Abb. 4.2), die außerhalb der YFP-markierten Endodermis und Perizykelzellen lagen, zeigten eine basale und nach außen (zur Epidermis), somit umgekehrt gerichtete Polarität (◄) im Vergleich zu den Perizykel- und Endodermiszellen.

In Abb. 4.4 A) - C), D) - F) und G) - I) sind Bereiche mit Bifurkationen der Wurzel dargestellt. Dabei handelt es sich bei A) - C) um eine sehr frühe, bei D) - F) um eine mittlere und bei G) - I) um eine späte Form der Bifurkation, bei welcher alle funktionellen Zellgruppen der Seitenwurzel bereits vollständig ausgereift sind. Ein sehr starkes YFP-Signal in unmittelbarer Nähe der jeweiligen Bifurkation entspricht einer großen Menge SLAH2 in diesen Zellen. Nahezu kein YFP-Signal ist in den umliegenden Zellen detektierbar, was in sehr ausgereiften Wurzelbereichen (weit von der Wurzelspitze entfernt) vermehrt festzustellen war (Daten nicht gezeigt). In A) ist zu erkennen, dass nur wenige Zellen mit YFP markiert sind. Diese Zellen befinden sich direkt angrenzend zum Zellkomplex der neuen Seitenwurzel (C)). Außerdem befinden sich diese Zellen auch nahe der Xylemstruktur in der Stele. Dies korreliert mit den Darstellungen in F) und I). In D) ist eine geschlossene Ringstruktur von Wurzelzellen zu erkennen, die sich im Sinne der gewählten Fokalebene am Grund der Seitenwurzel befindet. In G) wurde insbesondere in zwei Zellbereichen ein starkes Fluoreszenzsignal aufgezeichnet, welches die Ausstülpung der Seitenwurzel seitlich begrenzt (◄). Beide Bereiche sind verbunden und flankiert von weiteren markierten Zellen. Außerdem sind noch fortlaufende Zellen von der Hauptwurzel im Zentralzylinder der Seitenwurzel markiert (*). In den Zellen mit sehr starker YFP-Fluoreszenz wird eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation deutlich. Im Gegensatz zu der feinen linienförmigen Anordnung am Zellumriss (Abb. 4.3 A)) ist hier YFP fast im gesamten Zelllumen zu sehen (Abb. 4.4 A), D) und G)).

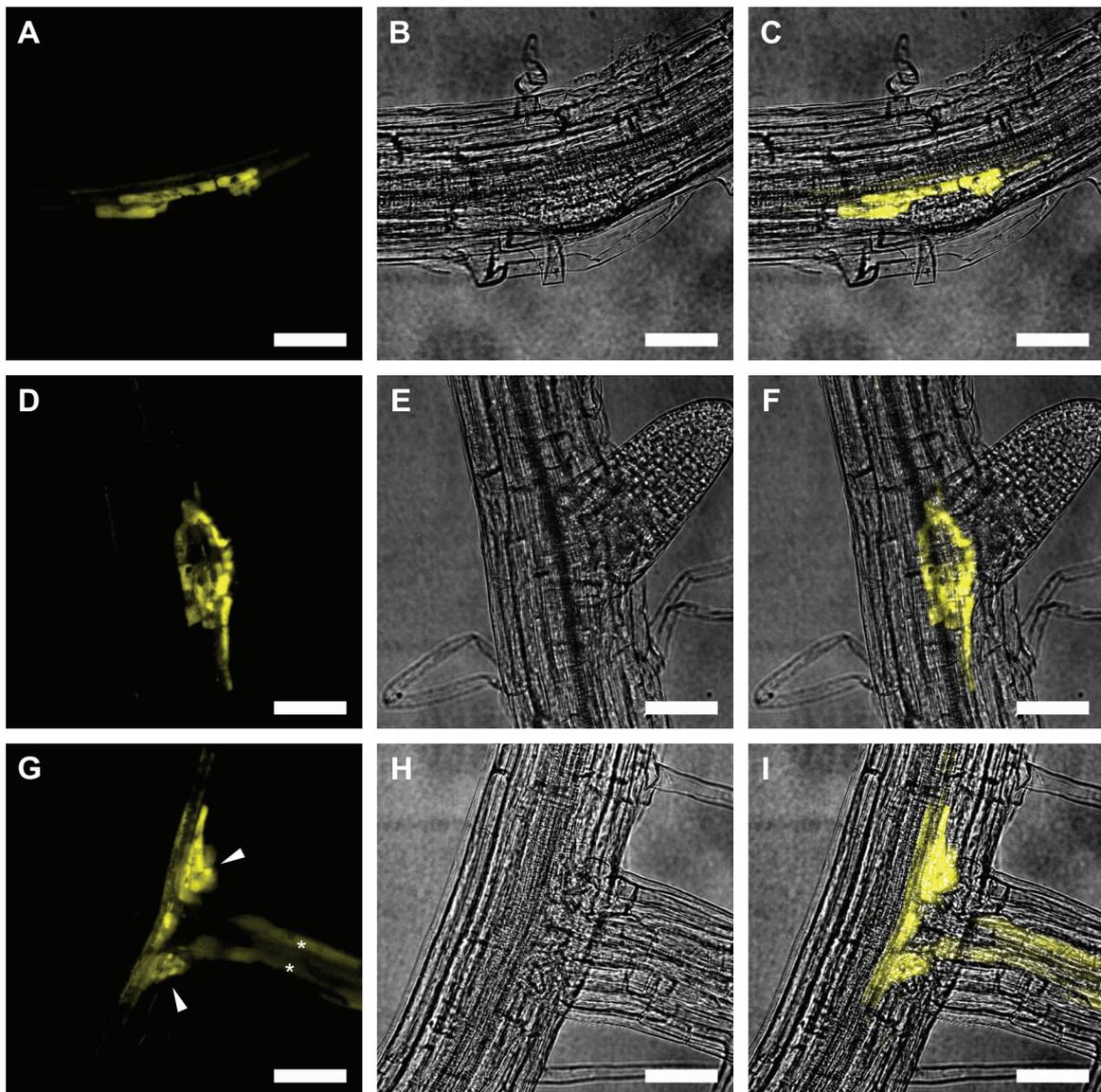


Abb. 4.4: SLAH2 im Bereich der lateralen Wurzelformierung. Expressionsmusteranalyse der SLAH2-YFP (gelb) Mutanten im Bereich der Seitenwurzel in verschiedenen Stadien. SLAH2 ist maßgeblich in den Perizykelzellen sichtbar und stark hochreguliert. Anhand der strukturellen Verteilung des YFP-Signals scheint das SLAH2-YFP Konstrukt ebenfalls in der Vakuole der Zellen lokalisiert zu sein. **(A-C)** Laterale Wurzelformierung in sehr frühem Stadium. In den initiierten Perizykelzellen (*primed pericycle cells*) ist Expression von SLAH2 stark hochreguliert **(D-F)** Im mittleren Stadium der Seitenwurzelbildung wird SLAH2 weiterhin in den Perizykelzellen exprimiert. **(G-I)** Nach voller Ausbildung der Seitenwurzel wird SLAH2 auch hier wieder in Perizykel und Endodermis (*) exprimiert. Die Ausstülpung der Seitenwurzel wird durch einen SLAH2-exprimierenden Zellring flankiert (◄). Maßstabsbalken= 50 μ m.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dem Kapitel 4.1 „Lokalisation von SLAH2 in der *At*-Wurzel“ diskutiert. Die Zellen der Endodermis und des Perizykel umgeben das Gefäßsystem der Pflanzenwurzel und bestimmen die Zusammensetzung von Mineralstoffen im Xylem [27, 124, 125]. Die Endodermis mit dem Casparischen Streifen stellt dabei die unüberwindbare Hürde für die nichtselektive apoplastische Nährstoffaufnahme (ebenfalls beispielsweise Farbstoffe) dar [121]. SLAH2 ist ein hochselektiver, nitratspezifischer, auswärtsrichtender Anionenkanal, der hauptsächlich in der Wurzel von höheren Pflanzen (*At*) exprimiert ist. Die Expression von SLAH2 konnte anhand von GUS-Färbungen im Bereich des Gefäßsystems der Wurzel lokalisiert werden [26]. Dabei wurde die höchste SLAH2 Expression im Bereich von lateralen Wurzelbifurkationen beobachtet [4, 26]. Dennoch sind im Vergleich der Expressionsmuster Unterschiede beschrieben. Maierhofer et al. begrenzt die Expression auf den Bereich der Stele (ohne Endodermis) [26], Zheng et al. beschreibt die Expression im Zentralzylinder und im umliegenden Bereich [126], wohingegen Negi et al. die Expression auf die Wurzelspitze und laterale Wurzelbifurkationen begrenzt [4]. Diese Unterschiede können auf die Verwendung unterschiedlicher SLAH2-Promotoren, die geringe Kontrasttiefe einer Durchlichtaufnahme oder die verschiedenen Problematiken der GUS-Färbung (beispielsweise Überdeckung eines schwachen GUS-Signals durch Gegenfärbung; Beeinträchtigung der GUS-Lokalisation bei der Probenpräparation) [127] zurückgeführt werden.

Hier wurde die Lokalisation von SLAH2 in den verschiedenen Wurzelzellgruppen anhand der Lokalisation des YFP und anatomischen Grundvoraussetzungen einer *At*-Wurzel bestimmt. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war eine eindeutige Zuordnung des YFP-Signals innerhalb des Wurzelgewebes möglich, weshalb auf spezifische Gegenfärbungen (beispielsweise Endodermis) verzichtet wurde. Vergleicht man den schematischen Aufbau einer Pflanzenwurzel (s. Abb. 1.7), mit allen Darstellungen in Abb. 4.2, Abb. 4.3, Abb. 4.4 und Abb. 4.8, Abb. 4.9 (crosssection SIM) zeigt sich der einzelschichtige Aufbau von Epidermis, Kortex, Endodermis und Perizykel der Wurzel. Jede dieser Zellgruppen bildet im Querschnitt der Wurzel einen geschlossenen Ring von Einzelzellen. Innerhalb dieser Zellen lassen sich im Längsschnitt lediglich die Xylemzellen anhand ihrer signifikanten, leiterartigen Struktur leicht zuordnen. Phloem- und Procambiumzellen sind in den gezeigten Abbildungen meist nur schwierig erkennbar und voneinander zu unterscheiden. Somit sind die beiden äußeren Zellreihen immer Epidermis- und Kortexzellen. Diese sind in Durchlichtaufnahmen sowie durch die CFW Färbung leicht zu lokalisieren und zu unterscheiden. In Abb. 4.2 erkennt man, dass die auf Kortexzellen folgenden Endodermiszellen SLAH2 exprimieren. Die Endodermiszellen konnten außerdem in lebenden Wurzeln nicht mehr mit CFW gefärbt werden. Ebenfalls wird SLAH2 in den direkt angrenzenden Perizykelzellen exprimiert, was insbesondere in Abb. 4.2 A) und B) gut sichtbar ist. Wichtig ist, dass innerhalb des Perizykelzellrings kein SLAH2 exprimiert wird, somit SLAH2 nicht von Xylem-,

Phloem- oder Procambiumzellen exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu sind außerhalb der Endodermis in den Querschnitten immer wieder einzelne Kortexzellen sichtbar, welche SLAH2 exprimieren. Betrachtet man die Wurzelspitze (s. Abb. 4.2 G)), so kann die SLAH2 Expression direkt in den Endodermis/Perizykel-Initiationszellen beobachtet werden. Die SLAH2 Expression zeigt sich entsprechend in allen von der Wurzelspitze wegführenden Endodermiszellen. Perizykelzellen und vereinzelt Kortexzellen exprimieren dabei ebenfalls SLAH2. Anhand der SLAH2-YFP Expression, welche in Abb. 4.3 dargestellt ist, befindet sich SLAH2 in der Plasmamembran von Endodermis- und Perizykelzellen. SLAH2 ist dabei weitestgehend polar in den Wurzelzellen orientiert. In den Endodermiszellen ist diese Polarität am deutlichsten erkennbar. Außerdem konnte eine radiale Polarität festgestellt werden, die entweder radial neutral (zur radialen Nachbarzelle) oder zum Wurzelzentrum gerichtet war. In Perizykelzellen konnte die Polarität nicht im Detail aufgelöst werden. Kortexzellen wiederum zeigten eine umgekehrte Polarität (basal und nach außen gerichtet). Die Polarität ist für das Verständnis der Funktion von SLAH2 von essentieller Bedeutung und bedarf einer genaueren Untersuchung.

Dass SLAH2 bei der Beladung des Xylems mit Nitrat eine entscheidende Rolle spielt [21], ist anhand der Lokalisation in Endodermis- und Perizykel-Zellen sehr wahrscheinlich. Eine effektiver, gerichteter Transport von Nitrat in die Stele hin zu den Xylemzellen erfordert eine zur Stele hin gerichtete polare Verteilung von SLAH2. Eine solche Polarität wurde für den auswärtsgerichteten Kaliumkanal SKOR gezeigt. Dieser Shaker-Kaliumkanal belädt das Xylem mit Kalium [128]. Aufgrundessen wäre eine entsprechende Polarität des auswärtsgerichteten Nitratkanals SLAH2 auch zu erwarten. Deshalb sind weitere Analysen der Expressionsmuster von SLAH2, insbesondere in Bezug auf die Polarität von SLAH2 von größtem Interesse und könnten einige Fragestellungen bezüglich der Funktion von SLAH2 in der Pflanzenwurzel klären.

Seitenwurzeln entstehen aus vollentwickelten Perizykelzellen (s. Abb. 4.5). Dabei können lediglich diese Perizykelzellen Seitenwurzeln ausbilden, welche Kontakt zu einem der beiden Xylemgefäße haben und bereits im basalen Meristem darauf vorprogrammiert („*primed pericycle cells*“) wurden. Diese „Gründerzellen“ (*lateral root founder cells*) werden durch eine feine Trennung zwischen der Perizykelzelle und der Wurzelspitze geprägt. Die Initiation zur Ausbildung einer Seitenwurzel findet in der Differenzierungszone, also aus voll entwickelten Perizykelzellen statt. Sie beginnt mit der ersten transversalen Teilung der Gründerzelle [129, 130]. Darauf bildet sich das Seitenwurzelprimordium, welches hauptsächlich durch Zellausdehnung durch die Kortex- und Epidermiszellen der Ursprungswurzel bricht [131]. Dabei werden die Zellwände der betroffenen Zellen enzymatisch aufgeweicht, um die Trennung der Zellen zu ermöglichen. Die Zellwände der neuen Seitenwurzelzellen werden dabei nicht beeinflusst, da sie sich durch eine andere Zellwandzusammensetzung auszeichnen, bei welcher die Pektine weitestgehend methyliert sind. Nachdem die Seitenwurzel

durchgedrungen ist, wird das Meristem aktiviert und es bildet sich die oben beschriebene Polarität der Wurzel aus [132, 133].

Die Wurzelentwicklung findet nicht nach einem festgelegten genetischen Programm statt, sondern reagiert hochsensitiv auf wechselnde Umweltbedingungen. Die Wachstums-Richtung und -Rate sowie die Ausbildung und Anzahl von Seitenwurzeln wird dabei von Schwerkraft, Licht, Wasser und Berührung beeinflusst. Abiotische Faktoren wie Salz, Trockenheit, Hitze, Nährstoffmangel und Toxizität induzieren dabei molekulare und phänotypische Reaktionen der Pflanzenwurzel. Dabei sind die Reaktionsmechanismen, Signalkaskaden, die Redundanzen, sogar Antagonismen, sowie involvierte Rezeptoren oder andere Proteine schwierig zu untersuchen, da Stresssymptom und Stressreaktion oft nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden sind [134-137].

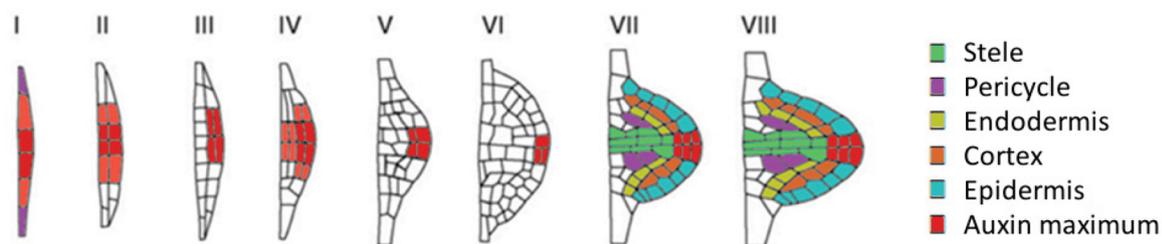


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Formierung von Seitenwurzeln. (I) Seitenwurzel-initiation. Es kommt zur antiklinen Teilung der Gründerzellen im Perizykel. **(II)** Äußere und Innere Zellschicht werden durch die perikline Teilung gebildet. **(III-IV)** Ausbildung des Seitenwurzelprimordium durch perikline Zellteilung. **(V)** Antikline Zellteilung führt zum Beginn des Durchbrechens durch den Kortex der Primärwurzel. **(VI)** Verschiedene Zelltypen werden ausgebildet. **(VII)** Das Meristem der Seitenwurzel wird formiert **(VIII)** und beim Durchdringen des Primordiums durch die Primärwurzel aktiviert. Die Abbildung ist übernommen aus „De Smet, et al., 2015“ [101].

In der Regulierung für das gerichtete Wurzelwachstum und die Entwicklung einer Seitenwurzel spielt Nitrat eine wichtige und ebenso komplexe Rolle. Die adaptive Reaktion der Wurzel auf Nitrat in *At* hängt unter anderem von dem NRT1.1 Transporter ab. Die Regulationsmechanismen von NRT1.1 sind dabei zweigeteilt. Zum einen unterdrückt NRT1.1 die Entstehung von Seitenwurzeln bei Abwesenheit von Nitrat oder geringen Nitratkonzentrationen durch seine Auxin-Transport-Aktivität, was die Akkumulation von Auxin in Seitenwurzeln verringert. Zum anderen stimuliert die Anwesenheit von Nitrat die NRT1.1 Transkription in der Primärwurzel und im Seitenwurzelprimordium. In der weitergehenden Untersuchung dieser vermeintlichen Diskrepanz konnte gezeigt werden, dass Nitrat sowohl die Transkription stimuliert, aber auch die posttranskriptionelle Proteinakkumulation von NRT1.1 beeinflusst. Weitergehend konnte gezeigt werden, dass die Proteinakkumulation zudem Gewebespezifisch (Kortex – Epidermis) reguliert ist. Die Vielseitigkeit und Komplexität dieser

adaptiven Reaktionen auf Nitrat sind für das gerichtete Wurzelwachstum essentiell [138]. Die Verschiebung von Nitratkonzentrationen durch SLAH2 könnte die Seitenwurzelentwicklung in diesem Zusammenhang stark beeinflussen. Auf eine mögliche Funktion von SLAH2 wird im Folgenden näher eingegangen.

In den Gründerzellen der Seitenwurzel kann nach deren Teilung eine extreme Hochregulation der Expression von SLAH2 festgestellt werden (s. Abb. 4.4 C)). SLAH2 ist dabei so stark hochreguliert, dass große Teile von SLAH2-YFP bereits zusätzlich zytosolisch sogar als Abbauprodukt infolge von Degradation in der Vakuole der Zellen vorliegt [139]. Die Hochregulierung begrenzt sich dabei aber in der weiteren Seitenwurzeletablierung ausschließlich auf diese einzelnen Perizykelzellen (s. Abb. 4.4 F) und I)). Die Expression von SLAH2 in Endodermiszellen ist erst wieder bei der voll ausgebildeten Seitenwurzel festzustellen (s. Abb. 4.4 I)).

Die extreme Hochregulation der Expression von SLAH2 in Bifurkationsbereichen sowie in den einzelnen Kortezellen könnte ein Hinweis dafür sein, dass SLAH2 bei der Regulation der Seitenwurzelbildung involviert ist. Zudem ist denkbar, dass SLAH2 bei der Instruierung der seitenwurzelbildenden Perizykelzellen beteiligt ist. Möglicherweise exprimieren genau die anliegenden Kortezellen SLAH2. Die genaue Untersuchung von SLAH2 in den Wurzel-Bifurkationsbereichen sowie beispielsweise Wurzelkrümmung in Bereichen von SLAH2-exprimierenden Kortezellen könnte weitere Informationen liefern, die zum Verständnis dieser Prozesse beitragen. SLAH2 kommt ebenso als wichtiger Rezeptor für Umweltstimuli in Frage, welcher das gerichtete Wachstum der Wurzel und die Ausbildung von Seitenwurzeln beeinflusst. Hier konnte im Detail gezeigt werden, welche speziellen Perizykelzellen bei der Ausbildung von Seitenwurzeln eine Hochregulierung von SLAH2 aufweisen.

Subzelluläre Lokalisation von SLAH4 in der *Nb*-Blattepidermis

Die Epidermis ist die äußerste Zellschicht der Pflanze, sie trennt das Pflanzeninnere von seiner Umwelt und schützt das darunterliegende Pflanzengewebe. Die puzzleteil-förmige Struktur und das Ineinandergreifen der Epidermiszellen ist charakteristisch. Speziell innerhalb der Epidermis der Blatt-Unterseite befinden sich die Stomata und bilden die einzigen Öffnungen zum Pflanzeninneren.[140]. Die transiente Transfektion von Pflanzenzellen im intakten Pflanzenverbund ist aufgrund der Epidermis schwierig und beispielsweise nur durch die Einbringung gentechnisch modifizierter Agrobakterien über die Stomata in das Zellinnere möglich. [141]. Die sehr geringe Anzahl Chloroplasten und die einfache Zugänglichkeit als äußerste Zellschicht machen Epidermiszellen zu einem hochinteressanten Zielobjekt für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit vielen Anwendungsmöglichkeiten.

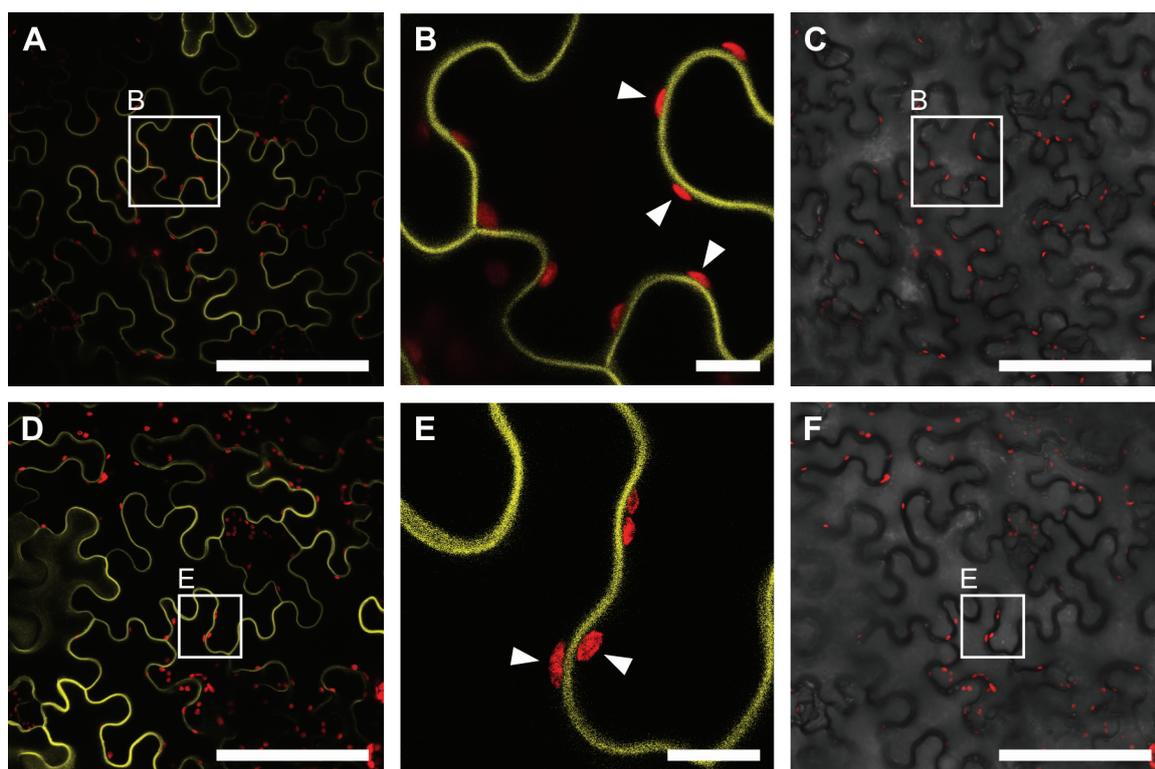


Abb. 4.6: SLAH4 Lokalisation in der Plasmamembran. CLSM-Aufnahmen von transient transfizierten *Nb*-Blättern mit mOrange-markierten SLAH4 (SLAH4::mO) durch Inokulation mit transgenen Agrobakterien, zur Analyse der subzellulären Lokalisation von SLAH4 in der Pflanzenzelle. **(A-F)** Im Bereich der puzzelförmigen Epidermiszellen des Tabakblattes wurde das mOrange-Signal (gelb), die Chlorophyllfluoreszenz (rot) und eine Weißlichtaufnahme aufgezeichnet. **(A und D)** zeigen eine Übersicht der Blattoberfläche, bei der die mOrange-Fluoreszenz den Zellumriss der Epidermiszellen markiert (vgl. mit den Weißlichtbildern (C und F)). Chloroplasten liegen im Zytosol der Pflanzenzelle vor, welches durch die Plasmamembran umschlossen wird. **(B, E)** In den Detailansichten ist zu erkennen, dass die Chloroplasten (◄) immer auf der inneren Seite der Plasmamembran (zytosolisch) liegen, was im Kontext des Zellaufbaus einer Pflanzenzelle beweist, dass SLAH4 in der Plasmamembran und nicht in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. **(E)** Die Membranständigkeit von SLAH4 wird zudem durch die beiden gegenüberliegenden Chloroplasten (◄) mit den dazwischen liegenden Plasmamembranen verdeutlicht, welche durch mO::SLAH4 markiert werden. Die Chlorophyll- und mO-Fluoreszenz zeigen keine Kolo-kalisation (0 %). Maßstabsbalken= 100 µm (Übersichten)/10 µm (Detailansichten).

Für die Untersuchungen von SLAH4 wurde ein Plasmidkonstrukt hergestellt, bei welchem SLAH4 mit einem mOrange (mO, FP) markiert wurde. Das Konstrukt wurde mittels Inokulation von Agrobakterien transient in Blattepidermiszellen von *Nb*-Pflanzen eingebracht und dort exprimiert.

In Abb. 4.6 A) - F) sind CLSM Aufnahmen abgebildet, welche ein Fusionsbild aus der aufgenommenen mOrange- und der Chlorophyllfluoreszenz, jeweils eine Detailansicht und die zugehörigen Weißlichtbilder mit der Chlorophyllfluoreszenz zeigen.

Die charakteristische, puzzleartige Epidermisoberfläche wird sehr präzise durch die mO-Fluoreszenz dargestellt. Der Zellumriss ist in den Weißlichtbildern als dunkle Linienstruktur erkennbar und kolokalisiert mit dem mO-Signal (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu kolokalisiert das Chlorophyll- und mO-Signal überhaupt nicht. Chloroplasten sind ausschließlich innerhalb (im Kontext der Epidermiszelle (◀)) des mO-Signals zu sehen, weshalb das mO-Signal eindeutig mit der Position der Plasmamembran kolokalisiert. Die Fokalebene wurde bei allen Bildern so gewählt, dass sich der Großteil der Epidermiszellen im Flächenschnitt zeigt. Lediglich in A) ist im links-mittleren Bereich eine Epidermiszelle zu erkennen, bei welcher die Oberfläche ebenfalls sichtbar ist.

In Abb. 4.7 A) - C) ist eine untransfizierte *Nb*-Pflanze dargestellt. Die beiden Kanäle (Chlorophyll (A)) und mO (B)) werden hier getrennt gezeigt. Das punktförmige Fluoreszenzsignal der Chloroplasten ist gut zu erkennen, jedoch keinerlei mO-Signal. In C) ist das Fusionsbild aus Weißlichtbild, Chlorophyll- und mO-Kanal gezeigt.

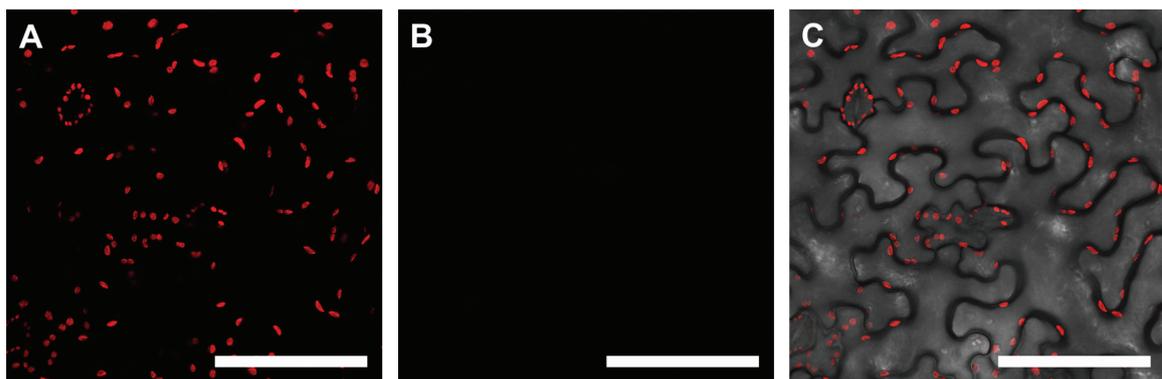


Abb. 4.7: Negativkontrolle zu SLAH4 in der Plasmamembran. Die CLSM-Aufnahmen untransfzierter *Nb*-Blätter zeigt (A) lediglich die Chlorophyllfluoreszenz. (B) Bei Anregung mit 560 nm ist kein Fluoreszenzsignal im Bereich des Zellumrisses detektierbar. (C) Das Fusionsbild zeigt wiederum die Intaktheit und die zu erwartende Lokalisation der Chloroplasten auf Seite des Zelllumens. Maßstabsbalken= 100 μ m.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation von SLAH4 diskutiert. Derzeit ist über die Funktion und Lokalisation von SLAH4 nur wenig bekannt. Da SLAH4 bisher nicht als aktiver Ionenkanal charakterisiert werden konnte, ist eine wichtige Frage, ob SLAH4 überhaupt in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Chloroplasten befinden sich im Zytosol der Epidermiszellen. Das Lumen des Zytosols wird von der Plasmamembran und Zellwand auf der Außenseite und von der Vakuolenmembran auf der Innenseite der Zelle begrenzt. Nimmt man nun die Chlorophyllfluoreszenz als Referenzstruktur, so befindet sich SLAH4 ausschließlich in der Plasmamembran der Epidermiszellen. Es ist signifikant, dass kein mO-Signal im Zytosol

detektierbar ist. Betrachtet man insbesondere in Abb. 4.6 E) die beiden gegenüberliegenden Chloroplasten (◀), so zeigt sich eine eindeutige Lokalisation von SLAH4 in der Plasmamembran. Die Negativkontrolle, welche in Abb. 4.7 gezeigt ist, dient als Vergleichsmessung, sodass es sich bei dem aufgezeichneten mO-Signal aus Abb. 4.6 nicht um die Autofluoreszenz der Zellwand (oder andere Hintergrundfluoreszenz) handeln kann.

Aufgrund der Lokalisation von SLAH4 in der Plasmamembran ist denkbar, dass SLAH4 zwar über keine eigentliche Kanaleigenschaft verfügt, jedoch eine vergleichbare, regulatorische Funktion wie beispielsweise SLAH1 innehat [24] wie elektrophysiologische Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten in der AG Geiger vermuten lassen.

4.2 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von Pflanzengewebe und Pflanzenproteinen

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit, Strukturen aufzulösen, welche unterhalb der Auflösungsgrenze konventioneller Mikroskopiertechniken liegen. Detaillierte Einblicke in die Verteilung von Pflanzenproteinen im Pflanzengewebe ermöglichen neue Erkenntnisse über deren Aufgaben und Wirkweisen. Im Folgenden sind die Ergebnisse gezeigt, bei welchen SIM [70, 71] (Abb. 4.8-Abb. 4.12), dSTORM [142, 143] (Abb. 4.12) und ExM [144] (Abb. 4.13-Abb. 4.23) im Pflanzengewebe etabliert wurden. Ebenso wurde das Potential der einzelnen Messtechnik quantifiziert und mögliche Modellstrukturen hierfür vorgestellt.

Die polare Verteilung von PIN1 und PIN2 im Wurzelgewebe anhand von SIM Aufnahmen

Die polare Verteilung von pflanzenspezifischen Wachstumshormonen wie Auxin gehört zu den wichtigsten Faktoren des gerichteten Wachstums und Nährstofftransports in der Pflanze. Ein solcher Gradient wird durch die polare Lokalisation spezieller Transporter (beispielsweise PIN Proteine) generiert. Mit Hilfe der SIM Mikroskopie kann nicht nur die polare Verteilung eines solchen Proteins in der Zelle untersucht werden, sondern auch die Verteilung innerhalb der Plasmamembran. Gruppierungen von Pflanzenproteinen innerhalb der Plasmamembran konnten für die Proteine der PIN-FORMED Familie (PIN) bereits mit Hilfe der von *stimulated emission depletion* (STED) beschrieben werden. belegen vorangegangene STED-Studien von PIN-Proteinen [145].

Hier wurde die Verteilung der PIN-Proteine mittels SIM in der Wurzel betrachtet. Die PIN Proteine sind Auxin-Transporter-Proteine. In Landpflanzen wird den PIN-Proteinen eine Schlüsselrolle der Embryogenese, Morphogenese und Organogenese, sowie

gerichtetem Wachstum durch Umweltstimuli zugeschrieben. Die PIN-Proteine generieren die polare Akkumulation von Auxin, einem der wichtigsten Wachstumshormone der Pflanze, in der Wurzelspitze. Für das Wurzelwachstum/-Entwicklung ist dabei sowohl die zur Wurzelspitze gerichtete Verteilung von Auxin, als auch die laterale Rückverteilung entscheidend [146, 147]. Von den acht unterschiedlichen PIN-Proteinen werden lediglich PIN1-PIN4 und PIN7 als membranständige Auxin-Efflux Transporter charakterisiert [148]. Die verschiedenen PINs werden in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Die unterschiedlichen Signalkaskaden, welche die polare Lokalisation der PIN Proteine auf subzellulärer Ebene beeinflussen wurden bereits aufgeklärt [149, 150].

Die Auxin-Efflux-Transport-Komponente 2 (PIN2) wird in Epidermis- und Kortexzellen der Wurzel exprimiert. Dabei ist es in meristematischen Epidermiszellen basal (zur WS) und in den Kortexzellen apikal (zum Sproß) orientiert [151].

Für die SIM-Aufnahmen wurden stabile *At*-Mutanten verwendet, welche PIN2-GFP (Abb. 4.8 A) - D), gelb) und PIN1-GFP (E), gelb) exprimierten. Zusätzlich wurde das lebende Wurzelgewebe mit CFW (magenta) gefärbt. Die Fusionsbilder dieser beiden Kanäle sind in Abb. 4.8 gezeigt.

Vergleicht man die Aufnahmen A) - C) miteinander, so wurde das Präparat in einem immer steileren Winkel im Bezug zur Fokalebene betrachtet. Deshalb ist in A) das Präparat in einem orthogonalen Längsschnitt zu sehen, während in C) ansatzweise die Aufsicht auf den Zellpol bewerkstelligt werden konnte, ohne dabei die Wurzel selbst zu manipulieren (der Objektträger wurde dabei ausnahmslos orthogonal zum Objektiv platziert).

Das in Gelb dargestellte GFP Signal zeigt sich in A) in Bildmitte als zusammenhängende Linienstruktur. Dabei ist keine nennenswerte Untergliederung erkennbar. In den Randbereichen des Bildes sind hingegen perlenkettenartige Aneinanderreihungen von näherungsweise punktförmigen Strukturen erkennbar. CFW (magenta) zeigt den Umriss der Zellen. Das GFP-Signal ist immer direkt an der Zellwand auf der von der Wurzelspitze (WS→) abgewandten Zellseite orientiert. Die Mittellinien der beiden Signale sind orthogonal 220 ± 20 nm voneinander entfernt. Das CFW- und GFP-Signal kolokalisiert dabei nicht. An den Seitenwänden der Zellen wurde in einem kurzen Bereich (◀) ebenfalls noch ein GFP Signal detektiert. Analysiert man die Intensitätsverteilung dieser Struktur, ist eine kontinuierliche Abschwächung vom Zellpol fortlaufend festzustellen, welche Rückschlüsse auf die polare PIN2 Verteilung am Zellpol zulässt. Die Verteilung dieser Signalverminderung ließ sich sehr gut mit einer Bigauss-förmigen Anpassung analysieren (Fit-Qualität: $R^2 = 0,8 \pm 0,06$). 95 % des GFP Signals einer Seitenwand befindet sich dabei im Mittel innerhalb von $3,1 \pm 0,9$ μm (MW) (68 % innerhalb $1,5 \pm 0,4$ μm und 99,7 % innerhalb $4,6 \pm 1,3$ μm).

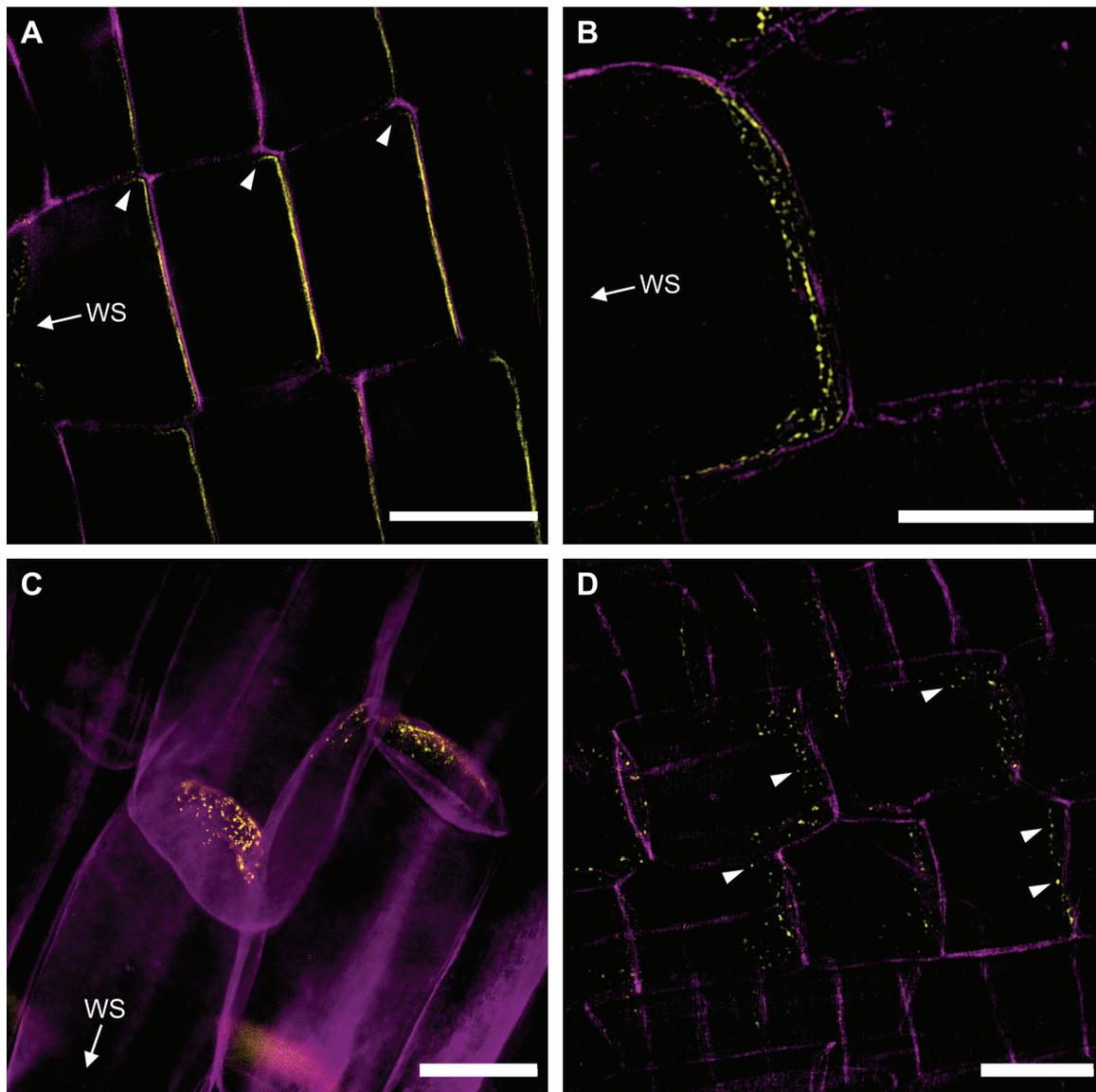


Abb. 4.8: Die polare Verteilung von PIN1 und PIN2 im Wurzelgewebe anhand von SIM-Aufnahmen. (A-D) SIM-Aufnahmen von PIN2::GFP (gelb) und CFW (magenta) gefärbten *At*-Wurzelspitzen im Bereich des Apikalmeristems. PIN1 ist am apikalen Pol der Epidermis- und Kortex-Wurzelzellen in der Plasmamembran lokalisiert (\leftarrow WS). **(B-D)** Sofern man eine annähernde Aufsicht auf den Zellpol generiert, wird die ultrastrukturelle Verteilung in einzelnen Gruppierungen von PIN2 mit Hilfe der SIM sichtbar. **(D)** Die Gruppierungen (\blacktriangleleft) haben eine Größe (FWHM) längs zur Plasmamembran des Zellpols von $\min 117 \pm 32$ nm bis $\max 340 \pm 12$ nm mit einem MW von 224 ± 53 nm und quer zur Plasmamembran ein $\min 150 \pm 7$ nm bis $\max 445 \pm 34$ nm und einen MW von 231 ± 58 nm. Alle Werte befinden sich oberhalb des Auflösungslimits des verwendeten SIM-Mikroskops (mit $\lambda_{exc} = 488$ nm bei ~ 90 nm). Maßstabsbalken= 10 μ m.

In B) ist als Detailansicht der Übergang von zwei Wurzelzellen zu sehen, der durch die CFW Markierung gut sichtbar ist. Ausschließlich in der linken Zelle ist am wurzelspitzen-abgewandten Pol (apikalen) ein GFP-Signal zu erkennen. Dieses ist im Gegensatz zu A) nur noch als punktförmige Verteilung zu sehen. Es erstreckt sich über den gesamten Zellpol und fällt in den Randbereichen noch einige Mikrometer an der Seitenwand der Zelle ab. Bei C) ist Zellwand (CFW) sehr gut erkennbar. Auch hier ist das GFP-Signal als gruppierte, punktförmige Struktur am Zellpol sichtbar.

In D) sind die Wurzelzellen so angeordnet, dass sich die apikale (zum Sproß) Zellmembran näherungsweise in Aufsicht zeigt. Eine vergleichsweise flächige Ausbreitung des punktförmigen GFP-Signals ist aufgezeichnet. Das Signal ist weiterhin polar im Bereich der Zellwände lokalisiert. Analysiert man die Größe der punktförmigen Strukturen, so erhält man eine FWHM längs zur Plasmamembran des Zellpols von $\min 117 \pm 32 \text{ nm}$ bis $\max 340 \pm 12 \text{ nm}$ mit einem MW von $224 \pm 53 \text{ nm}$. Die Vermessung quer zur Plasmamembran ergibt ein $\min 150 \pm 7 \text{ nm}$ bis $\max 445 \pm 34 \text{ nm}$ und einen MW von $231 \pm 58 \text{ nm}$. Dabei wurden lediglich vereinzelte Cluster vermessen, welche eine homogene Verteilung ihrer Intensität zeigten (beispielsweise ◀).

Die vielfach beschriebene polare Lokalisation von PIN2-GFP konnte in den SIM-Aufnahmen in Abb. 4.8 bestätigt werden. In A) ist der Längsschnitt der Zelle so getroffen, dass sich die apikale Zellwand der abgebildeten Kortezellen orthogonal zur Fokalebene befindet, weshalb sich die Zellwand als feine Linie darstellt. Die unmittelbare Nähe des GFP-Signals (220 nm) zeigt, dass PIN2 in der Plasmamembran lokalisiert ist. Vakuoläre-oder vesikuläre Lokalisation ist kaum vorhanden (in der dargestellten Abbildung nicht zu erkennen). Die polare Lokalisation ist extrem kondensiert und erstreckt sich ausschließlich über den Zellpol. Mindestens 99,7 % der PIN2 Proteine in der Plasmamembran befinden sich im Bereich des Zellpols einer Zelle (einschließlich jeweils $4,6 \mu\text{m}$ der Seitenwände).

Nur wenig beschrieben ist die inhomogene Verteilung von PIN2 über die Plasmamembran. PIN2 gruppiert sich dabei innerhalb der Plasmamembran in Subdomänen [145, 152][153]. Diese Subdomänen sind schwierig abzubilden, da die Aufsicht auf den Zellpol im Prinzip nur durch Schnittpräparate für Weitfeldmikroskope oder durch konfokale Messtechniken und „Z-Stacks“ möglich wird. Außerdem liegt die Größe dieser Subdomänen unterhalb der Auflösungsgrenze von konventionellen Lichtmikroskopen, weshalb hochauflösende Mikroskopietechniken notwendig sind. In A) konnten diese Untereinheiten innerhalb der Plasmamembran entsprechend nicht aufgelöst werden. Ein SIM-Mikroskop ist ein Weitfeldmikroskopaufbau, bei welchem die Anregung der Fluorophore im Epi-Modus erfolgt. Hierbei überlagert sich das Fluoreszenzsignal in der Z-Ebene, was eine schlechte Auflösung in der Z-Ebene zur Folge hat. Deshalb ist in A) PIN2 nur als Linienstruktur zu sehen. Dafür spricht, dass die Struktur im Querschnitt ein FWHM von $201 \pm 13 \text{ nm}$ aufweist, PIN2 in der

Plasmamembran jedoch schmaler dargestellt werden müsste. Die Auflösungsgrenze eines SIM-Mikroskops liegt bei ~ 90 nm (d_{FWHM}) bei einer verwendeten Anregungswellenlänge (λ_{exc}) von 488 nm und somit unterhalb dieses gemessenen Wertes.

Die Veränderung des Winkels des Präparats in den Abbildungen B) - D) ermöglichte die Darstellung der apikalen Plasmamembran als Fläche in X-Y. Die Subdomänen von PIN2 konnten nun erstmalig mit Hilfe von SIM in einer Aufsicht dargestellt werden. PIN2 liegt umfassend in diesen Subdomänen vor. Die vornehmlich symmetrische und runde Form (224 x 231 nm) zeigt dabei keine Polarität innerhalb der Membran. Mit einem Minimalwert des Durchmessers von 117 nm liegen diese Subdomänen im Bereich des Auflösungsvermögens des SIM-Mikroskops, sofern man negativ beeinflussende Faktoren (Hintergrundfluoreszenz, Probendicke, Helligkeit des Fluorophors, etc.) miteinbezieht. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Mehrheit der Cluster oberhalb dieser Größe liegen, da lediglich 2 von 50 Werten in dieser Größenordnung aufgezeichnet wurden. Dies stimmt mit den Daten aus [145] überein.

Bisher gibt es nur wenige wissenschaftliche Erhebungen, bei welchen hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie und im Speziellen die SIM verwendet wurde, um Pflanzenproteine zu untersuchen [154, 155]. In den durchgeführten Versuchen zur PIN2 Lokalisation konnte hier gezeigt werden, dass die SIM strukturelle und auch funktionelle Analysen von Proteinen in Pflanzengewebe mit einer Auflösung von min. 120 nm ermöglicht.

Problematisch zeigt sich die Darstellung mit Hilfe eines SIM-Mikroskops, wenn sich das markierte Protein oder die gefärbte Struktur tief im Gewebe befindet. Speziell in Pflanzengewebe kann dabei Hintergrundfluoreszenz (z. B. Chloroplasten und Zellwand) störend wirken. Die Herstellung von Schnittpräparaten wäre in diesem Fall unumgänglich. *Array-tomography* bietet hierfür eine Möglichkeit auch große Bereiche von Pflanzengewebe dreidimensional hochaufzulösen [109]. Das Potential von Schnittpräparaten und SIM wird im folgenden Kapitel näher illustriert.

Ultradünnschnitte und SIM Mikroskopie der *At*-Wurzel

Modellstrukturen sind wichtiger Bestandteil bei der Etablierung neuer hochauflösender Mikroskopietechniken und werden hierbei zur Quantifizierung von Markierungseffektivität, Analyse struktureller Intaktheit oder zur Bestimmung der erreichten Auflösung verwendet (beispielsweise MT [88], Kernporenkomplex [156], Centriole [74], DNA Origami [157]).

Die Zellwand der Pflanzenzellen liegt mit einer Dicke von 100 nm (bis zu mehreren μ m) genau im Bereich des Auflösungsvermögens der SIM. Die Zellwand ist eine der charakteristischen Strukturen der Pflanzenzelle und gibt dieser die äußere Form und mechanische Stabilität. Die Zellwand limitiert die Teilung und bestimmt die Richtung des Zellwachstums und hat damit einen wesentlichen Einfluss auf die Morphologie und die

Entwicklung einer Pflanze. Zudem vermittelt sie intrazelluläre Kommunikation, bietet Schutz gegen Pathogene und übernimmt im Tracheensystem hochspezialisierte Funktionen [158]. Die genaue Untersuchung der Zellwandarchitektur, insbesondere von sekundären Verdickungen in bestimmten Strukturen oder Zellgruppen könnte neue Einblicke in die Organisation der Pflanze liefern [159]. In diesem Kontext wurden hier Wurzelquerschnitte von eingebetteten *At*-Setzlingen angefertigt, mit CFW gefärbt, mittels SIM bildlich dargestellt (s. Abb. 4.9 und Abb. 4.10) und strukturell analysiert (s. Abb. 4.11 und Abb. 4.12).

Die Übersicht des Wurzelquerschnitts zeigt den typischen Aufbau einer frühen Pflanzenwurzel im Bereich des basalen Meristems (s. Abb. 4.9). Durch die CFW-Färbung sind lediglich die Zellwände der Wurzel markiert. Man kann dabei die in Ringen angeordneten Zellen der Epidermis (ep), Kortex (co), Endodermis (en) und Perizykel (pe*) voneinander unterscheiden. Außerdem sind in der Detailansicht (s. Abb. 4.10 A) die einzelnen Zellen der Stele mit Endodermis (*), Phloem (phl), Procambium (pc), Metaxylem (mxy) und Protoxylem (pxy) zu erkennen.

Betrachtet man die Zellwand zwischen zwei Epidermiszellen (B)), ist die durchgängige Färbung der einzelnen Zellwände auffällig sowie die weitestgehende Trennung und doppel-linienförmige Struktur an der Kontaktstelle der beiden Zellen.

In C) wurde der Bereich (i) bis (iii) als dreidimensionaler Intensitätsgraph aufgetragen und genauer analysiert. Dabei wurden 15 zur Zellwand orthogonale Intensitätsmessungen gemacht. Die Messungen wurden dabei in regelmäßigen Abständen durchgeführt, da sich der Winkel pro Messung leicht änderte, wurden diese jedoch nicht maßstabsgetreu aufgetragen. Beide Peaks sind im Bereich von Messung (iii) noch deutlich voneinander zu trennen, bei (ii) gerade noch zu trennen und bei (i) nicht mehr voneinander trennbar. Dies wird deutlicher in der Aufsicht welche in D) dargestellt ist. Passt man die Intensität in (i-iii) mit einer gaussförmigen Verteilung an, so erhält man die in (E)) aufgetragenen Liniendiagramme. Für die Verteilung von (ii) erhält man dabei einen Abstand der einzelnen Peaks von 118 nm. In (i) kann lediglich das FWHM des Einzelpeaks bestimmt werden.

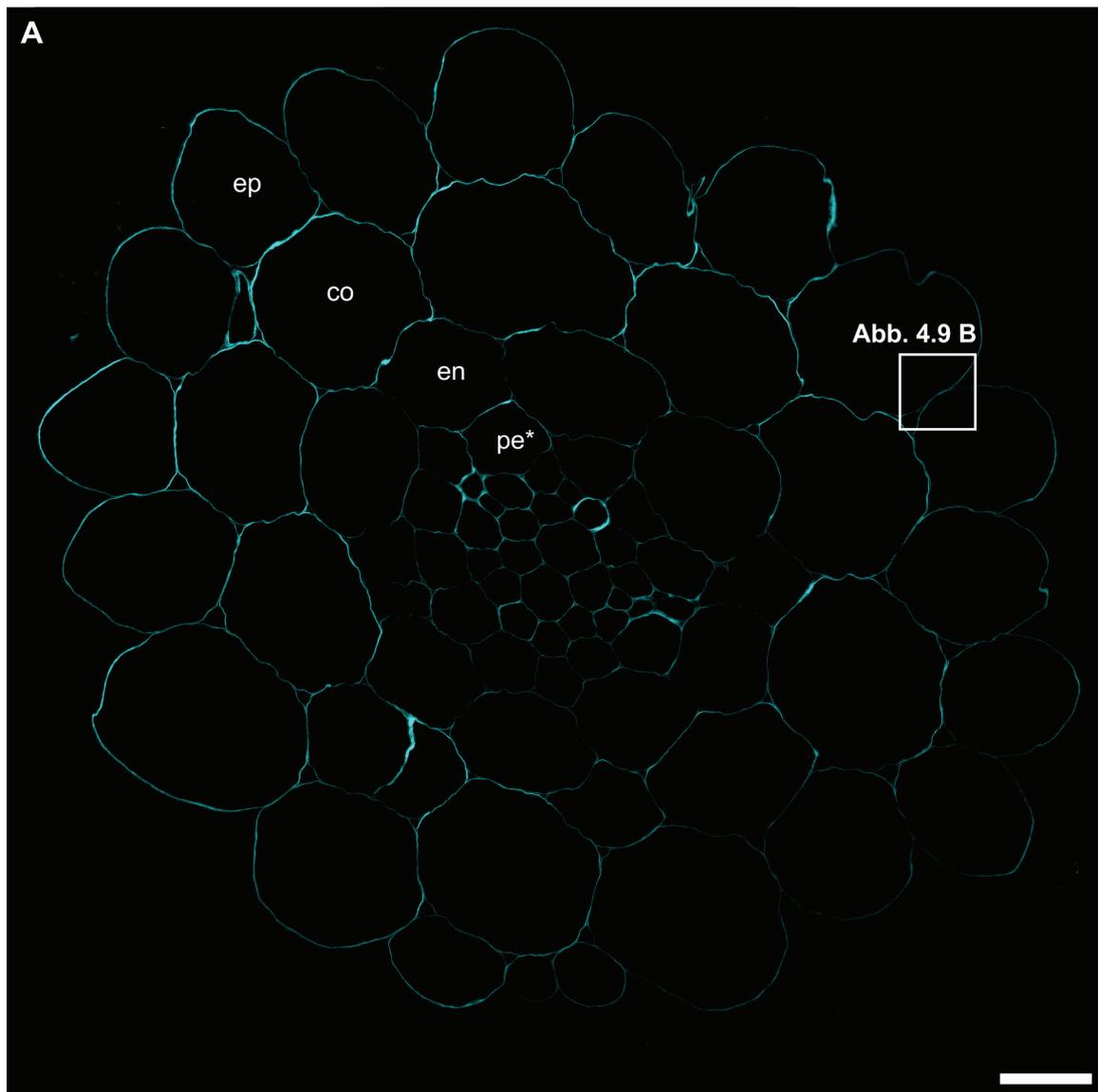


Abb. 4.9: SIM-Aufnahme von Ultradünnschnitten der *At*-Wurzel. (A) zeigt die SIM-Aufnahme eines ultradünnen Querschnitts (100 nm) einer in LR-White eingebetteten und mit CFW (cyan) gefärbten *At*-Wurzel im Bereich des basalen Meristems. Die ringförmige Anordnung der Epidermis- (ep), Kortex- (co), Endodermis- (en) und Perizykelzellen (pe*) ist deutlich erkennbar und die radiale Polarität der Wurzel nachvollziehbar. Die Färbung der Zellwände mit CFW ist umfassend und die Intaktheit der Pflanzenwurzel ist gegeben. Maßstabsbalken= 10 μ m.

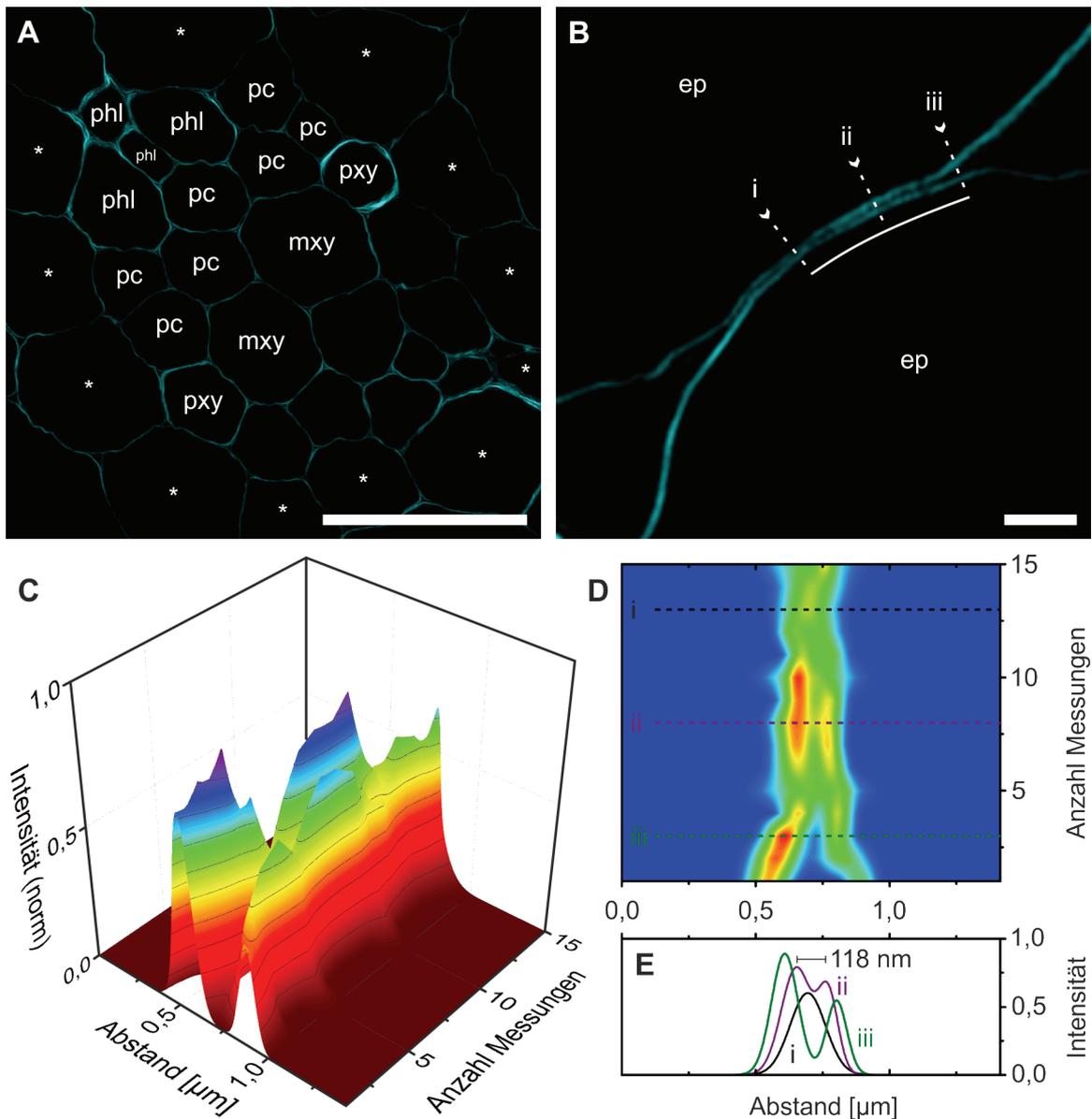


Abb. 4.10: Strukturelle Detailanalyse des CFW-gefärbten Wurzelquerschnitts mittels SIM. (A) Detailansicht der Stele aus Abb. 4.9. Die Perizykelzellen (*) umgeben die Zellen der Stele mit Phloem- (phl), Procambium- (pc) Protoxylem- (pxy) und Metaxylemzellen (mxy). Unterschiedliche Fluoreszenzintensität deutet auf unterschiedliche Dicken der Zellwände hin. (B) Am Übergang zwischen zwei Epidermiszellen, ist die Doppelwandigkeit der Zellwände erkennbar. (C-D) Auftragung von Intensitätsmessung zwischen i-iii (orthogonal zur Struktur). (C) Die dreidimensionalen Auftragung zeigt die Trennung der beiden Intensitätspeaks (Doppelwand) in den meisten Bereichen. (D) Die Peaks sind in der Aufsicht bei (iii) noch deutlich, bei (ii) gerade noch zu trennen und bei (i) nicht mehr voneinander trennbar. (E) Die Auftragung der Gaußanpassung von (i,ii,iii) zeigt die Abstände der Peaks. In (i) ist lediglich das FWHM des Einzelpeaks bestimmbar. Der bestimmbare Minimalabstand zweier Zellwände in allen Wurzelschnitten betrug 100 nm ($n=50$). Dieser Wert entspricht nicht dem realen Minimalwert des Abstands der Zellwände, kann aber eine und nicht dem Auflösungslimit der SIM, sondern ist auf bildgebende Begrenzungen der SIM zurückzuführen. Maßstabsbalken= 10 (A)/1 (B) μm

Die Auswertung der Zellwanddicken und Abstände (s. Abb. 4.11) wurde an mehreren Abbildungen durchgeführt. Zum einen wurde der Abstand zwischen voneinander getrennten Zellwänden analysiert und ergab ein min. von 99 ± 8 nm. Zum anderen wurde das FWHM einzeln dargestellter Zellwände (auch zwischen Übergängen von Einzelzellen, welche nicht als Doppelwand abgebildet wurden) vermessen. Somit erhält man die Zellwanddicken einzelner Wurzelzellen als auch die Dicke zwischen verschiedenen Wurzelzellen (s. Abb. 4.11). Die Dicke der Zellwände nimmt dabei von Epidermis (außen: 109 ± 9 nm/innen: 94 ± 4 nm) nach innen hin über Kortex (99 ± 7 nm), Endodermis (88 ± 5 nm) und Perizykel (77 ± 2 nm) immer weiter ab. Die Zellwände von Phloem und Protoxylem waren mit 146 ± 25 nm beziehungsweise 140 ± 21 nm stark verdickt. Die Zellwände von Metaxylem sind dagegen mit 78 ± 2 nm sehr dünn, die von Procambiumzellen mit 90 ± 3 nm im mittleren Bereich. Die Übergänge von Epidermis/Kortex (115 ± 14 nm), Perizykel/Protoxylem (116 ± 17 nm) und Phloem/Procambium (112 ± 9 nm) waren leicht verdickt. Perizykel/Phloem (130 ± 17 nm), Phloem/Phloem (148 ± 27 nm) und besonders Procambium/Protoxylem (174 ± 36 nm) waren stark verdickt. Alle weiteren Übergänge waren zwischen 75-95 nm ($n_{\min}=10$; angegeben ist der mittlere Standardfehler). Die Dimensionen der Zellwände liegen mit ± 100 nm in diesem Entwicklungsstadium der Wurzel im erwarteten Bereich [160]. Mittles SIM lassen sich bereits in diesem Entwicklungsstadium die Zellwanddicken der *At*-Wurzel sehr differenziert bestimmen.

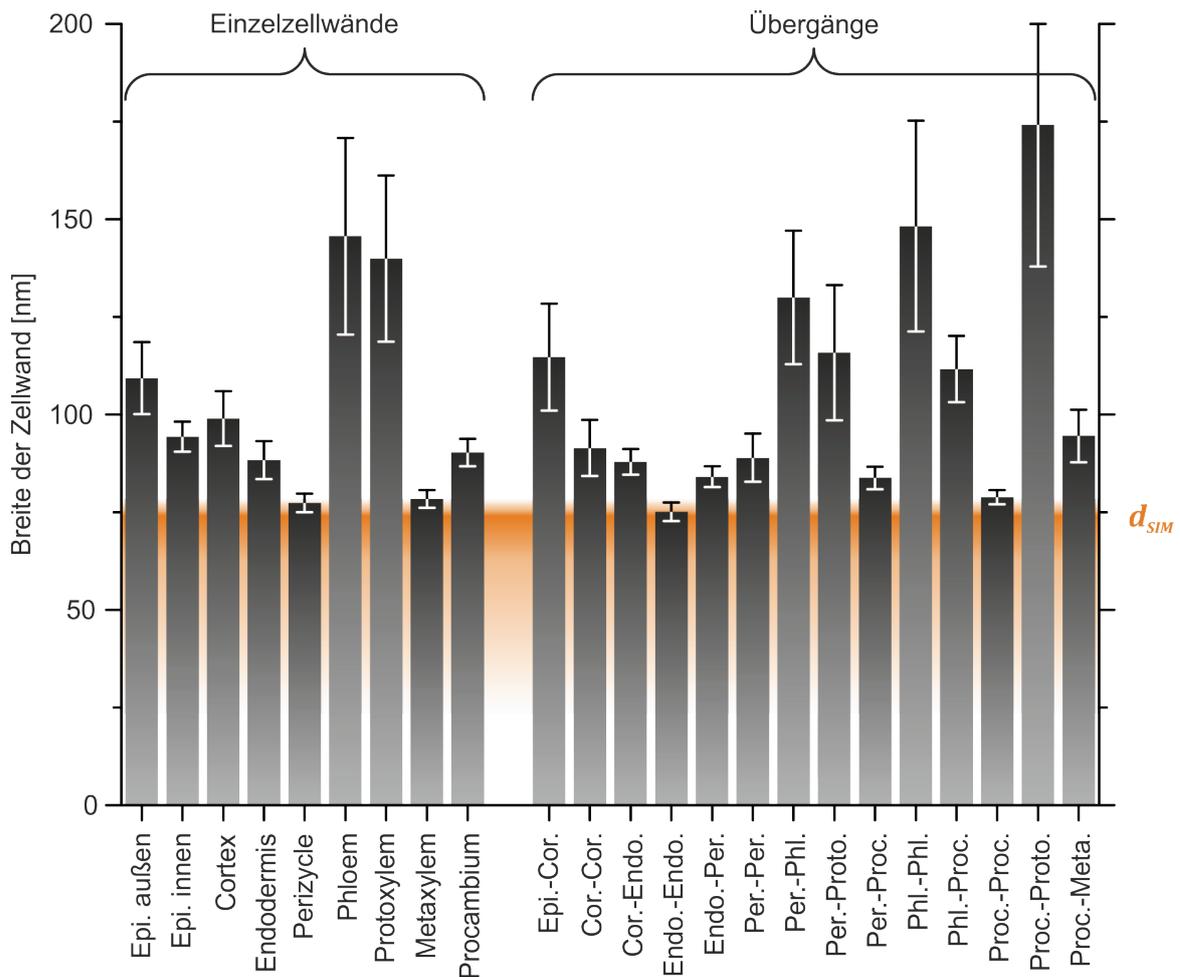


Abb. 4.11: Zellspezifische Analyse der Zellwanddicke von *At*-Wurzelzellen im Bereich des Basalmeristems anhand von SIM-Aufnahmen. Es wurden die verschiedenen Zellwanddicken zum einen von Einzelzellwänden und zum anderen von Übergängen der verschiedenen Wurzelzellen, bei welchen keine Doppelzellwände vermessen werden konnten, bestimmt. Betrachtet man die Zellwanddicken der Einzelzellwände, so nehmen diese von außen (Epidermis) nach innen (Perizykel) immer weiter ab. Die Leitgefäße sind dagegen stark verdickt. Das wesentlich dünnere Metaxylem entwickelt und verdickt sich erst später (im Vergleich zum Protoxylem). Dicke Zellwände bieten Stabilität (beispielsweise Leitgefäße, Epidermis), dünne und naheliegende erleichtern beispielsweise den symplastischen Transport (Perizykel: Beladung des Xylems) oder sorgen für die Unterbindung des apoplastischen Transports (Endodermis-Endodermis: Casparischer Streifen verhindert den apoplastischen Transport). Dagegen ermöglichen weiter auseinanderliegende Zellwände einen sehr effektiven apoplastischen Transport (Epidermis-Cortex). Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 405$ nm beträgt das Auflösungsvermögen der SIM $d_{SIM} = 74$ nm. Das Auflösungslimit konnte mit einigen Strukturen genau erreicht werden, weshalb sich ein solcher Wurzelquerschnitt hervorragend als Modellstruktur für die SIM eignet.

Die Färbung mit CFW von Pflanzenproben, welche in LR-White eingebettet sind, ist umfassend und bietet eine sehr gute Möglichkeit um assoziierte Proteine, das Cytoskelett, das Cytosol oder Strukturen, wie die Plasmamembran, etc. bei mikroskopischen Studien in einen Kontext zu bringen. Eine zusätzliche Immunfärbung der 100 nm dicken Gewebsschnitte und *Array tomography* [109] bieten die Möglichkeit, eine Pflanzenstruktur dreidimensional hochaufgelöst darzustellen. Außerdem kann aufgrund der Ultradünnschnitte von einem sehr geringen Hintergrundsignal profitiert werden. Die mit CFW gefärbten Wurzelquerschnitte können zudem als Modellstruktur für hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie-Applikationen herangezogen werden, da die grundlegende Struktur des Gewebes/der Zelle durch die Anfärbung der Zellwände sich einfacher (zusammenhängende Linien) zuordnen lässt und/oder zum größten Teil bekannt ist.

Bei Strukturen, welche mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen nicht mehr sichtbar gemacht werden können, bietet die SIM eine Möglichkeit der hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie. Deshalb wird hier das Auflösungspotential der SIM thematisiert.

Die Verteilung der Intensität eines Beugungsscheibchens eines Fluorophors kann anhand einer gaussförmigen Anpassung und der Bestimmung des FWHM nur näherungsweise beschrieben werden. Das Rayleigh Kriterium, welches das Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie beschreibt, muss daher bei einer theoretischen Bestimmung mit dem FWHM von $d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$ angepasst werden und mit $d_{FWHM} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA}$ berechnet werden [53]. Berechnet man das Auflösungsvermögen d_{SIM} eines SIM Mikroskops, welches die Auflösung der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ($d_{konv.}$) halbieren kann [71], anhand des FWHM einer punktförmigen Lichtquelle, welche mit einer Wellenlänge von $\lambda_{exc} = 405$ nm angeregt und mit einem Ölimersionsobjektiv mit der Numerischen Apertur von $NA = 1,4$ aufgenommen wurde, mit $d_{SIM} = \frac{d_{konv.}}{2} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{2 \cdot NA}$, erhält man ein FWHM von 74 nm.

Die Zellwanddicke nimmt von außen nach innen, abgesehen von wenigen verdickten Zellwänden in der Stele, immer weiter ab. Im Kontext der Wurzelstatik, dem Energiehaushalt und zum Schutz vor äußeren Einflüssen ist dies sehr effizient [22]. Einzelne Zellwände konnten mit einem Minimalwert von 75 nm vermessen werden, was dem Auflösungsvermögen der SIM-Mikroskopie bei dieser Wellenlänge entspricht [71]. Ob diese am Auflösungslimit vermessenen Zellwände wesentlich dünner gestaltet sind als dargestellt (75 nm) ist nicht eindeutig feststellbar. Die extrem geringen Fehlerwerte dieser Minimalwerte deuten aber darauf hin, dass das Auflösungslimit erreicht war und keine Varianz der Werte mehr aufgezeichnet werden konnte. Das bedeutet, dass anhand der vermessenen Zellwände das Auflösungsvermögen des verwendeten SIM-Mikroskops bestimmt werden konnte. Dünnere Zellwände, wären aufgrund des erreichten Auflösungslimits ebenfalls als ± 75 nm dicke Strukturen dargestellt worden.

Hier konnten noch einzeln dargestellte Zellwände mit einem Abstand von ~ 100 nm vermessen werden. Dieser Wert liegt etwas oberhalb des Auflösungslimit und ist auf die Überlagerung der einzelnen Peaks und das Signal/Rausch-Verhältnis zurückzuführen. Da die Übergänge zwischen zwei Zellen, welche nicht mehr voneinander getrennt dargestellt werden konnten, vergleichbare Zellwanddicken lieferten wie die Einzelzellwände, ist anzunehmen, dass die Pflanze explizit in Bereichen, bei welchen die Einzelzellen sehr nahe beieinanderliegen, die jeweiligen Zellwände verhältnismäßig dünner gestaltet. Dies ist ebenfalls in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von Zellwänden sichtbar [161, 162]. Der symplastische Nährstofftransport von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata könnte dadurch vereinfacht werden. Auf der anderen Seite sind auch gezielte Verdickungen der Zellwände und die Generierung von Hohlräumen zwischen den Einzelzellen erkennbar. Spezifische Verdickungen der Zellwände, insbesondere der Leitgefäße, sind bereits bekannt und liegen dem hohen hydrostatischen Druck innerhalb dieser Gefäße zugrunde [163]. Die massive Verdickung der Leitgefäße (Xylem und Phloem) in diesem Entwicklungsstadium ist nichtsdestotrotz in diesem Ausmaß überraschend. Das Metaxylem entwickelt sich erst nach dem Protoxylem, was der Grund für die signifikant dünneren Wandstärken im Metaxylem sein könnte [164].

Die SIM ist eine hochauflösende Mikroskopietechnik die für pflanzenspezifische Fragestellungen sehr gut anwendbar ist. Die Verwendung konventioneller Färbemethoden, sowie die Nutzung aller erhältlichen Fluorophore, auch alle translationalen Markierungsmethoden sind ein großer Vorteil. Die verhältnismäßig einfache Umsetzung von Multifarben-Aufnahmen macht die SIM außerordentlich vielseitig einsetzbar. Die hier bestimmte Auflösungsgrenze von ~ 75 nm ist eine signifikante Verbesserung zur CLSM und ermöglicht differenziertere Erkenntnisse. Insbesondere die subzelluläre Verteilung von Proteinen kann somit mittels SIM wesentlich präziser analysiert werden. Aufwendige Antikörperfärbungen mit Immunogold bei der Elektronenmikroskopie sind hinlänglich und die Messungen können meist im nativen, sogar lebenden Gewebe durchgeführt werden.

***d*STORM von MT in der *At*-Wurzel**

Vergleicht man das Auflösungsvermögen der beiden Weitfeldmikroskopietechniken SIM und *d*STORM, so verfügt *d*STORM über das Potential, eine Größenordnung höher auflösen zu können als SIM und dies unabhängig von der applizierten Anregungswellenlänge. Dabei kann eine Auflösung von ~ 20 nm erreicht werden [45]. Aufgrund der Einzelmoleküllokalisation wird gleichzeitig ein statistischer Datensatz erhoben, welcher zusätzliche Informationen beinhaltet. Die Erhebung von Daten mittels *d*STORM ist jedoch komplex [165]. Die Qualität eines *d*STORM Bildes ist unter anderem von der Helligkeit des Fluorophors und dem Signal-Rausch-Verhältnis abhängig (s. Kapitel 1.2 „Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie durch die Lokalisation einzelner

fluoreszierender Moleküle“), weshalb sie direkt an die Auswahl der Probe und die Probenpräparation gebunden ist. Dies wird beispielsweise durch die Verwendung der Beleuchtung im TIRF-Modus beeinflusst. Zusätzlich wird versucht, bei der Probenpräparation die Autofluoreszenz des Gewebes nach Möglichkeit zu reduzieren [166, 167]. Welches Potential in der dSTORM liegt und welche Probleme im Speziellen bei der Anwendung im Pflanzengewebe auftreten können, soll in diesem Kapitel evaluiert werden.

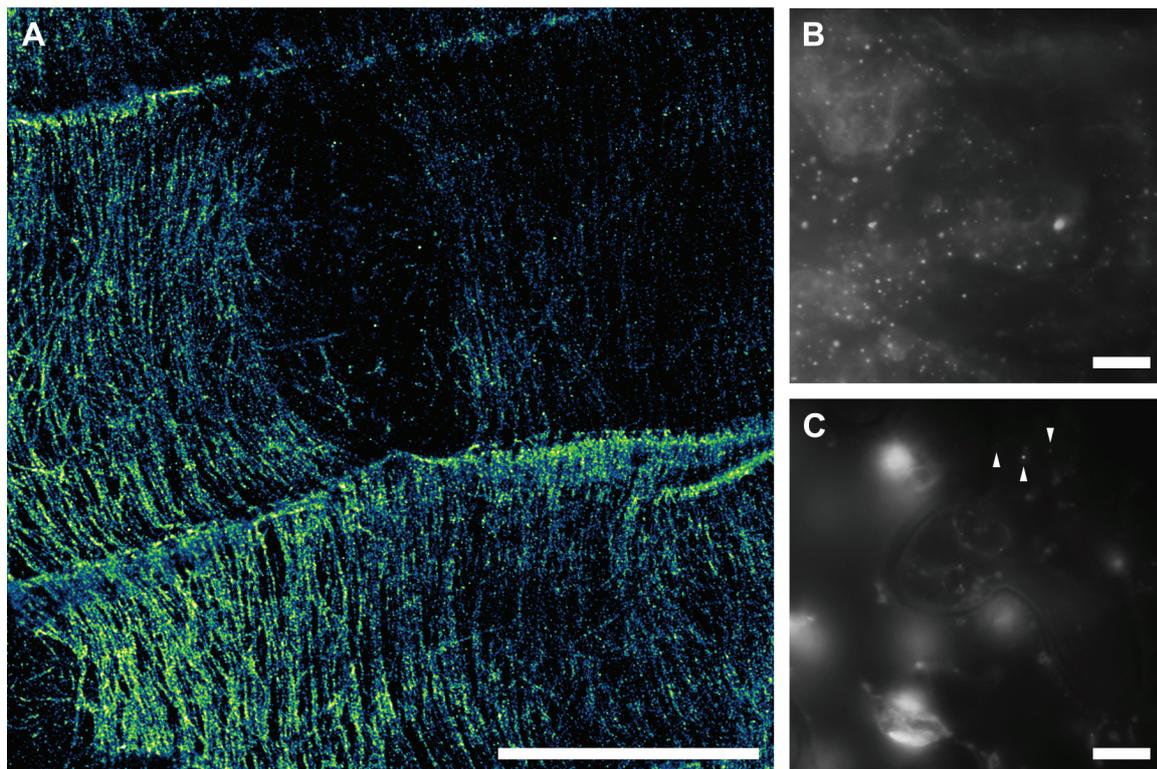


Abb. 4.12: dSTORM-Aufnahme von MT in *At*-Wurzelzellen und lokalisationmikroskopische Probleme in Pflanzengewebe. (A) Die Immunfärbung von α -Tubulin und die lokalisationmikroskopische Darstellung von pflanzlichen MT in Wurzelepidermiszellen ist mittels dSTORM möglich. Die filamentöse Struktur ist dabei gut auflösbar. Jedoch sind die Anwendungsmöglichkeiten von dSTORM im pflanzlichen Gewebe begrenzt (auf beispielsweise Wurzeln) (B-C) dSTORM-Aufnahmen in Blattepidermiszellen. (B) Die Kutikula generiert ein Hintergrundfluoreszenzsignal, welches lokalisationmikroskopische Aufnahmen bei der hier durchgeführten Probenpräparation unmöglich macht. (C) Zudem ist im Blattmaterial die Autofluoreszenz des Chlorophylls so hell, dass auch hier artefaktfreie, lokalisationbasierte Aufnahmen nur bedingt möglich sind, was die Verwendung eines heterologen Expressionssystems oder anderen hochauflösenden Mikroskopietechniken für bestimmte Fragestellungen induziert. Maßstabsbalken= 10 μ m.

Für die *d*STORM Aufnahmen aus Abb. 4.12 A) wurden *At*-Setzlinge verwendet. Mit Hilfe einer Immunfärbung wurde α -Tubulin in Wurzelepidermiszellen mit Alexa647 gefärbt. Es sind Teile von zwei Wurzelzellen sichtbar, in deren Bereich MT Einzelstränge sichtbar sind. Diese verlaufen größtenteils orthogonal zur Wachstumsrichtung der Wurzel. Die Breite einzelner MT-Stränge ist 67 ± 4 nm (FWHM). Die relative Entfernung der einzelnen MT-Stränge zueinander ist in beiden Zellen sehr gering, weshalb nur wenige MT getrennt voneinander abgebildet sind. Die Übergänge der Einzelzellen sind anhand extrem dichter Fluoreszenzbereiche erkennbar.

In B) und C) sind Fluoreszenz-Einzelbilder einer *d*STORM Aufnahme gezeigt. Hierbei sind *Nb*-Blattepidermiszellen dargestellt. Die in B) gezeigten Epidermiszellen wurden lediglich mit FA fixiert und nicht zusätzlich gefärbt. Die Probe in C) wurde transient mit tS-SLAH3 transfiziert und tS wurde zusätzlich mit Hilfe einer Immunfärbung mit Alexa647 markiert. Beide Blattstücke wurden dabei flachliegend auf einem Deckglas positioniert. In beiden Bildern ist ein sehr starkes, unspezifisches Fluoreszenzsignal zu erkennen. Die Aufnahme in B) wurde im Bereich zwischen Epidermis und Kutikula aufgenommen. Es sind Beugungsscheibchen von fluoreszenten Strukturen erkennbar, welche mit dem Fluoreszenzsignal eines einzelnen Fluorophoren vergleichbar sind. In dieser Probe wurden jedoch keinerlei Fluorophore eingebracht. Die leuchtenden punktförmigen Strukturen waren über einen Zeitraum von ~ 20 min fluoreszent, wobei sich die Intensität über diesen Zeitraum nur wenig verringerte. In C) ist unterhalb der Fokalebene ein diffuses Fluoreszenzsignal zu erkennen, im Mittelbereich zeichnet sich der Umriss einer Epidermiszelle ab, es sind einige undefinierbare fluoreszente Strukturen in der Fokalebene und wenige Beugungsscheibchen zu erkennen. Die meisten sind jedoch aufgrund eines sehr schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses kaum erkennbar. Die Strukturen aus B) sind hier nicht sichtbar, da sie vom Hintergrundsignal überstrahlt werden.

Die Applikationsmöglichkeiten von *d*STORM sind umfassend und vielseitig in tierischen Expressionssystemen erprobt [168, 169]. Im Verhältnis hierzu wurden bisher nur wenig pflanzenspezifischen Untersuchungen mittels *d*STORM durchgeführt, beziehungsweise ist nur wenig publiziert [35]. Lediglich die Architektur von Cellulose-Mikrofibrillen [170] und die Organisation von MT in den verschiedenen Wurzelzellgruppen [104] wurde bisher mittels *d*STORM analysiert. Betrachtet man Abb. 4.12 A), konnte auch hier als Vorversuch die MT-Struktur in Wurzelepidermiszellen dargestellt werden. Dabei konnte eine Übersicht der MT-Zytoskelettstruktur dargestellt werden. Die Auflösung von ~ 70 nm ist jedoch unterdurchschnittlich, da ~ 20 nm möglich sind [45] und 20-40 nm bereits in Pflanzen-wurzeln gezeigt werden konnten [104]. Mikrotubuli stellen aufgrund ihres filamentösen Netzwerks und einem Durchmesser von ~ 20 nm [171] eine perfekte Modellstruktur für die Qualitätsanalyse von *d*STORM-Aufnahmen dar. Der Ausschluss von Lokalisations-artefakten ist fundamental für Messungen von unbekanntem

Proteinverteilungen mit *d*STORM [112]. Deshalb wird in B) und C) deutlich, dass die Anwendung von lokalisationsmikroskopischen Messtechniken an Blattepidermiszellen schwierig ist. Im Gegensatz zu Blattgewebe ist Wurzelgewebe immer chloroplastenfrei, was zu einer erheblich geringeren Hintergrundfluoreszenz führt (s. C)). Bekannte Modellstrukturen (wie beispielsweise MT), bei welchen der strukturelle Verlauf klar und bekannt ist, konnten reproduziert werden. Jedoch kann bei einem Membranprotein mit unbekannter Verteilung keine eindeutige Aussage bezüglich Lokalisation oder gar Quantifizierung der Proteinanzahl getroffen werden. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass die in B) sichtbaren Beugungsscheibchen einzelnen Fluorophoren gleichen, aber tatsächlich von der Autofluoreszenz der Chloroplasten herrühren. Bei der Lokalisationsmikroskopie werden genau diese lokalisiert und ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. Artefaktfreie *d*STORM-Aufnahmen sind in einer solchen Probe nicht möglich. Sicherlich gibt es Probenpräparationsschritte, wodurch diese unspezifische Fluoreszenz minimiert oder verhindert werden kann. Die Versuche und Kontrollen zur Etablierung eines solchen Protokolls sind umfangreich und wurden in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Die Umgehung dieser Problematik könnte durch die Verwendung eines heterologen Expressionssystems oder durch die Anwendung von ExM möglich werden. In Säugerzellen (z. B. HEK 293, COS7) ist die Lokalisationsmikroskopie wie PALM und *d*STORM sehr gut etabliert. Deshalb wurden für weitere Versuche entsprechende Expressionssysteme verwendet (s. Kapitel 4.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der pflanzlichen Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie mittels Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie), welche neben den oben genannten Vorteilen zusätzlich die Möglichkeit bieten, unabhängig von störenden, endogenen Faktoren das Funktionsprinzip pflanzlicher Membranproteine zu untersuchen.

Expansionsmikroskopie von Pflanzengewebe

Die ExM [144] bietet weitreichende Möglichkeiten für lichtmikroskopische Anwendungen. Hier wurde die Anwendbarkeit von ExM im intakten Pflanzengewebe untersucht. Maßgebliche Veränderungen im Vergleich zu bisher bekannten und angewendeten Präparationsprotokollen (s. Kapitel 1.2 Grundlagen der Expansionsmikroskopie), wurden bei der Homogenisierung der Probe durchgeführt. Hierbei wurden zellwandverdauende Enzyme eingesetzt.

Expansionsmikroskopische Untersuchung ganzer *At*-Setzlinge

Die in Abb. 4.13 und Abb. 4.14 gezeigten Daten wurden von Patrick Eiring unter Beaufsichtigung des Autors erhoben und gemeinsam ausgewertet.

Für die in Abb. 4.13 gezeigten Daten wurden intakte *At*-Setzlinge expandiert (A - C)). Die Setzlinge waren zwischen 5-10 Tage alt und die ersten beiden Blattpaare bereits ausgebildet. Die Probe wurde, abgesehen von den Standardmethoden, zur Probenpräparation für ExM zusätzlich für 16 h mit Cellulase und Macerozymen verdaut. Die

Probe wurde in A) und B) vorerst nicht zusätzlich gefärbt, es wurde die Autofluoreszenz des Chlorophylls genutzt. Die Aufnahmen wurden mit einem 10x-Objektiv aufgenommen und ermöglichen einen sehr guten Überblick über das Pflanzengewebe. In A) ist der eingebettete Setzling vor der Expansion zu erkennen. Der Bildausschnitt befindet sich im Bereich des Hypokotyls und ist durch die rote Chlorophyllfluoreszenz markiert. Im unteren Bereich sind Einzelzellen zu erkennen, welche durch die ringförmige Anordnung der Chloroplasten im Zellinneren umrissen werden. Einzelne Chloroplasten sind nicht zu definieren, auch sonst sind kaum kleinere Strukturen erkennbar. In einigen Bereichen (beispielsweise Blatt) ist die Chlorophyllfluoreszenz überbelichtet. Für die Aufnahme in B) wurden alle Messparameter belassen, lediglich die Probe wurde in ddH₂O expandiert. Nun sind in nahezu allen Bereichen die Chloroplasten vereinzelt als punktförmige Strukturen aufgelöst, wodurch auch in sehr dichten Bereichen Einzelzellen voneinander trennbar sind. Auffällig ist ebenfalls, dass nahezu keine Bereiche mehr überbelichtet sind. Der Querschnitt am Grund des ersten Blattpaares ist um den Faktor ~ 3 vergrößert (\leftrightarrow). Das Gewebe erscheint intakt und homogen expandiert. Diese Probe wurde nach Expansion noch mit CFW gefärbt und nochmals (C)) aufgenommen. Nun sind zusätzlich die Zellwände markiert. Die Umrisse der Einzelzellen mit den innenliegenden Chloroplasten sind nun sichtbar. Trotz des Zellwandverbaus ist die Färbung der Zellwand möglich. Maßstabsbalken= 500 μ m.

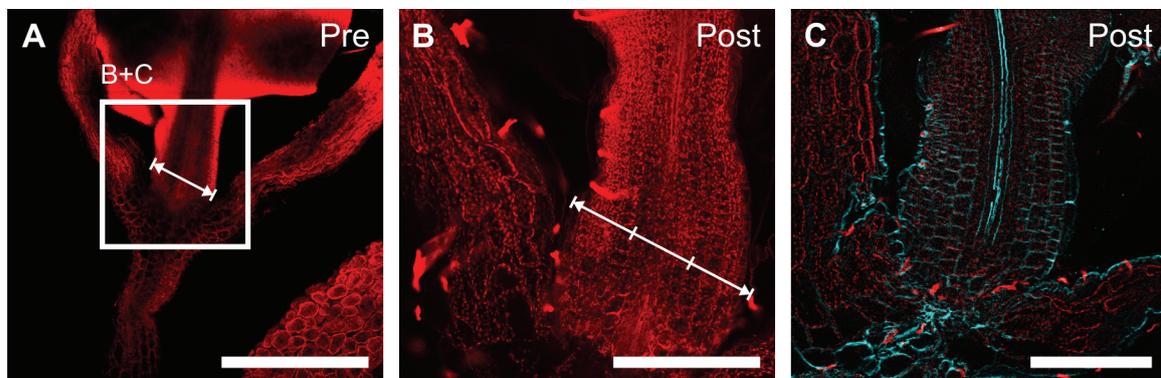


Abb. 4.13: ExM von *At*-Setzlingen vor und nach Expansion. Die Proben wurden mittels enzymatischem Verdau homogenisiert. CLSM-Aufnahmen der Chlorophyllfluoreszenz (rot) eines (A) in das Gel eingebetteten, aber unexpandierten *At*-Setzlings (Pre expansion), und (B) die expandierte (Post Expansion) Pflanzenprobe. Der Spross konnte um den Faktor ~ 3 expandiert werden (\leftrightarrow). (C) Die zusätzliche Färbung mit CFW (cyan) zeigt den unvollständigen Verdau der Zellwandstruktur des Präparats, nichtsdestotrotz ist die Expansion augenscheinlich homogen. Maßstabsbalken= 500 μ m.

Strukturelle ExM-Analyse von Chloroplasten in *AT*-Setzlingen

Im weiteren Verlauf wurden in den *At*-Stzlingen Chloroplasten mit einem 63x-Objektiv aufgenommen und vermessen. Chloroplasten sind meist linsenförmig, ~5-8 μm lang und 3-4 μm dick. Der Chlorophyll-beinhaltende Photosynthese-Apparat befindet sich im Stroma des Chloroplasten und wird aus dem ausgedehnten Thylakoid-Membran-Systems gebildet. Dieses Membransystem ist zusammenhängend und bildet sogenannte Thylakoid-Grana aus. Thylakoid-Grana sind übereinandergestapelte flache Membranscheiben, welche in der Aufsicht als kreisförmige Strukturen abgebildet werden. Die Größe der Grana variiert dabei gewaltig mit 15 x 30 nm bis 15 x 435 nm [172].

In Abb. 4.14 D) erkennt man einzelne, bereits eingebettete aber nicht expandierte Chloroplasten, welche ein homogenes Fluoreszenzsignal emittieren. In E) wurde die Probe expandiert, jedoch war es nicht möglich, den identischen Ausschnitt nochmals aufzunehmen. Innerhalb der gezeigten Chloroplasten beziehungsweise deren Fluoreszenzsignal sind nun kleinere punktförmige Strukturen sichtbar. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um die Thylakoid Grana [172-175]. Zur Bestimmung eines Expansionsfaktors (3,1x) wurden die Durchmesser von Chloroplasten vor ($4,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$; $n=10$) und nach Expansion ($13 \pm 1,2 \mu\text{m}$; $n=20$) gemessen und in F) aufgetragen. Hierbei wurde immer die längere Seite gemessen. Vergleicht man die Auftragung der Intensität entlang einer Linie durch einen unexpandierten und expandierten Chloroplasten (G) und H)), wird die Verteilung der Fluoreszenzintensität innerhalb des Chloroplasten deutlicher. Man erkennt die homogene Verteilung über den Chloroplastenquerschnitt in der unexpandierten Probe, wohingegen einzelne Maxima (\blacktriangleleft) im Querschnitt des expandierten Chloroplasten zu sehen sind. Diese Maxima entsprechen den bereits angesprochenen Thylakoid-Grana. Passt man die Maxima mittels einer Gauss-Verteilung an, erhält man ein FWHM und somit einen mittleren Durchmesser der Thylakoid-Grana von $1,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ($n_{\text{Grana}}=70$ aus $n_{\text{Chlp}}=15$). Vergleicht man die Abbildung mit CLSM-Aufnahmen von „Belgio, et al., 2015“ sind die Fluoreszenzbilder direkt vergleichbar. Belgio veranschlagt dabei einen mittleren Durchmesser von <500 nm in Fluoreszenzbildern [176]. Anhand von Elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Thylakoid-Grana lassen sich Werte von 300-400 nm Durchmesser bestimmen [175, 176]. „Austin, et al., 2011“ konnte zeigen, dass die Größe der Grana mit 15 x 30 nm bis 15 x 435 nm gewaltig variiert [172]. Bezieht man den Expansionsfaktor von 3,1x mit ein, ist die Größe der hier vermessenen Grana mit 360 nm ($1,100 \mu\text{m}$ post-Expansion) exakt in diesem Bereich. Zudem besticht die strukturelle Homologie der Abbildungen von „Chuartzman et al., 2008“ [177].

Der y-Achsversatz wurde für die Gaussianpassung auf 10 counts festgesetzt, was dem mittleren Hintergrundfluoreszenzsignal außerhalb der Chloroplasten entsprach. Auffällig ist zudem, dass das Fluoreszenzsignal, bei gleichbleibender Leistungsdichte des Anregungslichts um fast das 1000-fache im Vergleich zur unexpandierten Probe vermindert wurde.

Durch die ersten Versuche konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass expansionsmikroskopische Aufnahmen von Pflanzengewebe möglich sind, wenn die Probe ÜN mit Proteinase-K bei 37 °C und Cellulase/Macerozyme für 16 h bei 37 °C verdaut wurde.

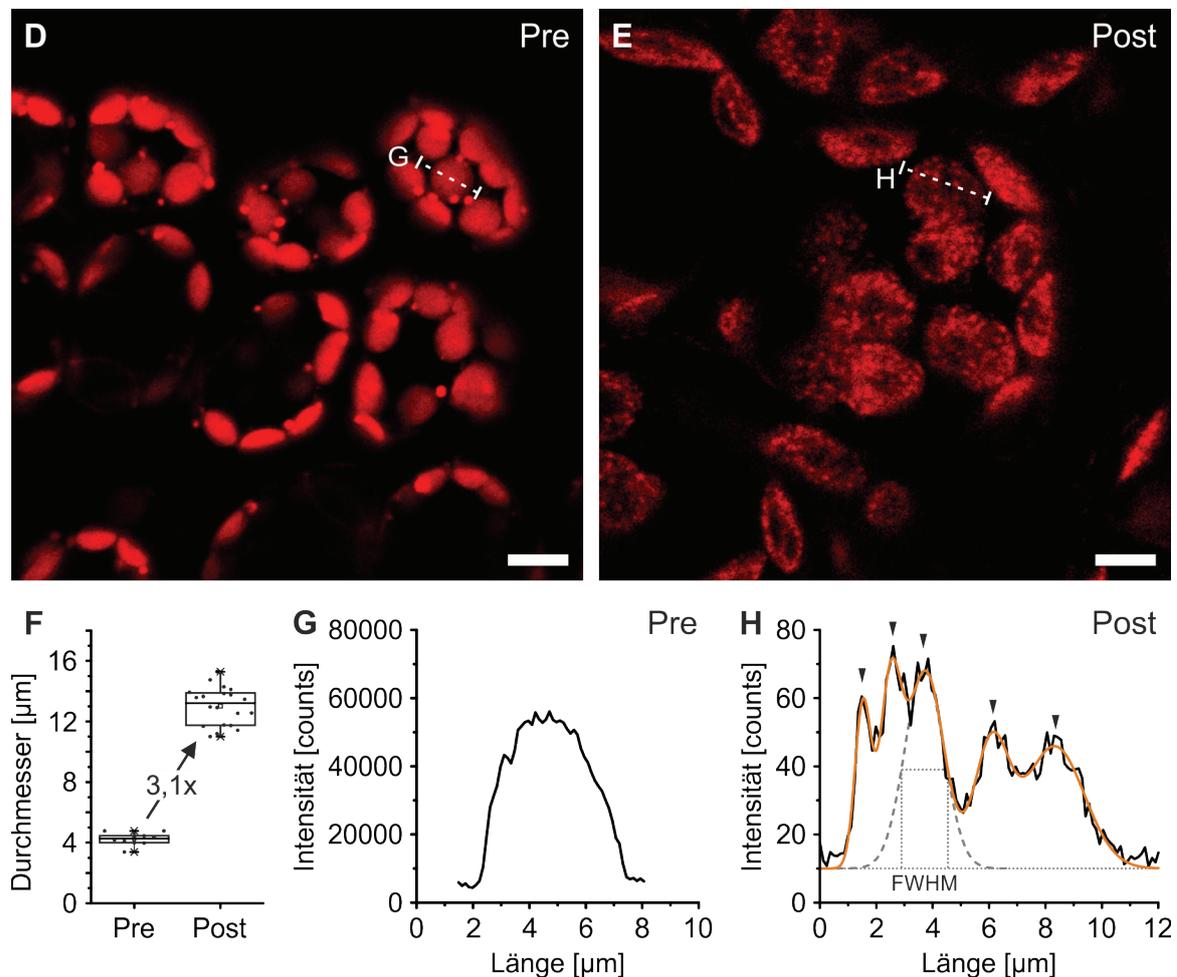


Abb. 4.14: ExM von Chloroplasten. Expansionsfaktorbestimmung und strukturelle Analyse. **(D und E)** Die Darstellung von Chloroplasten vor (Pre) und nach (Post) Expansion ermöglicht die Darstellung der Thylakoid-Grana mit Hilfe der ExM. **(F)** Die Bestimmung und der Vergleich des mittleren Durchmessers von Pre- ($4,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$) und Post-expandeden ($13 \pm 1,2 \mu\text{m}$) Chloroplasten ergibt einen Expansionsfaktor von 3,1x. **(G und H)** Im Intensitäts-Querschnitt beispielhafter Chloroplasten erkennt man den homogenen Querschnitt des unexpandierten und die Einzelpeaks der Thylakoid-Grana (▲) mit einem mittleren Durchmesser (FWHM) von $1,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ($n_{\text{Grana}} = 50$) des expandierten Chloroplasten. Das Fluoreszenzsignal ist bei gleichbleibender Leistungsdichte des Anregungslichts um den Faktor 1000x verkleinert, was sowohl für die Eindringtiefe als auch für die Verminderung des Hintergrundsignals hilfreich ist. Positionierung der Marker: In A) und B) dass in beiden Abbildungen (pre- und post-Expansion) die Struktur ohne Hintergrundsignal vermessen werden und ein möglichst präzises Ergebnis erzielt werden konnte. In D) einen flach liegenden Chloroplasten im Querschnitt. In E) möglichst viele/kontrastreiche Thylakoid-Grana zur Veranschaulichung in H). Maßstabsbalken= 10 µm.

Intaktheitsprüfung und korrekte Expansion von Pflanzengewebe bei ExM-Versuchen

In den weiterführenden Versuchen wurde vom Autor die Intaktheit des Pflanzengewebes spezifischer geprüft, Expansionsprozesse untersucht, unterschiedliche Präparationsprotokolle ausgearbeitet und angewendet und Färbemöglichkeiten erörtert. Verschiedene Beispiele sind hier in Abb. 4.15-Abb. 4.18 gezeigt, bei welchen die MT beider Proben mittels Immunfärbung mit Al488 markiert wurden. Die Proben wurden in ein Gel eingebettet und in zwei Schritten verdaut. Zuerst für 7 h bei 37 °C mit Proteinase-K und danach für 3 d mit Cellulase, Macerozymen und Pectolyase bei RT.

In Abb. 4.15 A) ist ein eingebettetes, aber noch unexpandiertes Blättchen eines *At*-Setzlings gezeigt. Es wurde in diesem Blättchen ein Bereich im Palisadenparenchym ausgewählt und mit einem 25x Wasserobjektiv die Chlorophyllfluoreszenz detektiert. Die Chloroplasten sind vereinzelt, jedoch verhältnismäßig schwach fluoreszierend. Nun wurde die Probe expandiert und derselbe Bereich nochmals aufgenommen (B)). Die Bildbereiche aus der unexpandierten (A₁) und expandierten Probe (B)) zu fusionieren, ist mit der Funktion `bunwarpl` mit Fiji möglich. Dabei wurde die Abbildung des expandierten Blattausschnitts deformiert, um ein möglichst hohes Maß an Kolo-kalisation der beiden Kanäle zu erreichen ($D_1 + E_{\text{deform}}$). Es sind nahezu alle Strukturen in beiden Kanälen sichtbar und kolo-kalisieren, was aufgrund der Überlagerung der beiden Signale nun in weiß sichtbar ist. Eine Kolo-kalisationsanalyse zeigt, dass ~89 % des Signals der beiden Kanäle kolo-kalisieren, das bedeutet im Rückschluss, dass mindestens 89 % der Organellen im expandierten Bild intakt sind. Betrachtet man die Einzelbilder etwas genauer und vergleicht diese, so wird klar, dass manche Bildbereiche in einer etwas anderen Fokalebene liegen, da es nahezu unmöglich war, das expandierte Gel exakt identisch unter dem Mikroskop zu positionieren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Organellen nicht zerstört, sondern lediglich in dieser Messung nicht aufgezeichnet wurden, und der Wert für die Intaktheit der Probe wohl weit über 90 % liegen müsste. Außerdem liegen die Zellen des Palisadenparenchyms (durch die Lage der Chloroplasten angedeutet) weiterhin dicht beieinander, was ein weiteres Indiz für ein hohes Maß an Intaktheit der expandierten Probe ist. Der Expansionsfaktor konnte in dieser Probe auf 2,2x bestimmt werden.

Fusioniert man die beiden Bilder und vergrößert den Bildausschnitt der unexpandierten Probe komplett homogen, so ergeben sich einige Bildbereiche welche schlecht oder gar nicht kolo-kalisieren (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Probe nur zu einem bestimmten Maß homogen expandiert wurde. Dieser Inhomogenitätsfaktor ist sehr schwierig zu bestimmen, da die Probe zum einen dreidimensional expandiert wird und zum anderen für verschiedene Bildbereiche völlig unterschiedlich ist und ein Mittelwert lokale Expansionsartefakte nicht beschreibt. Insbesondere in Pflanzenproben ist die Stabilität der einzelnen Gewebe heterogen mit extrem stabilen Strukturen, wie Zellwand und Leitgefäße, welche einem Turgordruck von mehreren bar standhalten müssen sowie sehr flexiblen Membranstrukturen wie beispielsweise Chloroplasten.

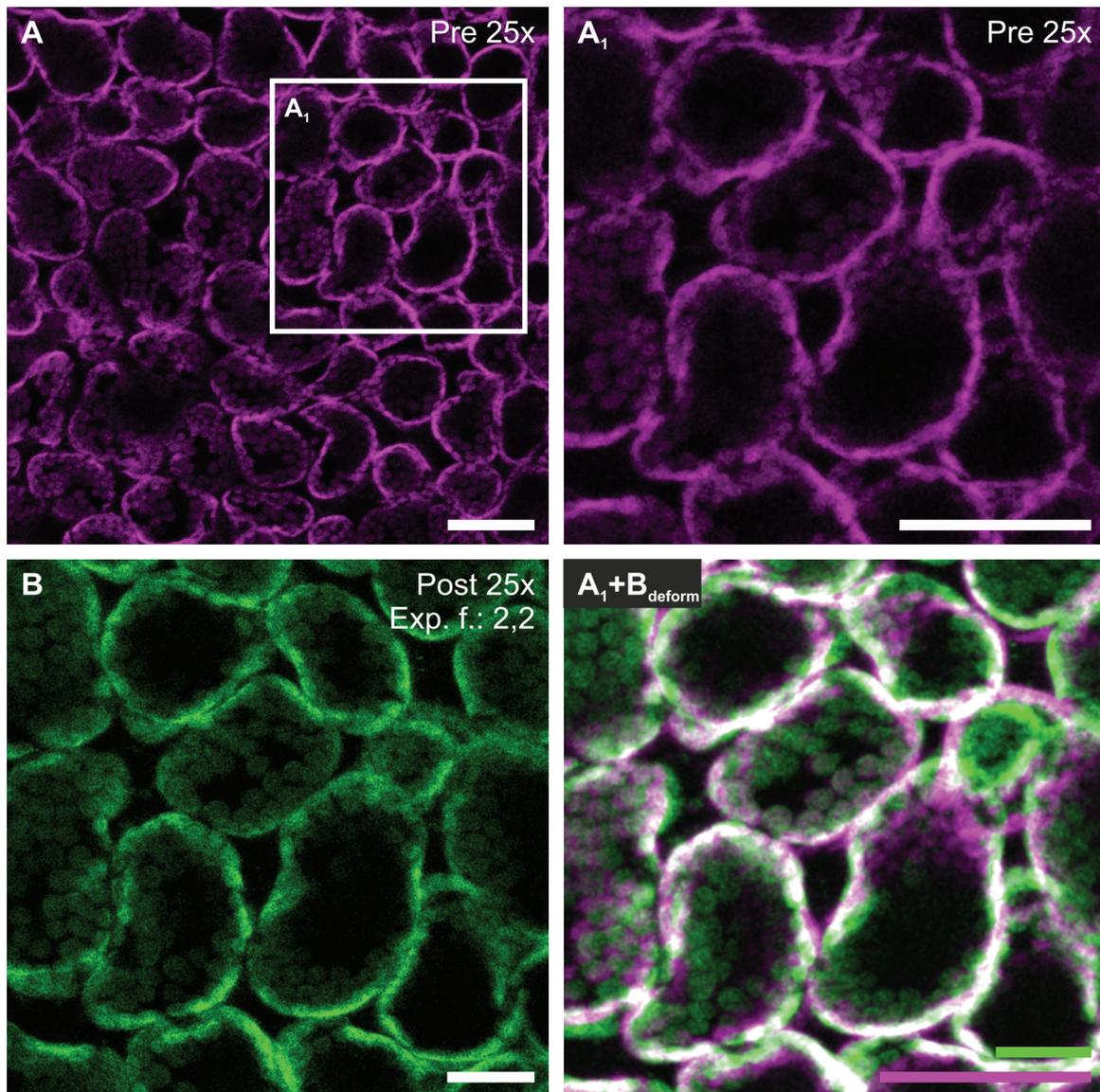


Abb. 4.15: ExM von *At*-Blättern nach Denaturierung und enzymatischem Verdau. CLSM-Aufnahme mit einem 25x Wasserobjektiv der Chlorophyllfluoreszenz (grün/magenta) aus dem Bereich des Palisadenparenchyms des Blattes. **(A)** Das unexpandierte als auch **(B)** das expandierte Blättchen sind intakt, und die für das Palisadenparenchym typische Zellstruktur ist erhalten. **(A₁+B_{deform})** Fusioniert man jedoch den (A₁) Bildbereich der unexpandierten Probe mit (B) der expandierten, muss die Abbildung der expandierten Probe deformiert werden, um eine Passung der beiden Bilder zu generieren (89 % Koloalisation). Der Expansionsfaktor konnte auf 2,2x bestimmt werden und verbleibt unter den Erwartungen (Faktor 4x). Beides spricht für eine inhomogene und unvollständige Expansion der Probe. Maßstabsbalken= 100 μm.

In Abb. 4.16 ist das unexpandierte Blättchen aus Abb. 4.15 nochmals in einer Übersicht zu sehen. Im Durchlicht ist das annähernd farblose Blättchen nur anhand der weiterhin gut sichtbaren Gefäßsysteme erkennbar (A)). Die Färbung der MT ist umfassend im Blattgewebe und man kann beispielsweise das Palisadenparenchym (B)) vom Schwammparenchym unterscheiden (C)). Diese Aufnahmen wurden mit einem 10x Objektiv aufgenommen. In D) und E) sind die Durchlichtbilder der entsprechenden Proben aus Abb. 4.15 A) und B) gezeigt. Die Bildausschnitte sind identisch, nicht jedoch die Fokalebene, weshalb in den Fluoreszenzbildern keine Leitgefäße sichtbar sind. Wie bereits in vorherigen Bildern gezeigt, ist das Leitgewebe sichtbar und durch den Verdau nicht in seine Bestandteile zerlegt. Dies wird deutlich, wenn man die expandierte Probe betrachtet, bei welcher das Gefäßsystem stark rupturiert und nicht homogen expandiert ist. In der gefäßfreien Blattfläche erkennt man bei genauer Betrachtung noch sehr feine Strukturen vor Expansion, welche in der expandierten Probe nicht mehr vorhanden sind (s. hochkontrastierte Bildausschnitte). Betrachtet man das Deformierungsmuster (Abb. 4.16 F)), welches angewendet wurde, um Abb. 4.15 D) und E) zu fusionieren, wird eine über die Blattfläche leicht inhomogene Struktur des Netzes deutlich. Diese ist besonders im Bereich des Gefäßes inhomogen (die Position ist als gestrichelte Linie in der Abbildung angedeutet; die Netzstruktur zeigt sich hier nicht rechtwinklig) und dient in diesem Zusammenhang als Anhaltspunkt für Bereiche, welche inhomogen expandiert wurden und in ExM Versuchen unbedingt gemieden werden sollten oder ein erweitertes Verdauprotokoll unumgänglich machen. Im weiteren Verlauf wurden deshalb ebenfalls Denaturierungsprotokolle untersucht.

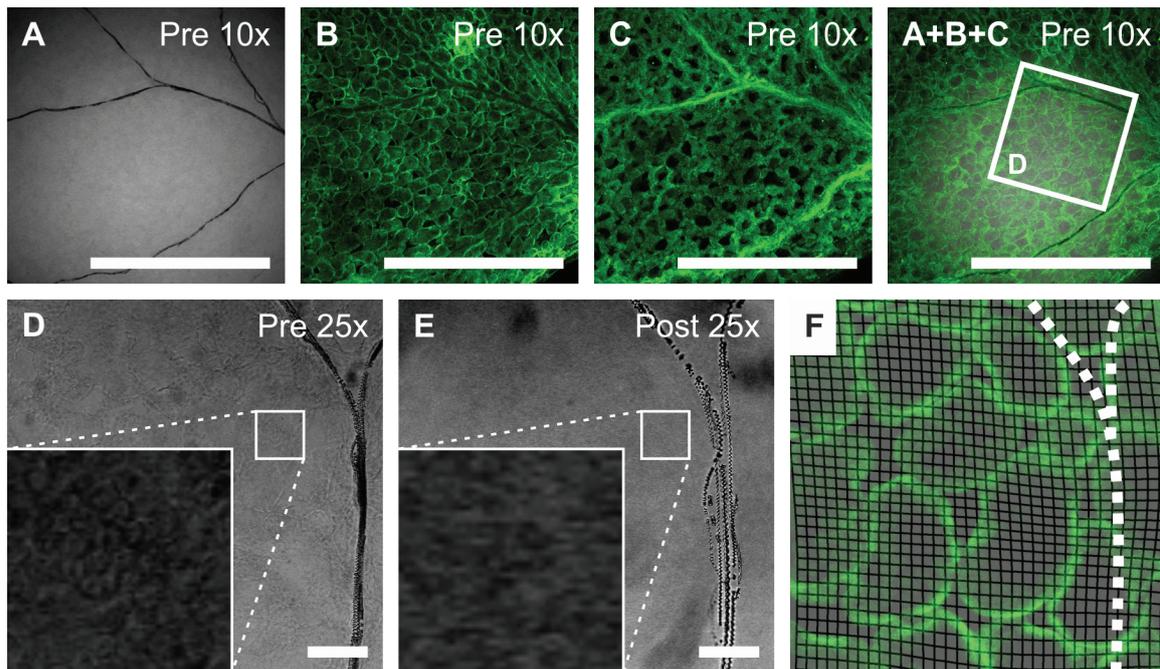


Abb. 4.16: Homogenitätskontrolle der Expansion in der Übersicht des *At*-Blattes. Anhand der Übersicht (10x Objektiv) des Blattes können Expansionsartefakte analysiert werden. **(A)** Die Durchlichtaufnahme und **(B-C)** die CLSM-Aufnahme zweier Ebenen im Blatt des Alexa488 gefärbten α -Tubulins sowie **(A+B+C)** das Fusionsbild der unexpandierten (Pre) Probe zeigen den aufgenommenen Bereich aus Abb. 4.15 (Bildausschnitt D)). Die Färbung ist umfassend, jedoch befindet sich die Aufnahme im Bereich eines Leitgefäßes des Blattes. Die nähere Betrachtung (25x Objektiv) und der Vergleich der **(D)** unexpandierten und **(E)** expandierten Probe zeigt die Rupturierung des Xylems aufgrund von unvollständiger Verdauung der Struktur. Dagegen sind in den neben dem Leitgefäß liegenden Gewebe (s. Bildausschnitte) bei der unexpandierten Probe noch pflanzenspezifische Strukturen erkennbar, welche in der expandierten Probe nicht mehr zu sehen sind. Dieses Gewebe zeichnet sich durch wesentlich weniger Cellulose-Einlagerungen im Vergleich zu den Leitgefäßstrukturen aus. **(F)** Das Deformierungsmuster aus Abb. 4.15 zeigt insbesondere im rechten Bildbereich eine inhomogene Expansion, was an dem darunter liegenden Leitgefäß liegen könnte. Die Position des Gefäßes ist als gestrichelte Linie in der Abbildung angedeutet. Maßstabsbalken= 1 mm(A-C)/100 μ m (D-F).

Neben den Blättern sind die Wurzeln der Pflanzen von großem Interesse für lichtmikroskopische Untersuchungen. Deshalb wurden ExM-Versuche ebenfalls an Wurzelstücken der Wurzelspitze, Wurzelhaarzone und Elongationszone eruiert. In Abb. 4.17 ist die Wurzelspitze dargestellt. Ebenfalls wurde hier Tubulin mit Alexa488 gefärbt und das Gewebe enzymatisch verdaut (s. o.). Im Bereich der Wurzelspitze erkennt man, dass die Färbung nicht überall bis in die Stele reicht (mglw. aufgrund zu kurzer Inkubationszeiten bei den Färbungsschritten), was in diesem Kontext jedoch nicht problematisch war, da so trotzdem die Homogenität der Expansion geprüft und die Intaktheit des Gewebes untersucht werden konnte.

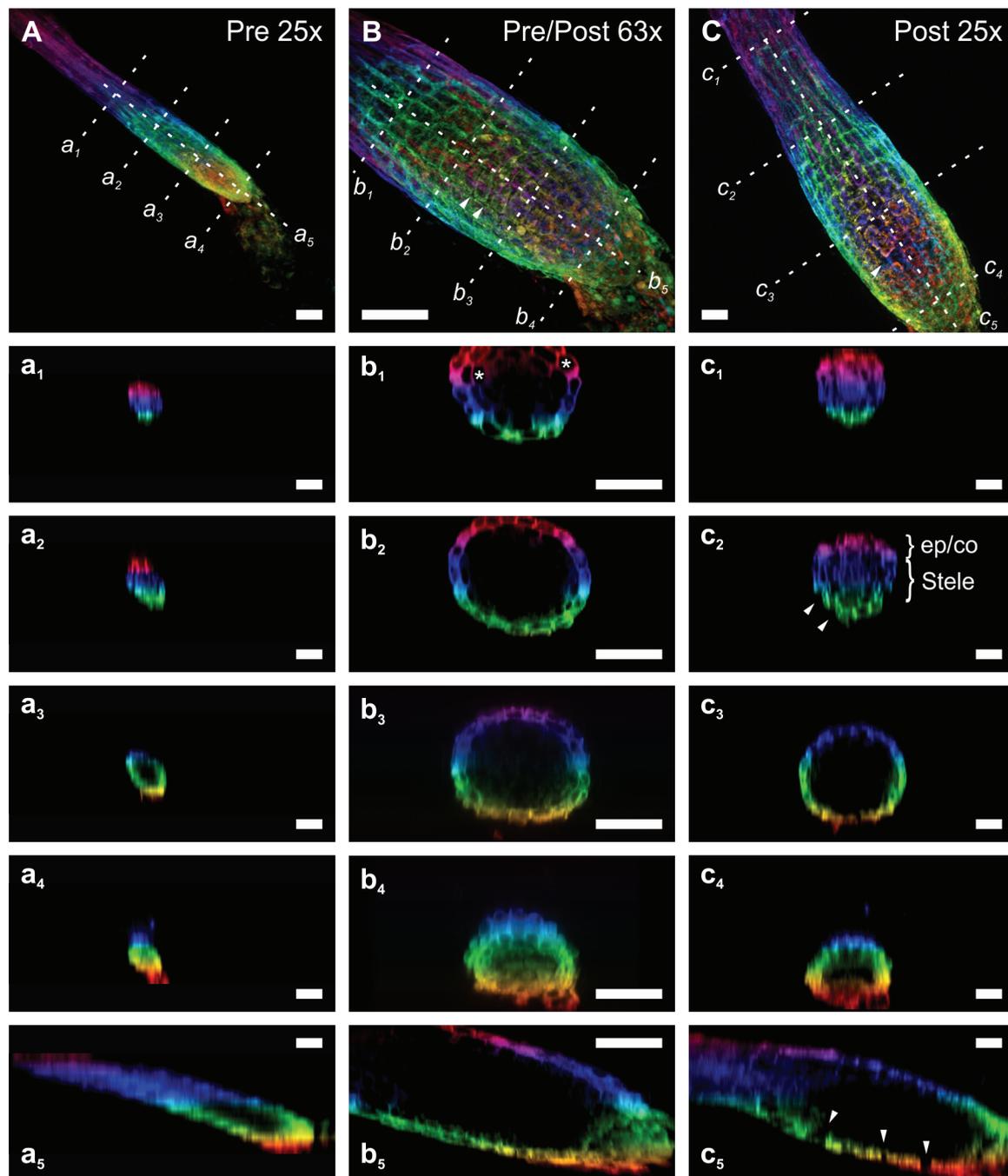


Abb. 4.17: ExM der *At*-Wurzel. CLSM-Z-Sacks des Alexa 488 gefärbten α -Tubulin (Regenbogen (violett-oben/rot-unten)) der *At*-Wurzel. **(A)** Unexpandierte Wurzel (Pre), **(a₁-a₄)** Querschnittsauftragungen und **(a₅)** eine Längsschnittauftragung zeigen die Intaktheit der Wurzel. Es sind keine Zell-/Detailstrukturen erkennbar (25x Objektiv). **(B)** Teilweise expandierte Probe (Pre/Post) und der Einsatz des 63x Objektivs zeigt Einzelzellen der Wurzelspitze. Die Färbung ist zytosolisch lokalisiert (MT gefärbt). Es sind bereits Lücken zwischen Einzelzellen sichtbar (\blacktriangleleft). **(b₁)** In der Querschnittsdarstellung sind die Zelllumina sichtbar (*). **(C)** In der expandierten Probe (Post) **(c₂)** ist der zelluläre Aufbau der Pflanzenwurzel mit Epidermis/Kortex/Steile (ep/co/Steile) nachvollziehbar (25x Objektiv). **(c₅)** Jedoch sind größere Rupturierungen in der Struktur erkennbar (\blacktriangleleft). Maßstabsbalken= (A/C): 50 μ m; (B): 60 μ m.

Da das Fluoreszenzsignal in vielen Bereichen die Einzelzellen der Wurzel umfasst, was den im Zytosol liegenden MT entspricht, kann man davon ausgehen, dass die Färbung spezifisch war. Es ist jedoch keine Fibrillen-Struktur erkennbar. Es sind die gesamten Z-Stapel als Summe dargestellt (A) - C)) sowie aus den Z-Stacks generierte Schnitte: Die Querschnitte (a₁-a₄; b₁-b₄; c₁-c₄) und jeweils einen Längsschnitt auf der Mittellinie der Wurzel (a₅; b₅; c₅). Die Lage der Schnitte ist im obersten Bild angedeutet (----). Die Z-Ebene ist farblich im Lichtspektrum von violett (oben) nach rot (unten) markiert. Die drei Messungen wurden in verschiedenen Expansionsstadien durchgeführt, A) ist unexpandiert und dient als Übersicht. B) zeigt die Probe nach dem ersten Expansions-schritt und ermöglicht erste Analysen für Expansionsartefakte. C) zeigt die expandierte Probe. Hier wurde mit identischen Messparameter wie in A) aufgenommen, somit sind diese beiden Messungen sehr gut miteinander vergleichbar. Dabei wurde auch auf die Vergleichbarkeit der Querschnitte geachtet. Bei grober Übersicht scheinen die Messungen miteinander vergleichbar und das Gewebe weitestgehend intakt. In der unexpandierten Probe sind keinerlei Details oder Einzelzellen erkennbar. Bei der Aufnahme mit dem 63x Objektiv der bereits leicht expandierten Probe (B)) sind dagegen in der Wurzelspitze Einzelzellen erkennbar, die Zellen im Apikalen Meristem sind dabei im Vergleich zu den Zellen des Basalen Meristems/Elongationszone weiter voneinander getrennt (kleine Lücken zwischen den Zellen (◀)). In den Wurzelquerschnitten (c₁) sind ansatzweise die Lumen von einigen Epidermis und Kortexzellen sichtbar (*). Wenn das Lumen sichtbar ist, ist dieses auch geschlossen. Bei der expandierten Probe (C)) sind im Vergleich zur unexpandierten Probe sehr viele Details sichtbar. Im Wurzelquerschnitt kann man funktionelle Gruppen zuordnen, wie Epidermis und Kortexzellen (ep/co), sowie die Stele. Im Wurzelumriss sind jedoch einige Dellen sichtbar (◀). Betrachtet man die Zellen des Apicalen Meristems, sind die Lücken vergrößert, einige Zellen fast voneinander gelöst (◀), im Vergleich zu B). Diese Lücken sind im Längsschnitt anhand der Löcher im Gewebe noch deutlicher zu erkennen (◀). Nun kann man in allen Messungen den Durchmesser und die Länge der Wurzel bestimmen.

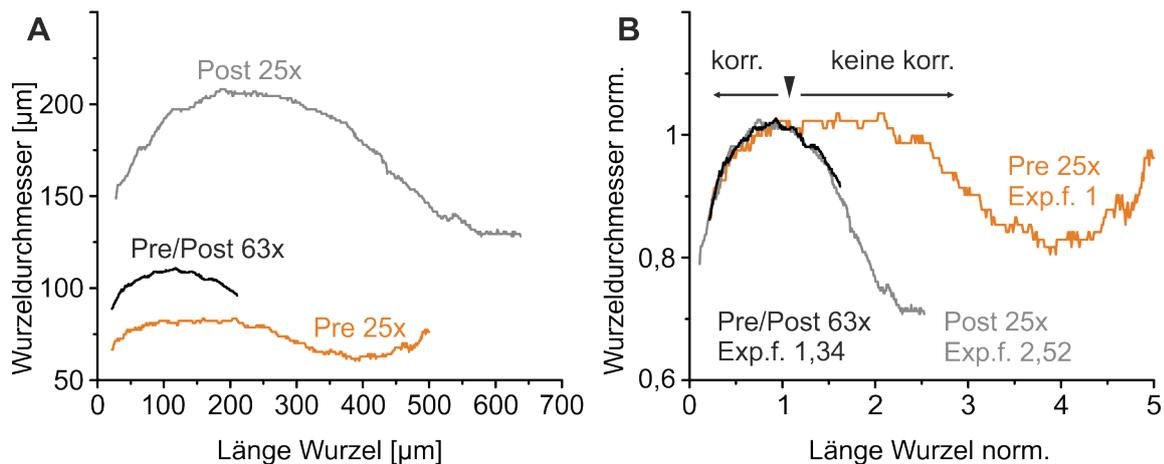


Abb. 4.18: Bestimmung der Expansionsfaktoren und Expansionshomogenitätsanalyse der At-Wurzel. (A) Von den in Abb. 4.17 gezeigten Wurzeln wurde in der Querschnittsauftragung der Durchmesser in Abhängigkeit von der Länge bestimmt. Die unexpandierte Probe (orange, Pre 25x) zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einem Maximaldurchmesser von $\sim 80 \mu\text{m}$ und ist aufgrund des Bildausschnitts auf einer Länge von $500 \mu\text{m}$ dargestellt. Die Aufnahme mit dem 63x Objektiv (schwarz, Pre/Post) ist aufgrund des kleineren Bildausschnitts nur auf einer Länge von $200 \mu\text{m}$ dargestellt. Die Wurzeldurchmesserwerte sind infolge der teilweisen Expansion erhöht (max $\sim 110 \mu\text{m}$). Die vollständig expandierte Wurzelprobe (grau, Post 25x) wurde mit demselben 25x Objektiv wie die unexpandierte Probe aufgenommen und hat einen Maximaldurchmesser von $\sim 210 \mu\text{m}$. **(B)** Die auf den jeweiligen Maximalwert normierten Werte ergeben den Expansionsfaktor 2,52x für die expandierte Probe (1,34x für Pre/Post). In Bereichen des Wurzelmeristems liegen die Graphen noch übereinander (\leftarrow), was jedoch mit Rupturierungen des Zellverbands einherging (s. Abb. 4.17). Am Übergang zur Elongationszone (\blacktriangledown) und dahinter (apikal, \rightarrow) wird das Wurzelgewebe aufgrund erhöhter Cellulose-Einlagerungen nicht mehr vollständig expandiert und die Graphen zeigen verringerte Werte im Vergleich zur unexpandierten Probe. Diese Antikorrelation der Graphen zeigt die inhomogene Expansion der Probe.

Diese Werte sind in Abb. 4.18 A) aufgetragen. Wie zu erwarten, nehmen die Werte von unexpandiert zu expandiert deutlich zu. Normiert man die Werte auf den Maximalwert der unexpandierten Probe, erhält man einen Multiplikationsfaktor, der dem Expansionsfaktor der beiden expandierten Proben entspricht und 1,34x beziehungsweise 2,52x beträgt. Werden diese Werte nun erneut aufgetragen (B)), korrelieren die drei Kurven nur im vorderen Bereich. Die Kurven der beiden expandierten Proben verlaufen in dem aufgezeichneten Bereich fast identisch.

Setzt man nun diese Daten in Kontext, so lässt sich sagen, dass die Expansion ausschließlich bis zum Übergang der Elongationszone (\blacktriangledown ; s. Abb. 4.18 B)) homogen ist. Da aber besonders in diesem Bereich das Gewebe zum Teil zerissen erschien, wurden hier ebenfalls nicht die Einzelzellen homogen expandiert, sondern einfach nur voneinander getrennt. Umso weiter von der Wurzelspitze entfernt, desto weniger wurde das Wurzelgewebe expandiert, was sich anhand der in Abb. 4.18 B) gezeigten Kurven im

hinteren Bereich (Länge der Wurzel: 1,2-5 μm) zeigen lässt. Das Gewebe wird dabei nicht rupturiert, sondern nur unvollständig expandiert, weshalb die Kurve der expandierten Probe weit unterhalb ($\sim 25\%$) der unexpandierten Kurve liegt. Der Anteil und die Stabilität der Zellwand sind in den verschiedenen Wurzelzonen heterogen. Dabei kann man im Prinzip sagen, dass umso weiter eine Wurzelzelle von der Wurzelspitze entfernt ist, desto älter und deshalb stabiler ist die Zellwand [178]. Es ist anzunehmen, dass insbesondere diese Tatsache zu der inhomogenen Expansion der gezeigten Probe führt. Gleichzeitig nimmt die verhältnismäßige Expansion innerhalb der Probe von der Wurzel in Richtung Spross ab. Der logische Rückschluss ist, dass die Probe, insbesondere die Zellwände, durch die enzymatische Behandlung nicht ausreichend verdaut wurden. CFW färbt β -Glycane in Cellulose und Callose der Zellwand [179-181][182]. Cellulasen besitzen die Eigenschaft Zuckerpolymere, wie die der Cellulose zu Einfachzuckern aufzuspalten [78, 183, 184]. Cellulasen bestehen dabei aus einer Mischung von 3 Hauptenzymen, der Endoglucanasen, Exoglucanasen und β -Glucosidase [185-188]. Die unterschiedlichen gewerblich erhältlichen Cellulasen, Macerozyme, Hemicellulasen und Pectolyasen sind meist Mischungen aus verschiedenen Enzymen und variieren entsprechend stark in Eigenschaft und Effektivität. Als Anhaltspunkt für unterschiedliche Zellwandverdauansätze kann man unterschiedliche, etablierte Protoplasten-Präparations-Protokolle [189-192] heranziehen. In Abb. 4.13 konnten Zellwände noch mit CFW gefärbt und dargestellt werden. Vergleicht man dies mit den Versuchen aus Abb. 4.18, spricht auch dies für eine nicht ausreichende Degradierung der Zuckerpolymere in den Zellwänden, was zu unvollständiger oder inhomogener Expansion der Probe führt. Es ist kaum vorherzusagen, ob eine Erhöhung der Inkubationszeiten, der Enzymkonzentration, Inkubationstemperatur oder eine Änderung der Enzymmischung bessere Ergebnisse liefern könnte, da einige Veränderungen dieser Parameter bereits versucht wurden und ähnliche unzufriedenstellende Ergebnisse lieferten. Deshalb wurde im Weiteren die Homogenisierung durch Denaturierung untersucht.

Die in Abb. 4.19, *At*-Blatt und Abb. 4.21 *At*-Wurzel gezeigten Proben wurden jeweils in Denaturierungspuffer (für 24 h bei 37 °C, 4h bei 70 °C und 16 h bei 95 °C) inkubiert. Charakteristika des Denaturierungsprotokolls ist die vorherige Fixierung der PVI in das Gel, der Denaturierungspuffer ist maßgeblich Natriumdodecylphosphat (SDS)-basiert, was nichtkovalente Bindungen innerhalb von Proteinen trennt. Dadurch bleibt, im Gegensatz zum enzymatischen Verdau die Primärstruktur des Proteins erhalten und Bindestellen für eine Immunfärbung intakt. Prinzipiell soll auch hier mit dem Denaturierungspuffer das Aufweichen beziehungsweise das komplette Auflösen des Verbundes der Zellorganellen gewährleistet werden [83] (s. auch Kapitel 1.2 Denaturierungsbasierte Homogenisierung der ExM-Probe).

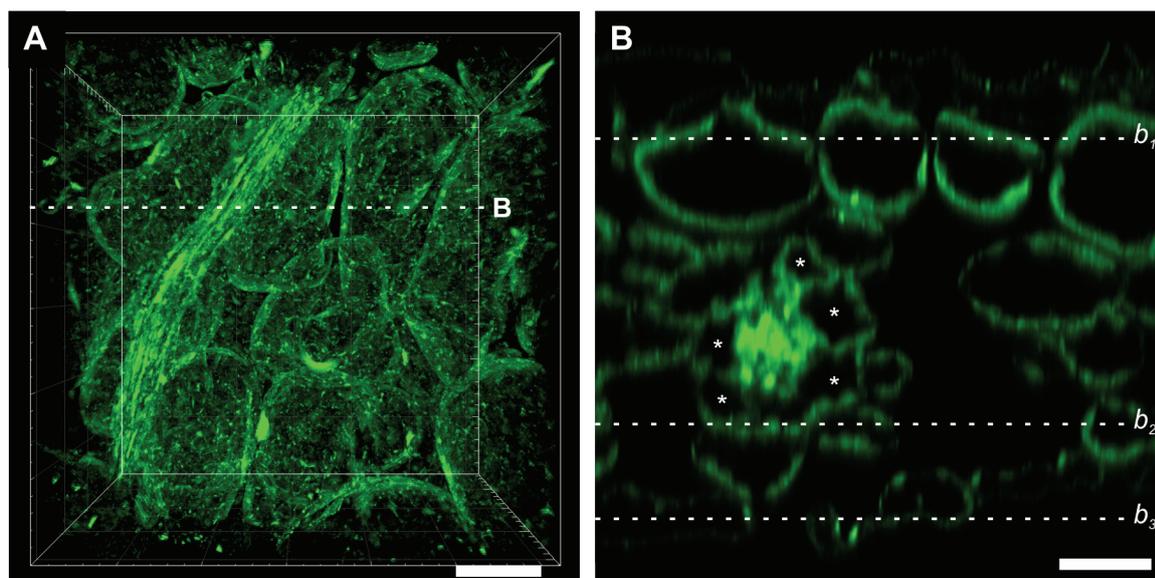


Abb. 4.19: ExM Versuche nach Denaturierung des At-Blattes – Übersicht. CLSM-Aufnahmen der MT-Zytoskelettstruktur mittels α -Tubulin Färbung mit Al488 (grün). Einzelfilamente sind keine sichtbar. **(A)** 3D-Z-Stack Darstellung des gesamten Blattausschnitts, dargestellt von Blattoberseite (vorne) nach Blattunterseite (hinten). **(B)** Die Auftragung des Querschnitts zeigt Palisadenparenchym (oben(**b₁**)), Schwammparenchym (Mitte, (**b₂**)), Epidermis (unten, (**b₃**)) und die Position eines Leitgefäßes mit umliegenden Zellen (*). Die Detailansichten sind in **Abb. 4.20** aufgetragen. Die expandierte Probe ist unter strukturphysiologischen Gesichtspunkten intakt, und die Eindringtiefe ohne Fluoreszenzsignalverlust ist mit Hilfe der ExM auf dem gesamten Blattdurchmesser möglich. Maßstabsbalken= 100 μ m.

Nach der Denaturierung wurde eine Immunfärbung von α -Tubulin mit Al488 durchgeführt. Bisher konnte im Blattgewebe meist die Autofluoreszenz des Chlorophylls für die Bildgebung für ExM-Proben genutzt werden. Nach Denaturierung war jedoch keine Chlorophyllfluoreszenz mehr sichtbar, dies kann je nach Fragestellung von großem Vorteil sein. In diesem Fall konnten aufgrund der fehlenden Chlorophyllfluoreszenz in der denaturierten Probe die Expansionsfaktoren nur näherungsweise über die Blattdicke bestimmt werden. Die kreisförmigen Strukturen, welche in der Abbildung noch zu sehen sind, sind nicht als Chloroplasten zu interpretieren. Hierfür muss man die Einzelbilder miteinander vergleichen: Die Abbildung **b₁** stellt dabei die Schlüsselabbildung dar. Diese Abbildung ist aus dem Bereich des Palisadenparenchyms, dem Gewebe mit den meisten Chloroplasten. Hier sind die Chloroplasten als „Negativ“ abgebildet. Das gefärbte Cytoskelett umringt die Chloroplasten. Dieses System muss auf alle anderen Einzelbilder übertragen werden. Es ist keinesfalls denkbar, dass eine Heterogenität der Denaturierung, sowie der Färbespezifität mehrfach innerhalb einer Probe variiert. Zudem überschneiden sich die Absorptions-/Emissionsspektren von Alexa488 und Chlorophyll in keiner Weise (Al488/ChlB Abs.: 500 nm/436 nm; Em.: 520 nm/644 nm [193])

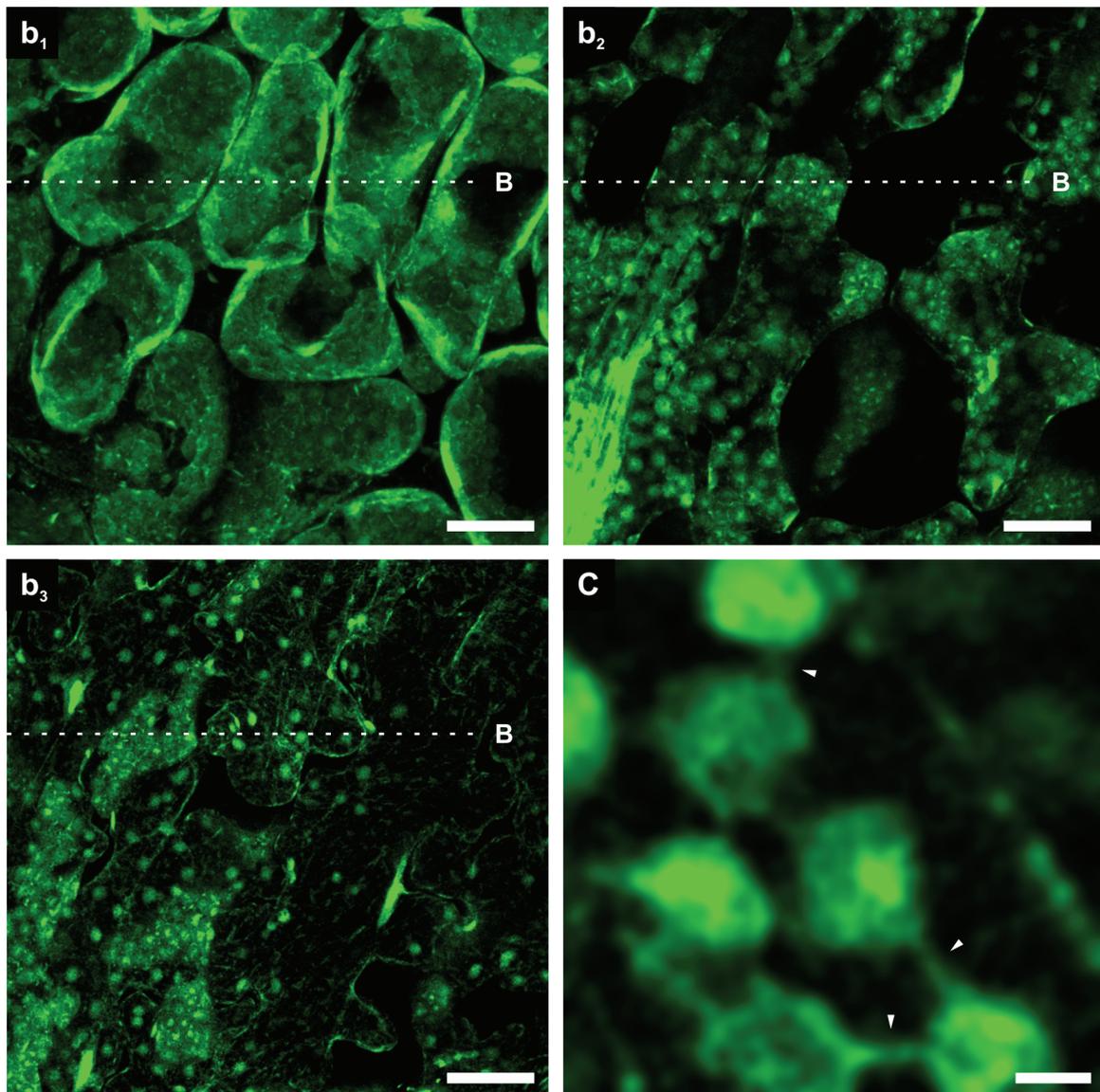


Abb. 4.20: ExM Versuche nach Denaturierung des At-Blattes – Detailansichten. MT-Zytoskelettstruktur mittels α -Tubulin Färbung mit Al488 (grün). Hier sind die Die Detail-ansichten aus Abb. 4.19 gezeigt. Die Einzelbilder wurden in der Ebene des (**b₁**) Palisadenparenchym, (**b₂**) Schwammparenchym und (**b₃**) Epidermis aufgenommen. Die Intaktheit des Gewebes wird hier deutlich. (**C**) Mögliche Verdichtungen von MT im Bereich von Chloroplasten an Stromuli (\blacktriangleleft). Maßstabsbalken= 100 μ m.

Die durchschnittliche Dicke eines vergleichbaren *At*-Blättchens betrug $\sim 250 \mu\text{m}$. Die Dicke des gezeigten Blättchens in Abb. 4.19 beträgt $\sim 550 \mu\text{m}$. Der Expansionsfaktor lag entsprechend zwischen 2-3x, was den vorherigen Versuchen entspricht. Die dreidimensionale Struktur ist komplett erhalten. Das Fluoreszenzsignal ist ausnahmslos im Zellumriss erkennbar und entspricht der erwarteten Position im Bereich des Zytoplasmas. Deutlich sind Palisaden-(b₁)), Schwammparenchym (b₂)), Gefäßstrukturen und Epidermis (b₃)) voneinander zu trennen. Es sind keine Löcher oder sonstige nicht-physiologischen, strukturellen Veränderungen erkennbar. Alle Einzelzellen haben immer Kontakt zu mindestens einer Nachbarzelle. Die gefäßsystem-umschließenden Zellen liegen ebenfalls direkt am Gefäß an und sind intakt, was im Querschnitt (B)) sehr gut zu erkennen ist (*). In Abb. 4.20 b₃) sind außerdem filamentöse Strukturen sichtbar, in manchen Bereichen jedoch auch größere runde Strukturen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist in Zellen des Palisadenparenchyms größer als im Schwammparenchym. Für die Analyse wurden dafür unterschiedliche Bildbereiche ausgewählt und die mittlere Intensität pro Pixel (counts/px) in jedem Einzelbild des Z-Stapels bestimmt. Da die Zellen des Palisadenparenchyms wesentlich dichter liegen als die des Schwammparenchyms, wurde ein Bildbereich ausgewählt, in welchem exakt eine Schwammparenchymzelle lag. Es wurde ein willkürlicher Bildbereich und ein Bereich mit Palisadenzelle ausgewählt, um ein falsch-positives Ergebnis zu kontrollieren. Der Intensitätszuwachs beträgt von Einzelbild zu Einzelbild für den Bereich mit Schwammparenchymzelle $0,04 \pm 0,02$ counts/px, für den willkürlichen Bereich $0,05 \pm 0,01$ counts/px und für den Bereich mit Palisadenparenchymzelle $0,1 \pm 0,02$ counts/px (angegeben ist der Mittelwert der Standardfehler; n= 5 pro Auswahlbereich). Daraus ergibt sich ein Mittelwert von $0,06 \pm 0,02$ counts/px. Die Fluoreszenzintensität steigt in Richtung der Blattoberfläche an. Da die Probe von der Blattunterseite aus gemessen wurde, kann ein Aufnahmeartefakt durch Bleichen oder vermindertes Fluoreszenzsignal mit zunehmender Eindringtiefe ausgeschlossen werden. Wäre es ein Bleichartefakt, würde man im Bereich der Blattoberfläche die geringste Intensität erwarten, da das Gewebe im Bereich der Blattoberseite der längsten Bestrahlung ausgesetzt war.

Der photosynthetisch aktivste Bereich einer Pflanze ist das Palisadenparenchym. Dieses Gewebe zeichnet sich durch vertikal verlängerte, regelmäßig aneinander gereihete Zellen aus, welche eine hohe Dichte an Chloroplasten beinhalten und direkt unterhalb der oberen Epidermis liegen. Darunter liegt das Schwammparenchym, welches sich durch einen lockeren Zellverbund von verästelten Einzelzellen auszeichnet. Die daraus resultierenden großen, luftgefüllten Hohlräume zwischen den Zellen ermöglichen die freie Diffusion und Speicherung von Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff beim Gasaustausch durch Respiration [22].

Die Aufnahmen aus Abb. 4.19 und Abb. 4.20 wurden mit einem 25x Wasserobjektiv aufgenommen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass trotz ExM die

Filamentstruktur der MT unterhalb der Auflösungsgrenze lag, weshalb diese in Schwamm- und Palisadenparenchym nicht aufgelöst sind und nur als flächiges Signal aufgezeichnet wurden. Die Intaktheit des Zytoskeletts nach Expansion lässt sich anhand der Bildgebung trotzdem nicht eindeutig belegen, weitere Untersuchungen sind hierfür notwendig. In Schwammparenchym und Epidermiszellen sind zudem kreisförmige Verdichtungen des Fluoreszenzsignals sichtbar. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich um Verdichtungen des Zytoskeletts im Bereich der Chloroplasten [194, 195]. In einigen Bildbereichen sind diese hochfluoreszenten Kreisstrukturen über feine fluoreszente Brücken miteinander verbunden und könnten auf die Verbindung der Chloroplasten via Stromuli entlang von Mikrotubuli hinweisen (Abb. 4.20 C), ◀ [196-198]. Das erhöhte Fluoreszenzsignal zwischen Palisadenparenchym und Schwammparenchym ist zum einen ein Hinweis darauf, dass die Ausprägung des Zytoskeletts im Palisadenparenchym höher ist. Die Hauptfunktion der Mikrotubuli ist der intrazelluläre Transport von Vesikeln und Organellen. Das Palisadenparenchym ist das photosynthetisch aktivste Gewebe in der Pflanze. Die Chloroplastenbewegung ist ein Beispiel, weshalb besonders in diesen Zellen ein engmaschiges Netzwerk des Zytoskeletts notwendig ist [22, 199, 200]. Da die Messungen von der Blattunterseite aus durchgeführt wurden, bedeutet dies ebenfalls, dass im Verlauf der Messung und trotz steigender Eindringtiefe kein oder nur wenig Fluoreszenzsignal verloren geht. Dies ist in einer unexpandierten Probe nicht möglich, da das Anregungs- und Fluoreszenzlicht zu sehr in der Probe an den dichten Gewebsstrukturen gestreut wird. Betrachtet man beispielsweise die in Abb. 4.2. dargestellten Wurzeln, so war es nicht möglich, den gesamten Wurzelquerschnitt aufzunehmen. Hierbei war eine Eindringtiefe von ~50 µm möglich. Natürlich ist die Eindringtiefe primär vom verwendeten Objektiv abhängig, dies wiederum beeinflusst die Auflösung. Dennoch waren bei vergleichbarer Auflösung bei den ExM-Versuchen Eindringtiefen von über 400 µm möglich. Die hier gezeigte fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines gesamten Blattquerschnitts ist außergewöhnlich und war nur limitiert durch die Eindringtiefe des Objektivs.

Betrachtet man eine ebenfalls durch Denaturierung homogenisierte *At*-Wurzel (s. Abb. 4.21), ist ein Wurzelquerschnitt anhand eines Z-Stapels rekonstruierbar. Einzelne MT sind dabei nicht sichtbar, jedoch befindet sich die Färbung im Bereich des Zytoplasmaschlauchs der einzelnen Zellen und somit an erwarteter Stelle. Im rekonstruierten Querschnitt (A) kann man Epidermis, Kortex und Endodermis sehr gut voneinander unterscheiden. Abgesehen von der Endodermis lassen sich die einzelnen Zellgruppen innerhalb der Stele nicht eindeutig unterscheiden. Anhand eines mittleren Durchmessers dieser expandierten Wurzel von 239 μm ist der Expansionsfaktor $\sim 2,5-3$. Kritisch muss man auch in dieser Abbildung die Intaktheit des Zytoskeletts hinterfragen, da keine filamentösen Strukturen erkennbar sind. Dies kann durch die Auflösung oder die gewählte Bildebene begründet werden. Dennoch muss auch eine Zerstörung des Netzwerks durch die Expansion in Erwägung gezogen werden, was hier nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Außerdem bleibt auch bei dem Denaturierungsprotokoll weiterhin die Xylemstruktur unverdaubar, welche nur zerrissen wurde (s. Abb. 4.22 (A)) und dabei die Autofluoreszenz weiterhin erhalten blieb. (B)). Der Einfluss dieser Tatsache ist schwierig abzuschätzen. Betrachtet man die Einzelbilder in Abb. 4.21 a₁) - a₃), ist keine offensichtliche Inhomogenität festzustellen. In manchen Bereichen sind Epidermiszellen unphysiologisch verändert. Dies muss jedoch eher auf die Probenpräparation, bei welcher das Präparat mehrmals in verschiedene Reaktionsgefäße überführt wurde, und nicht auf die Expansion selbst zurückgeführt werden. Auch hier gibt es noch weiteres Optimierungspotential.

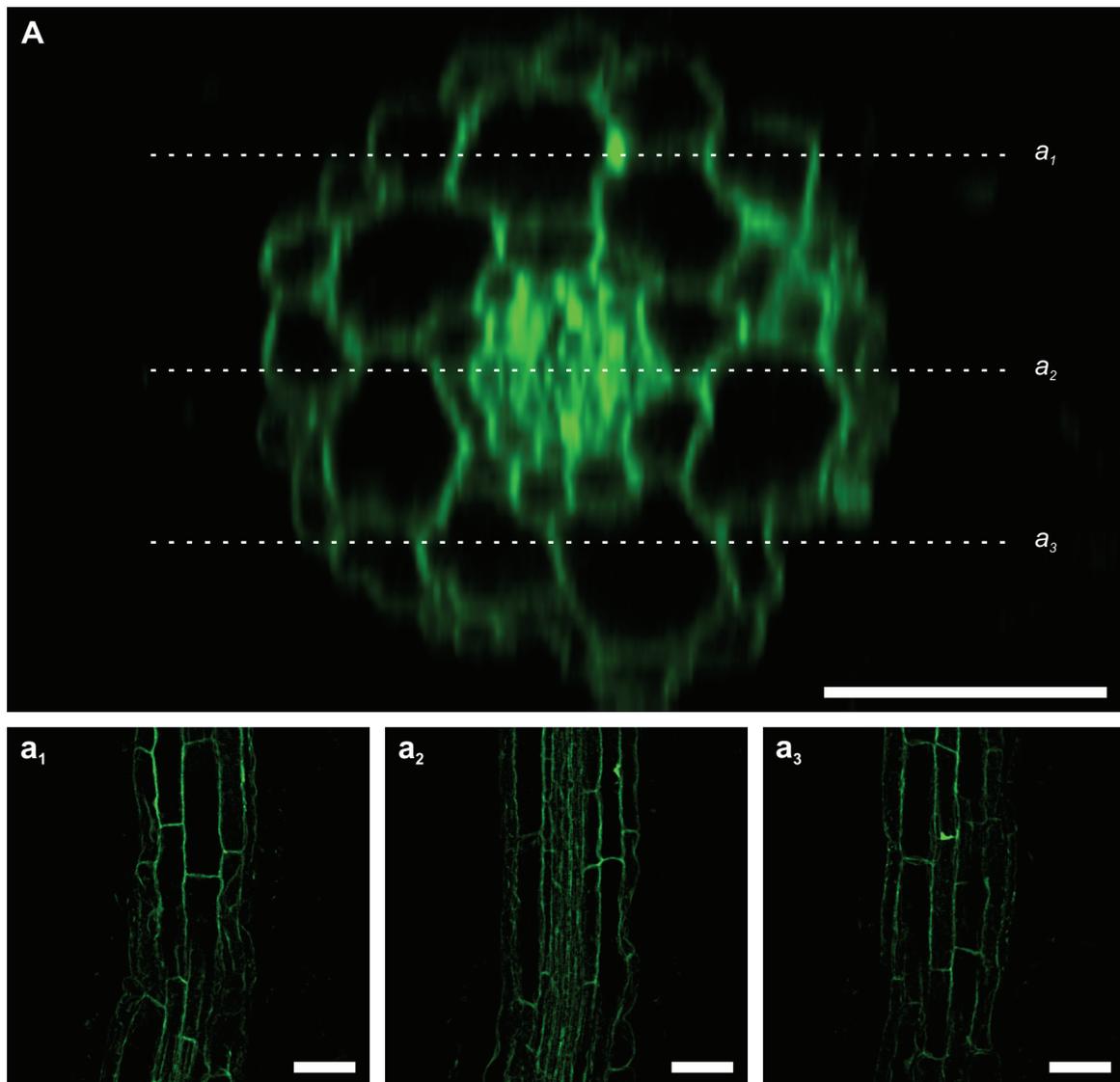


Abb. 4.21: ExM Versuche der *At*-Wurzel mittels Denaturierung. CLSM Aufnahmen der MT-Zytoskelettstruktur mittels α -Tubulin Färbung mit Al488 (grün). Einzelfilamente sind aufgrund der Bildebene und der Auflösung keine sichtbar, die Färbung befindet sich flächig im Zytosol. Die Intaktheit der Filamente ist anhand dieser Aufnahmen nicht eindeutig nachweisbar. **(A)** Querschnittsprojektion des Z-Stacks. Epidermis, Kortex, Endodermis und vereinzelt auch Perizykelzellen sind deutlich unterscheidbar. Die Gesamtstruktur der Wurzel bleibt erhalten. **(a₁-a₃)** Die Einzelaufnahmen der Längsschnitte zeigen die Intaktheit und physiologische Struktur der Wurzelzellen. Maßstabsbalken= 100 μ m)

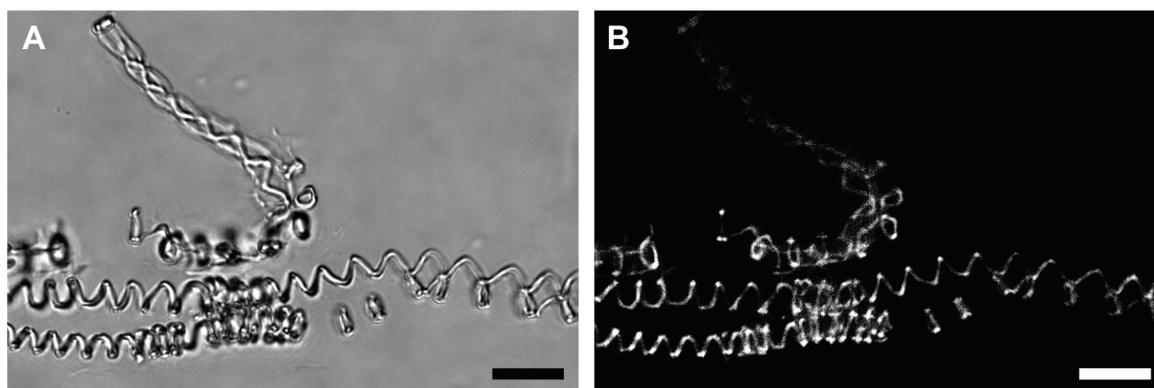


Abb. 4.22: Denaturierungsgrad der Xylemstruktur. (A) Die Xylemstruktur ist auch durch Denaturierung nur sehr schwer zu homogenisieren. Bei eingebetteten pflanzlichen Proben rupturiert die Xylemstruktur bei Expansion lediglich. (B) Ebenfalls bleibt die Autofluoreszenz des Xylems erhalten. Maßstabsbalken= 10 μm .

Bisher war man bei hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Messmethoden im Pflanzengewebe sehr beschränkt und neben einigen technischen Verbesserungsmöglichkeiten (beispielsweise TIRF- [201], *Light-sheet* Mikroskopie [202]), meist auf außenliegende Gewebezellen (Epidermis, Kortex, Schließzelle, o. ä.), Gewebeschnitte oder chloroplastenfreie, verhältnismäßig durchsichtige Gewebe (beispielsweise Wurzel) begrenzt [203, 204]. Bereits vor Jahren wurde versucht, die Hintergrundfluoreszenzproblematik mit Hilfe des PEA-Clarity Protokolls zu umgehen und zu verbessern. Hier wurden bereits ganze Pflanzenblätter mittels Denaturierung (SDS), enzymatischer Degradierung und Verdau, sowie Fixierung und Einbettung in Hydrogels geklärt [205]. Ein anderer Ansatz war das ClearSee Protokoll. Hierbei wurden die pflanzlichen Proben höchsteffektiv durch den Einsatz von Xylitol, Natriumdeoxycholat und Harnstoff geklärt und für den Einsatz fluoreszenzmikroskopischer Messungen optimiert [206]. Im Prinzip waren diese Protokolle bereits die Vorreiter der ExM [36]. Nun bietet die ExM neue Möglichkeiten. Mit dem Vorteil der verminderten Hintergrundfluoreszenz kann mit konventionellen Lichtmikroskopen, pflanzliches Gewebe fluoreszenzmikroskopisch, hochaufgelöst dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl mit dem enzymatischen Verdau als auch mit einem Denaturierungsprotokoll ExM möglich ist. Die Varianz der Expansionsfaktoren der unterschiedlichen Versuche ist ein Indiz dafür, dass manche Proben unterschiedlich stark verdaut waren. Gleichermäßen ist denkbar, dass unterschiedliche Expansionsfaktoren durch zu geringe Acrylamidkonzentrationen hervorgerufen wurden. Wenn die Acrylamid-Monomer Konzentration zu gering ist, bilden reaktive Methylole, welche bei der Reaktion von Acrylamid mit den Proteinen entstehen, mit den Amidgruppen der Proteine Methylenbrücken aus [207]. Dies führt innerhalb eines Proteins zur Vernetzung und mit angrenzenden Proteinen. Diese Vernetzung verhindert wiederum die freie Dissoziation der Proteinkomplexe und limitiert

die Gewebeexpansion [208]. Bei erhöhten Acrylamidkonzentrationen reagieren die Methylole bevorzugt mit den frei zugänglichen Acrylamid-Monomeren, wodurch die intra- und interprotein Vernetzung verringert wird und dadurch die einzelnen Proteine in einem expandierbaren Hydrogel vernetzt werden [83]. Zu geringe Acrylamidkonzentrationen innerhalb der pflanzlichen Proben könnten durch die geringe Durchlässigkeit von Kutikula und Epidermis hervorgerufen worden sein.

Für die Etablierung der ExM für pflanzliche Proben, ist die weitere Ausarbeitung eines Präparationsprotokolls notwendig. Hier konnten erste Ansätze gezeigt werden und die prinzipielle Durchführbarkeit von ExM an Pflanzenproben beschrieben werden. Die extensive Überprüfung der korrekten Expansion ist hierbei unerlässlich, da inhomogene Expansion zu Analyseartefakten führen kann. Denkbar ist, dass ein optimales Ergebnis durch ein Mischprotokoll von enzymatischem Verdau und Denaturierung erreicht werden kann. Die Verminderung der Hintergrundfluoreszenz und der Einsatz der CLSM sind zwei maßgebliche Vorteile der ExM von pflanzlichen Proben. Deshalb ist die ExM eine hochauflösende Mikroskopiemethode, welche die Pflanzenforschung im Bereich der bildgebenden Methoden in Zukunft revolutionieren könnte.

4.3 FRET-FLIM Analysen von SLAC/SLAH

Anhand bildlicher Darstellung Assoziationsstudien zweier Proteine durchzuführen, ist schwierig, da Kollokalisationsanalysen oft keine eindeutige Aussage zulassen sowie fehleranfällig sind [209]. Hierfür gibt es Möglichkeiten wie FRET-FLIM, die dazu besser geeignet sind [25].

In dieser Arbeit wurden mittels FRET-FLIM-Messungen Interaktionsstudien mit SLAC/SLAH-Kanälen durchgeführt. Der Fokus lag darauf, die Interaktion zwischen unterschiedlichen SLAH-Untereinheiten zu testen, die entweder mit mOrange oder tSapphire jeweils N- oder C-terminal fusioniert wurden. Hierfür wurde die Tabakpflanze *Nicotiana benthamiana* als Expressionssystem verwendet. Im speziellen wurden die Untersuchungen an Blattepidermiszellen des Tabaks durchgeführt, welche sehr leicht für mikroskopische Untersuchungen zugänglich sind. Die transiente Transformation der Blattepidermiszellen ist dabei mit Hilfe von Agrobakterien möglich. Mittels Agrobakterien können Plasmidkonstrukte in die Blattepidermiszellen eingebracht und die SLAC/SLAH-Fusionskonstrukte exprimiert werden (s. Kapitel 3.3.1). Dabei wurde das pCAMBIA Plasmidrückgrat verwendet und die Fusionskonstrukte wurden unter dem pUBQ10 Promotor exprimiert.

Im folgenden Kapitel waren der nitratabhängige Anionenkanal SLAH3 und die beiden Homologe SLAH1 und SLAH4 von besonderem Interesse. In Vorangegangenen Studien der AG Geiger konnten elektrophysiologische Messungen mit *Xenopus laevis* Oozyten zeigen, dass die verschiedenen SLAH-Homologe unterschiedliche Leitfähigkeiten und

Funktionen besitzen. Hierbei konnten lediglich für SLAH3 makroskopische Anionenströme gemessen werden. Für SLAH1 und SLAH4 hingegen konnte bisher keine eigene Leitfähigkeit nachgewiesen werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die stille Anionenkanaluntereinheit SLAH1 sogar bei Abwesenheit der Kinase den Anionenkanal SLAH3 aktiviert. Im Gegensatz hierzu deaktiviert SLAH4 den SLAH3. Für SLAH1 und SLAH3 konnte außerdem gezeigt werden, dass das Paar in der Wurzel agiert und von den Perizykelzellen aus die Nitrat- und Chloridkonzentration in den Leitgefäßen kontrolliert. Unter anderem ließ die reduzierte SLAH1 Expression in den Wurzeln bei erhöhten Salzkonzentrationen im Boden den Rückschluss zu, dass SLAH1/SLAH3 bei der Antwort auf Salzstress beteiligt ist. Des Weiteren konnte anhand der Ko-Expression der Fusionskonstrukte SLAH1::mO/tS::SLAH3 in Tabak-Epidermiszellen und FRET-FLIM-Untersuchungen festgestellt werden, dass es zu einer Heteromerisierung der beiden Homologe im nativen System kommt [24]. Für SLAH3/SLAH4 wurden weder funktionelle Untersuchungen in pflanzlichen Systemen durchgeführt, noch die potentielle Interaktion von SLAH3 mit SLAH4 geprüft.

Die folgenden Versuche wurden von Max Moog im Rahmen eines Bachelorpraktikums unter Beaufsichtigung des Autors durchgeführt. Zuerst wurde die Expression der transformierten Konstrukte anhand des Fluoreszenzsignals von tSapphire und mOrange geprüft (s. Abb. 4.23, hier ist tSapphire::SLAH4 (cyan) mit SLAH3:mOrange (gelb) gezeigt). Man erkennt dabei gut die Lokalisation beider markierter Proteine im Zellumriss der Epidermiszelle (A) und B)). Setzt man diese Bilder in Kontext mit dem Weißlichtbild und der (geringen) Autofluoreszenz des Chlorophylls (C)), so zeigt sich eine Überlagerung der tSapphire und mOrange Fluoreszenz und die Membranständigkeit beider Fusionsproteine (A)+B)+C)). Danach wurde die Fluoreszenzlebensdauer von tSapphire aufgezeichnet, anhand des Bildes ausgewertet (s. Kapitel 3.9.3 „Datenauswertung von FRET-FLIM Messungen“) und in Abb. 4.24 aufgetragen.

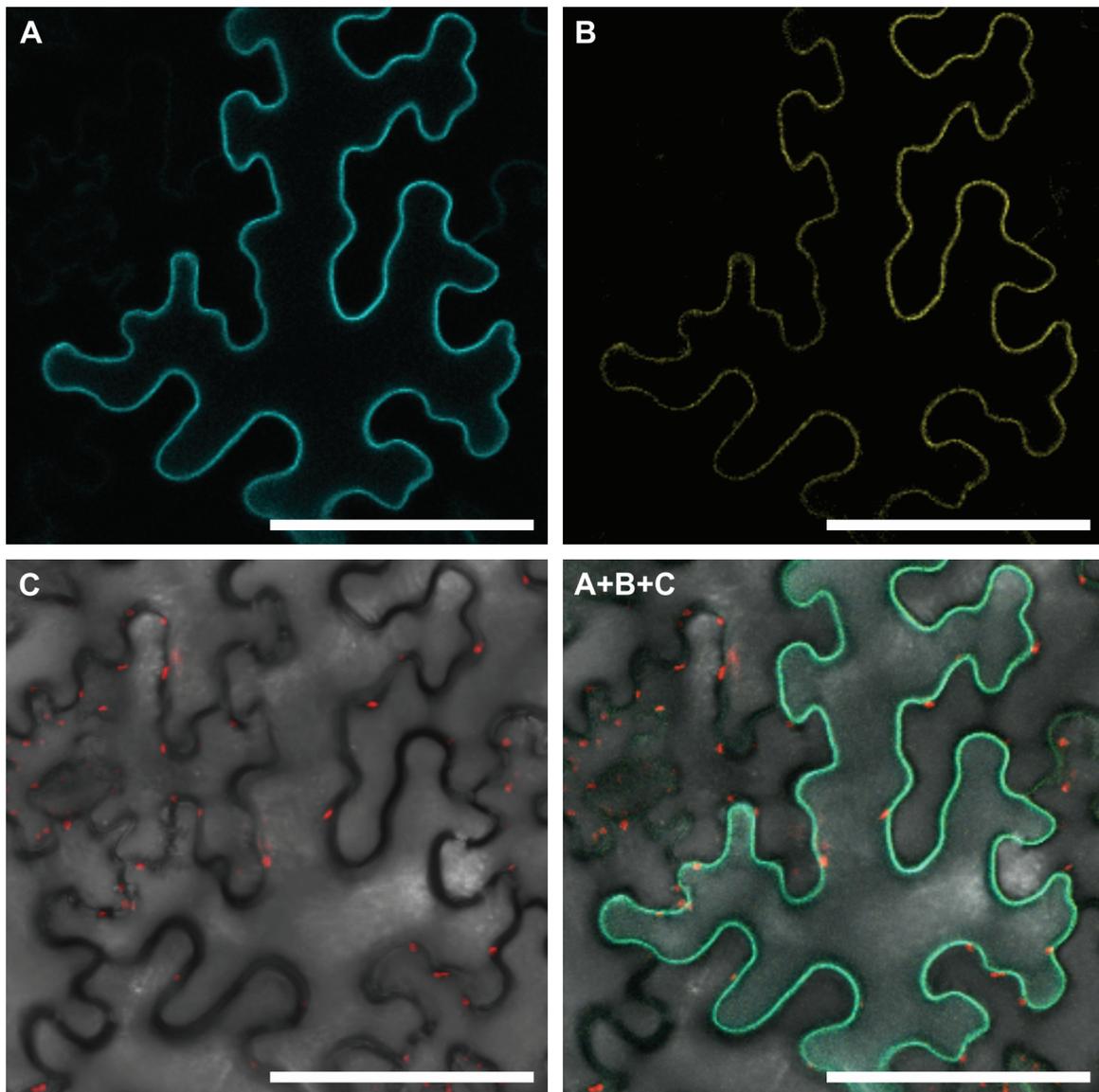


Abb. 4.23: CLSM-Aufnahmen zur Expressionskontrolle der SLAH1/SLAH3-Konstrukte. Gezeigt sind mit Hilfe von Agrobakterien transient transformierte *Nb*-Blattepidermiszellen. Überprüfung der Expression der beiden Konstrukte tSapphire::SLAH4 und SLAH3:mOrange unter dem pUBQ10-Promotor anhand des tSapphire- (cyan) und mOrange-Fluoreszenzsignals (gelb) (hier beispielsweise: **(A)** tSapphire::SLAH4 mit **(B)** SLAH3:mOrange). Beide Anionenkanäle sind in der Plasmamembran lokalisiert. **(C)** Weißlichtbild und Chlorophyllfluoreszenz (rot). Bereiche mit Chloroplasten wurden bei der Fluoreszenzlebensdaueranalyse aussortiert. **(D)** Das Fusionsbild zeigt die Strukturkorrelation aller Kanäle. Maßstabsbalken= 100 μ m.

Mit Hilfe von FRET-FLIM Messungen kann die räumliche Nähe von einem Donor- zu einem Akzeptor-Fluorophor gemessen werden. Befinden sich die zwei Fluorophore <10 nm voneinander entfernt kann es abhängig von der Orientierung zu FRET kommen, was die Fluoreszenzlebensdauer des Donors verringert. Misst man nun die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer in Bezug auf eine Negativ- und Positivkontrolle erhält man Informationen über die räumliche Nähe des Donor/Akzeptor-Paars sowie deren Fusionsproteine (hier SLAH1/SLAH3/SLAH4). Bei der Negativkontrolle wird der Akzeptor einfach nicht exprimiert. Bei der Positivkontrolle werden Donor und Akzeptor kovalent aneinander gebunden (Proteinlinker dazwischen).

Die Fluoreszenzlebensdauer für die Positivkontrolle, bei welcher mOrange, tSapphire und SLAH3 kovalent aneinander gebunden wurden (mO:tS:H3), betrug $2,4 \pm 0,07$ ns ($n= 3$), die der beiden Negativkontrollen, wobei nur tSapphire an SLAH3 gebunden exprimiert wurde (H3:tS beziehungsweise tS:H3), betrug $2,7 \pm 0,06$ ns ($n= 12/16$). Die Interaktion von SLAH3 mit SLAH1 konnte bereits nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzlebensdauer betrug dabei $2,45 \pm 0,03$ ns (H1:mO/tS:H3). Dieser Wert entspricht der hier gemessenen Positivkontrolle. Die Messwerte der Negativkontrolle entsprechen ebenfalls den Werten von „Cubero-Font, et al.“ (Negativkontrolle tS:H3: $2,7 \pm 0,03$ ns) [24].

Die Fluoreszenzlebensdauer und Standardfehler werden im Folgenden im Fließtext für die bessere Übersichtlichkeit und Verständnis nicht explizit aufgeführt. Die Werte sind der Tab. 7 oder der Abb. 4.24 zu entnehmen. Tauscht man den Terminus für den Akzeptor am SLAH3-Protein (mO:H1) im Vergleich zu den Versuchen von Cubero-Font, et al., So kann kein FRET-Kontakt mehr zwischen Donor und Akzeptor hergestellt werden. Dabei spielt die Position des Donors am SLAH3 keine Rolle (sowohl tS:H3 als auch H3:tS), das Messergebnis bleibt unverändert. Offensichtlich ist hier die Orientierung der Fluorophore im Sinne des FRET-Kontakts nicht korrekt.

Bei einer Ko-Expression von SLAH1 mit SLAH4 konnte ebenfalls kein FRET-Kontakt zwischen den Fluorophoren hergestellt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer entsprach dem der Negativkontrolle.

Tab. 7: Fluoreszenzlebensdauer der FRET-FLIM-Experimente in *Nb*-Blattepidermiszellen. Angegeben sind die Fluoreszenzlebensdauer in ns und die Anzahl der gemessenen Zellen (n). Verschiedene Fusionsproteine wurden hergestellt, dabei wurde immer ein SLAH-Protein (H) mit einem Fluorophor tSapphire (tS) oder mOrange (mO) markiert. der Doppelpunkt (:) zeigt die kovalente Bindung des Fluorophors an das PVI an. Farblich unterlegt sind Werte, welche der Positivkontrolle (orange) entsprechen und die der Negativkontrolle entsprechen (grau). Bei den Interaktionspartnern mit Werten die der Positivkontrolle entsprechen ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Interaktion zu erwarten.

SLAH:: tSapphire/mOrange	mO:H1	tS:H4	mO:H4	H4:mO
H3:tS	2,7 ± 0,03 (n=6)		2,5 ± 0,05 (n=2)	
tS:H3	2,7 ± 0,06 (n=18)		2,71 ± 0,03 (n=5)	2,36 ± 0,21 (n=3)
H3:mO		2,47 ± 0,03 (n=3)		
mO:H3		2,41 ± 0,09 (n=3)		
H4:tS	2,7 ± 0,08 (n=3)			
tS:H4	2,8 ± 0,03 (n=5)			

Für SLAH3 mit SLAH4 waren 80 % (4 von 5 getesteten Proteinpaarungen) mit unterschiedlichen Donor-/Akzeptor-Positionen positiv. Das bedeutet, dass die Mittelwerte der verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern der Positivkontrolle entsprachen. Sowohl Donor als auch Akzeptor wurden dabei jeweils N- und C-terminal an SLAH3 oder SLAH4 gekoppelt. Diese Messergebnisse beweisen, dass SLAH3 und SLAH4 im pflanzlichen Expressionssystem miteinander interagieren.

Des Weiteren bedeuten die erhobenen FRET-FLIM-Ergebnisse, dass eine Interaktion zweier Kanäle, trotz Negativergebnis bei den oben beschriebenen FRET-FLIM-Versuchen, nicht ausgeschlossen werden kann. Dies betrifft in diesem Fall SLAH1 und SLAH4, wobei kein FRET-Kontakt festgestellt werden konnte. Die N-terminale Markierung von SLAH1 mit mOrange zeigte bei den hier durchgeführten Interaktionsstudien von SLAH1 mit SLAH3 ebenfalls kein positives Ergebnis, obwohl die Interaktion und die Aktivierung von SLAH3 durch SLAH1 bereits bekannt ist [24].

Die Membranständigkeit des SLAH4 konnte bereits in Kapitel 4.1 „Subzelluläre Lokalisation von SLAH4 in der *Nb*-Blattepidermis“ und somit die räumliche Nähe von SLAH3 und SLAH4 in der Plasmamembran bewiesen werden. Die Bildung eines funktionellen Heteromers von SLAH3 mit SLAH4 ist anhand der FRET-FLIM Daten

sehr wahrscheinlich und legen zusätzlich nahe, dass SLAH4 auf diesem Wege regulatorischen Einfluss (Inaktivierung) auf SLAH3 nimmt. Dies bestätigt die elektrophysiologischen Messungen, bei welchen SLAH3 bei Anwesenheit von SLAH4 inhibiert wurde. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ein gebildetes Heteromer durch einen anderen Interaktionspartner aufgelöst werden kann und somit die Regulierung von SLAH3 außerordentlich agil und adaptiv bleibt.

Mit Hilfe der FRET-FLIM Messungen konnte neben SLAH3/SLAH1, mit SLAH3/SLAH4 ein weiteres Interaktionspaar gefunden werden. Die FRET-FLIM-Daten liefern dabei jedoch keinerlei Information über die Stöchiometrie dieser Heteromerisierung. Deshalb wurde im Weiteren versucht den Oligomerisierungsgrad und die zugrunde liegende Stöchiometrie mittels Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen.

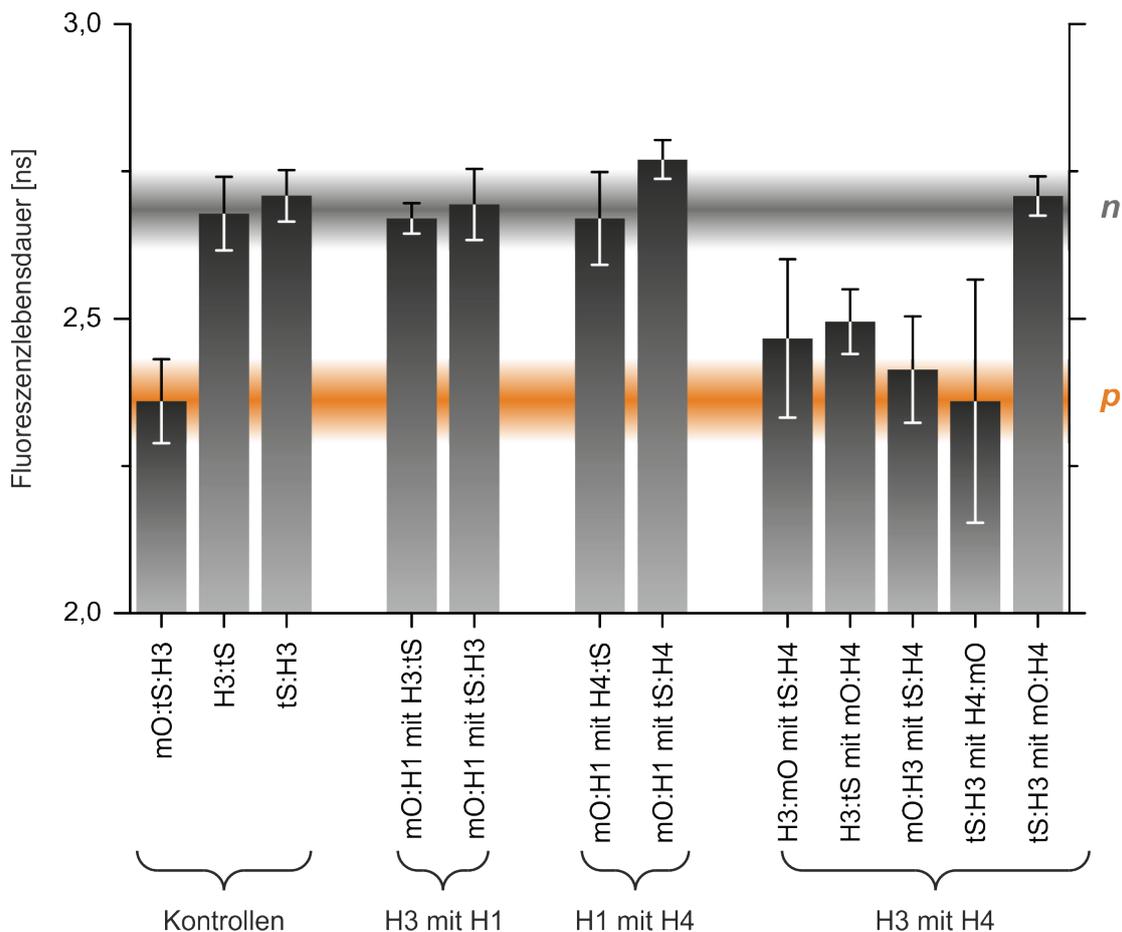


Abb. 4.24: Interaktionswahrscheinlichkeit der unterschiedlichen SLAC/SLAHs anhand von FRET-FLIM-Untersuchungen. Aufgetragen ist die Fluoreszenzlebensdauer des tS. Bei FRET-Kontakt von tS und mO wird die Fluoreszenzlebensdauer des tS verringert. Anhand der Fluoreszenzlebensdauer kann unter Berücksichtigung der Negativ- und Positivkontrolle eine Abschätzung gemacht werden, ob eine Interaktion der verschiedenen SLAC/SLAHs wahrscheinlich ist. Die Positivkontrolle (mO:tS:H3), bei welcher SLAH3 mit mO und tS kovalent aneinander gebunden zeigt eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer (*p*) im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen (*n*). Bei welchen lediglich das tSapphire markierte SLAH3 (H3:tS/tS:H3) exprimiert wurde. Die Interaktion von SLAH1 mit SLAH3 konnte bereits bewiesen werden [24]. Die Werte des N-terminal markiertem SLAH1 mit mOrange (mO:H1) mit SLAH3 und tS (H3:tS/tS:H3) entsprachen der Negativkontrolle. Hier verhindert eine inkorrekte Orientierung der Fluorophore den FRET-Kontakt. Für SLAH1 (mO:H1) und SLAH4 (H4:tS und tS:H4) konnte ebenfalls kein FRET-Kontakt hergestellt werden. Dagegen waren 80% der verschiedenen Versuche von SLAH3 mit SLAH4 positiv, was die Interaktion der beiden Anionenkanäle im pflanzlichen System beweist. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der pflanzlichen Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie mittels Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie

Die Lokalisationsmikroskopie ermöglicht es, in nativen biologischen Systemen, Einzelmoleküle zu quantifizieren und dadurch den Oligomerisierungsgrad und die Stöchiometrien innerhalb von Proteinkomplexen zu bestimmen. Bei Kaliumkanälen der Shaker-Familie führt eine Heteromerisierung von Kanaluntereinheiten zu einer weitaus breiteren funktionellen Diversität, die durch eine rein homomere Kanalassemblierung nicht erreicht werden könnte [210]. Auch bei Anionenkanälen der SLAC/SLAH Familie kommt es zu heteromeren Assemblierung von Untereinheiten zwischen SLAH3 und SLAH1 [24]. Funktionelle Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten, dass sich etwa die elektrischen Eigenschaften von SLAH3 durch die Heteromerisierung mit SLAH1 deutlich verändern. Allerdings wusste man zu Beginn meiner Arbeit nicht, welche Untereinheiten miteinander interagieren können und aus wieviel Untereinheiten ein funktioneller Kanal besteht. Deshalb nutze ich hier die Einzelmolekül-lokalisationsmikroskopie-methode PALM, um den Oligomerisierungsgrad von SLAC/SLAH-Kanälen zu bestimmen.

In elektrophysiologischen Studien in *Xenopus laevis* Oozyten der AG Geiger konnte zudem festgestellt werden, dass SLAH3 durch cytosolische Ansäuerung aktivierbar ist. Deshalb wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Oligomerisierung der Anionenkanäle ebenfalls untersucht. Die Ansäuerung des Cytosols wurde dabei durch die Zugabe von Natriumacetat (NaAc) bewerkstelligt. Bei den Messungen, wurde wiederum darauf geachtet, dass diese bei gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, um einen Einfluss des pH auf die Fluorophore auszuschliessen. Da die Proben im fixierten Zustand gemessen wurden, konnten hier die Bedingungen identisch gewählt werden. Die pH-Behandlung der Zellen wurde vor und während der Fixierung durchgeführt.

Für die PALM-Untersuchungen wurden die pflanzlichen Ionenkanäle in tierischen Säugerzellen (COS7 und HEK293) exprimiert, da sich lokalisationsmikroskopische Anwendungen im Pflanzengewebe als extrem schwierig herausstellten. Ein weiterer Vorteil ist, dass im tierischen System keine pflanzlichen Proteine oder andere endogenen Faktoren exprimiert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass sich beispielsweise unmarkierte SLAC/SLAH-Proteine im System befinden und somit keine Heteromerisierung von markierten und unmarkierten Proteinen stattfinden kann. Das bedeutet im Endeffekt, dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch endogene Faktoren ausgeschlossen werden konnte. Die Expression von pflanzlichen Membranproteinen im heterologen Expressionssystem erfordert Vorversuche, welche die Lokalisation in der Plasmamembran und die Funktionalität in einer Säugerzelle bestätigen. Zudem wurden

dabei Transfektionsprotokolle ausgearbeitet, um eine ausreichend geringe Expression der Proteine für die Analysen des Oligomerisierungsgrades zu gewährleisten.

Untersuchung der Membranständigkeit von mEOS2 markierten SLAC/SLAHs in COS7-Zellen anhand von CLSM-Aufnahmen

Zunächst wurden CLSM Aufnahmen durchgeführt, um die Membranständigkeit von mEOS2 markierten SLAC/SLAH-Konstrukten in COS7-Zellen zu bestätigen. Dabei wurden sowohl die einzelnen SLAC/SLAH-, als auch die P2A-Konstrukte begutachtet. Bei den P2A-Konstrukten wird das sehr kleine Peptid P2A zwischen zwei PVI positioniert, welche dann unter einem Promotor exprimiert und ribosomal bei der Translation getrennt werden. Dadurch ist die Expression von zwei unterschiedlichen Kanälen zu gleichen Anteilen möglich und Oligomerisierungsartefakte durch ungleiche Verteilung der PVIs ausgeschlossen (s. 1.2 Plasmidkonstrukte für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM) [97].

In Abb. 4.25 sind beispielhaft die Konstrukte SLAH3::mEOS2 nach Ansäuerung mit NaAc (A)), SLAH3::mEOS2 (B)) und SLAH3::mEOS2::P2A::SLAH4::mEOS2 (C)) dargestellt. Man erkennt dabei jeweils COS7-Einzelzellen, bei welchen die grüne mEOS2-Fluoreszenz vor Konvertierung des Fluorophors aufgezeichnet wurde. Die Verteilung des Fluoreszenzsignals ist jeweils in zwei Hauptstrukturen aufgeteilt. Zum einen erkennt man ein flächiges, verhältnismäßig schwaches Signal, und zum anderen zeigen sich hell leuchtende, punktförmige Strukturen. Das flächige Signal war dabei nur unmittelbar an der Glasoberfläche und am Zellumriss zu sehen. Die punktförmigen Strukturen waren in der Nähe der Glasoberfläche, maßgeblich jedoch im Zelllumen sichtbar und sind im Zentrum der Zelle stark verdichtet.

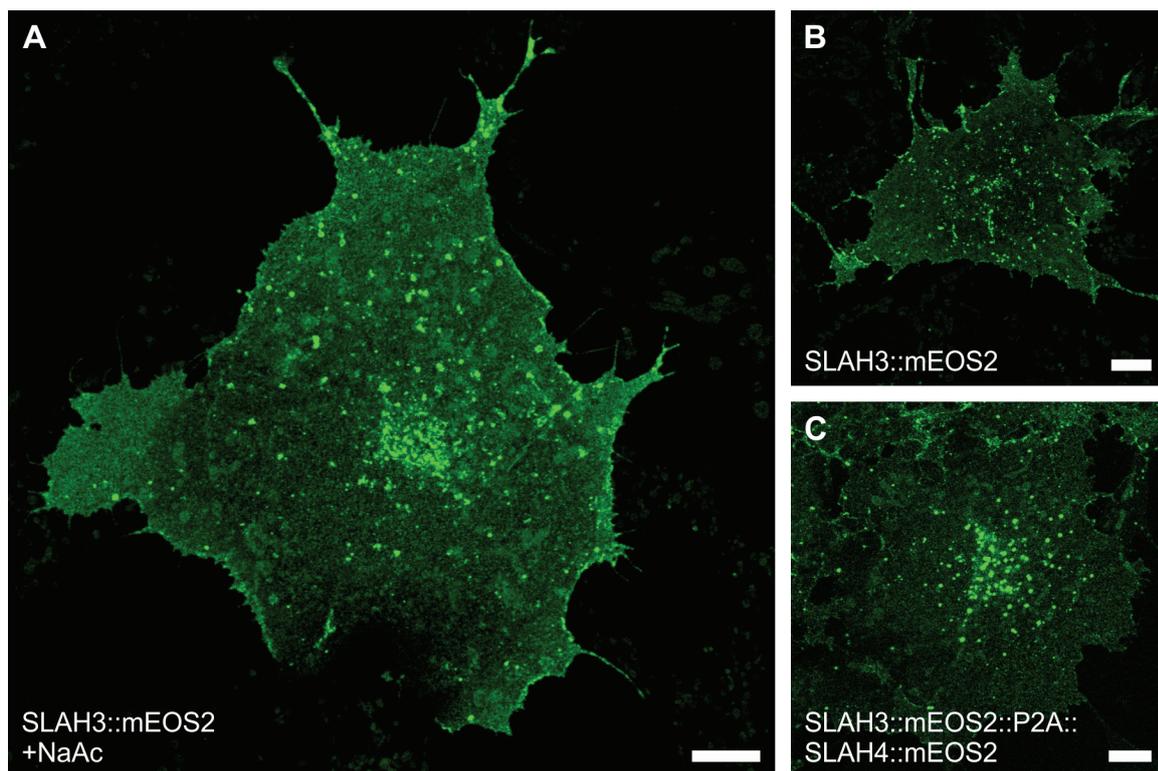


Abb. 4.25: Membranständigkeit der SLAC/SLAH-Konstrukte mit mEOS2. CLSM-Aufnahmen der SLAC/SLAH::mEOS2-Konstrukte (grün) in COS7-Zellen. **(A)** SLAH3::mEOS2 nach Ansäuerung mit NaAc, **(B)** SLAH3::mEOS2 und **(C)** SLAH3::mEOS2 mit SLAH4::mEOS2 exprimiert mit Hilfe des P2A-Konstrukts. Die SLAC/SLAHs sind zum Großteil membranständig, was anhand der flächigen Ausbreitung des Fluoreszenzsignals des unkonvertierten mEOS2 sehr gut zu erkennen ist. Die Verteilung der Kanäle in der Plasmamembran ist homogen und es sind keine Unterstrukturen mit Hilfe der CLSM erkennbar. Zudem sind die SLAC/SLAHs in Vesikeln (helle punktförmige Strukturen) in besonders starker Konzentration rund um den Zellkern lokalisiert. Die Lokalisation in der Plasmamembran ist ein Hinweis auf die korrekte Expression und funktionelle Proteinfaltung der pflanzlichen SLAC/SLAH-Proteine in den tierischen COS7-Zellen. Maßstabsbalken= 10 μ m.

Unter struktur-physiologischen Gesichtspunkten einer Säugerzelle befindet sich ein Großteil der exprimierten Anionenkanäle in der Plasmamembran, was sich anhand des flächigen Fluoreszenzsignals zeigt. Anhand der dreidimensionalen Auftragung von Z-Stacks konnte sehr gut das Zelllumen abgebildet werden, welches durch die Plasmamembran umrissen wird (Daten nicht gezeigt). Die punktförmigen Strukturen im Bereich der Plasmamembran und die Verdichtung dieser im Zentrum der Zelle sind allesamt im Zelllumen lokalisiert. Anhand der strukturellen Verteilung könnte es sich um Vesikel handeln. Dies wurde hier aber aufgrund der Nicht-Relevanz auch nicht näher untersucht.

Verteilung von SLAC/SLAHs über die Plasmamembran

Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades eines Proteins ist die vereinzelte Verteilung in der Plasmamembran essentiell. Die Verteilung der SLAC/SLAHs auf der Plasmamembran wurde mittels *d*STORM-Aufnahmen analysiert. *d*STORM bietet für diese Fragestellung eine ausreichend hohe Auflösung [143]. Betrachtet man die Verteilung der Anionenkanäle in den vorangegangenen CLSM-Aufnahmen ist diese homogen, es zeichnen sich keine Ballungsbereiche ab. Aufgrund der begrenzten Auflösung sind jedoch auch keine Details sichtbar. Für die Untersuchungen mittels *d*STORM wurden deshalb Tag-Konstrukte der SLAC/SLAHs hergestellt. Dabei wird das Protein von Interesse kovalent an einen Tag (Snap-/Halo-Tag) gekoppelt und bei der Probenpräparation mit einem organischen, *d*STORM-fähigen Fluorophor markiert [43, 211].

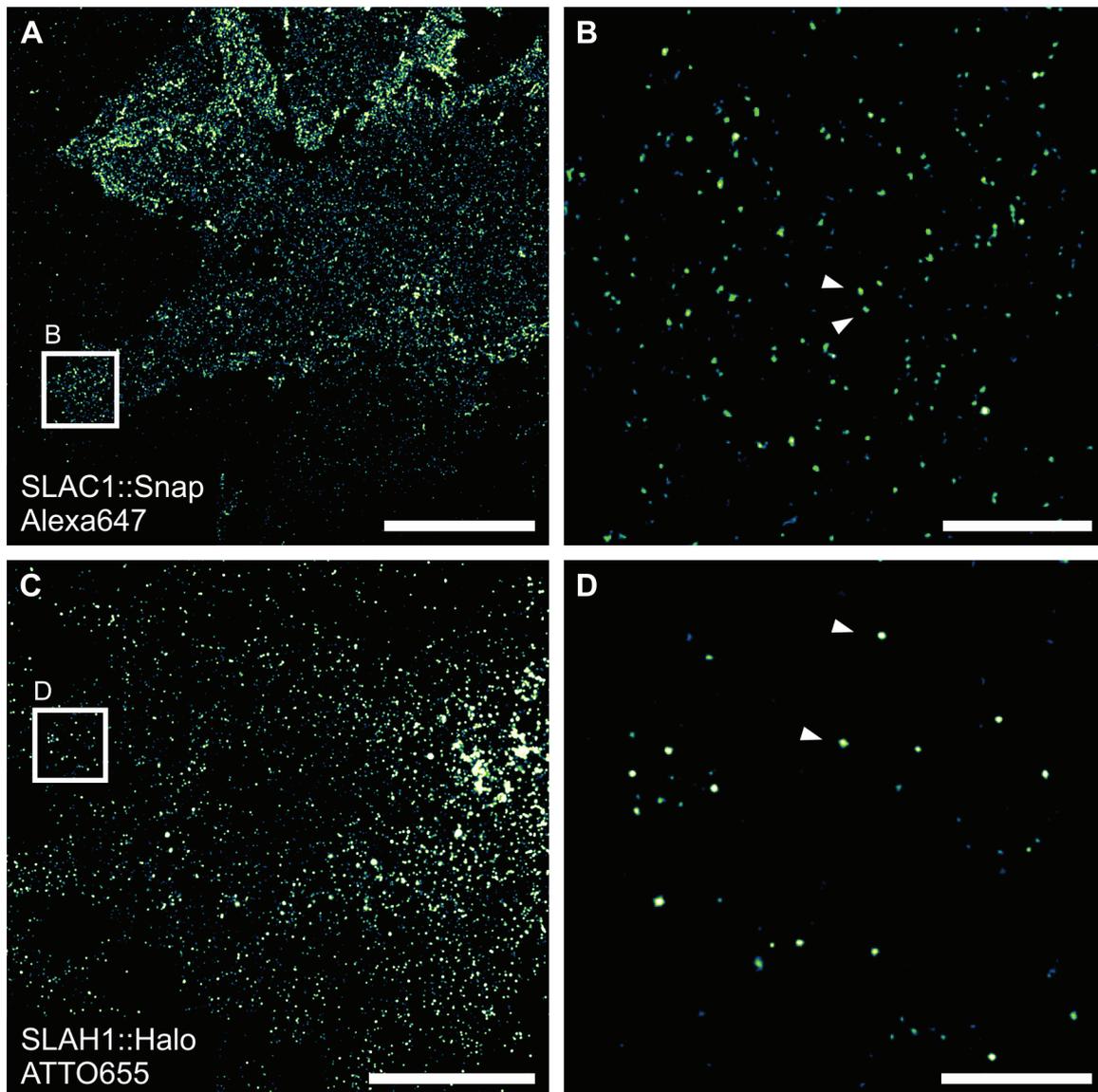


Abb. 4.26: Hochaufgelöste Darstellung von SLAC1 und SLAH1 in COS7-Zellen. *d*STORM-Aufnahmen der Anionenkanäle in der basalen Plasmamembran (TIRF-Beleuchtung). Die Herstellung von SLAC/SLAH-Tag Konstrukten ermöglicht die Färbung mit anorganischen Farbstoffen (**A**) SLAC1::Snap gefärbt mit Alexa647 und (**C**) SLAH1::Halo mit ATTO655, (**B und D**) sowie die jeweiligen Detailansichten. Die unterschiedlichen Tags (Snap/Halo), Farbstoffe und Anionenkanäle zeigen eine vergleichbare strukturelle Verteilung. Die SLAC/SLAHs sind dabei in der Plasmamembran lokalisiert und gleichmäßig über die Membranfläche verteilt. Mit Hilfe der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie kann die ultrastrukturelle Verteilung der Kanäle in kleineren Untergruppierungen (*cluster*) aufgelöst werden (◄), was Grundlage für die Analyse des Oligomerisierungsgrades von Proteinen ist. Anhand der *d*STORM-Aufnahmen sind jedoch keine Rückschlüsse auf den Oligomerisierungsgrad des Proteins möglich. Maßstabsbalken= 10 μ m (Übersichten)/1 μ m (Detailansichten).

Es wurden unterschiedliche Konstrukte hergestellt (s. Kapitel 3.1 „Plasmid-Amplifizierung, Transformation und-Aufreinigung“) und gemessen. In Abb. 4.26 und Abb. 4.27 sind beispielhaft die Aufnahmen von SLAC1::Snap gefärbt mit Alexa647 (A)), SLAH1::Halo mit ATTO655 (C)), SLAH3-G264D::Halo (eine infunktionelle Mutante von SLAH3) mit ATTO655 (E)) und als vergleichende Kontrolle den Zuckertransporter ZmSUT1 [212] als Tag-Konstrukt ZmSUT1::Snap gefärbt mit Alexa647 (G)). Die *d*STORM-Bilder der Anionenkanäle zeigen eine vergleichbare Verteilung über die Plasmamembran. Betrachtet man dabei die Detailansichten (B), D) und F)), sind durchwegs vereinzelte Gruppierungen (*cluster*) sichtbar. Die Vermessung dieser Gruppierungen von SLAH1 ergeben ein mittleres FWHM von 29 ± 2 nm in einem Bereich von $\min 12 \pm 1$ nm bis $\max 46 \pm 1$ nm ($n=31$; angegeben ist der mittlere Standardfehler). Auffällig war, dass man durch die Inkubationszeit nach Transfektion die Dichte der Gruppierungen auf der Plasmamembran sehr effizient beeinflussen konnte (vgl. SLAC1 (B), lange Inkubationszeit) mit SLAH1 und SLAH3-D256G (D) und F), kurze Inkubationszeit)). Im Gegensatz hierzu sind in der Abbildung von ZmSUT1 keine vereinzelten Gruppierungen erkennbar (H)). Das Fluoreszenzsignal ist so dicht über die Plasmamembran verteilt, dass man diese selbst anhand der *d*STORM-Bilder nicht voneinander trennen kann.

Die *d*STORM Bilder belegen, dass sich die Anionenkanäle einzeln, also nicht als Ansammlung größerer Mengen des Proteins (mit <24 Kanälen), in der Plasmamembran befinden, da sich die Größe (FWHM) der Gruppierungen im Bereich der Auflösungsgrenze der *d*STORM-Aufnahme befindet (~ 10 - 50 nm). Ob es sich dabei um Einzelkanäle oder Polymere dieser Kanäle handelt, bleibt aber offen, da der Durchmesser eines Trimers von *HiTehA*, einem bakteriellen Ortholog von SLAC1, $\sim 9,5$ nm beträgt (95 \AA ; beziehungsweise einer Fläche von 8947 \AA^2) [3] und somit unterhalb der Auflösungsgrenze der *d*STORM-Aufnahme liegt. Die kreisförmige Fläche der vermessenen Gruppierungen von SLAH1 beträgt im Mittel $\sim 700 \text{ nm}^2$. In Anbetracht der Lokalisationspräzision von 10 nm (FWHM- 10 nm) lässt sich bei einer kreisförmigen Verteilung (wie die der zu sehenden Gruppierungen) die Position der Fluorophore auf einen Bereich in der Mitte von $65 \pm 30 \text{ nm}^2$ vorausberechnen. Auf einer solchen Fläche befinden sich durchschnittlich sehr wahrscheinlich 1-3 Anionenkanäle, korreliert man diese mit der Fläche des trimerischen *HiTehA*. Die Inkubationszeiten nach Transfektion wurden von diesen Versuchen für die Oligomerisierungsanalysen mittels PALM übernommen. Eine Oligomerisierungsbestimmung von ZmSUT1 wäre unter den gezeigten Bedingungen aufgrund der Dichte des Signals nicht möglich, veranschaulicht aber die korrekte Expression, die homogene Verteilung und den zielgerichteten Einbau eines pflanzlichen Zuckertransporters in die Plasmamembran einer Säugerzelle und bestätigt die großen Mengen des Transporters in der Zellmembran im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten [213].

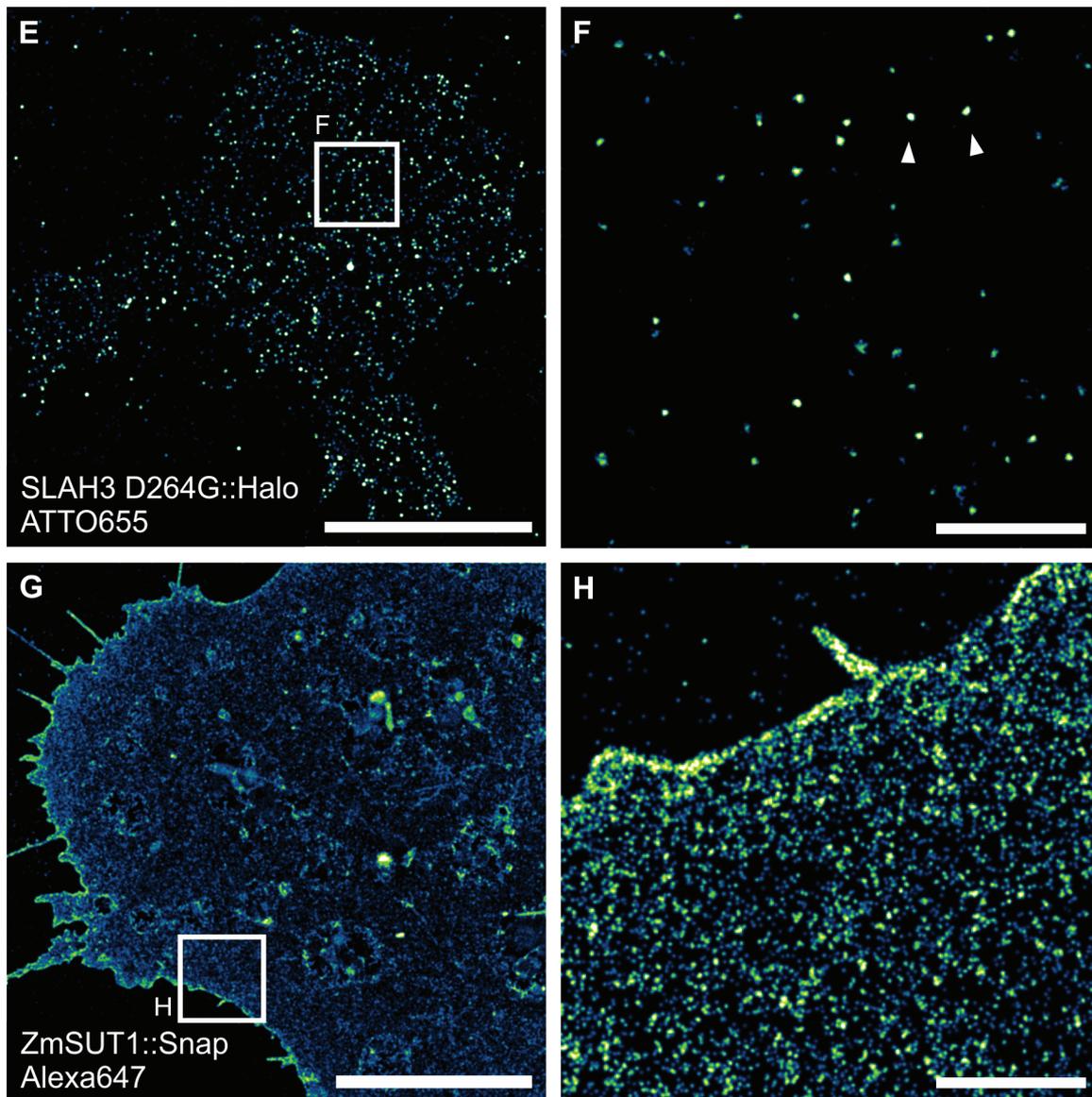


Abb. 4.27: dSTORM-Abbildungen von SLAH3 und dem pflanzlichen Zuckertransporter ZmSUT1 in COS7-Zellen. (E und F) Die lokalisationsmikroskopische Aufnahme von SLAH3-G264D zeigt die ultrastrukturelle Verteilung der Mutante, welche gleichmäßig in Kleingruppierungen (◄) und somit identisch mit den funktionellen SLAC/SLAH-Verwandten ist. Bezüglich der Expression und Lokalisation lässt dies den Rückschluss zu, dass eine unfunktionelle Proteinmutante ebenfalls korrekt in der Plasmamembran lokalisiert ist. **(G und H)** ZmSUT1 ist homogen über die Plasmamembran verteilt und in extrem hohem Maße in der Plasmamembran vertreten. Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen ist bei entsprechender Dichte nicht möglich. Mit ZmSUT1 konnte anhand eines SLAC/SLAH-fremden Proteins ebenfalls die korrekte Expression eines pflanzlichen Membranproteins in COS7-Zellen gezeigt werden. Maßstabsbalken= 10 µm (Übersichten)/1 µm (Detailansichten).

Patch-Clamp Experimente von SLAH3-mEOS

Die Patch-Clamp Experimente wurden von Piv.-Doz. Dr. Ulrich Terpitz durchgeführt. Da die Membranständigkeit bereits bewiesen werden konnte, waren diese Vorversuche für die folgenden Oligomerisierungsanalysen essentiell, da es integrale Grundlage war, dass die untersuchten Kanäle in COS7-Zellen funktionell exprimiert waren. Hierbei wurde die Aktivität des SLAH3::mEOS2-Konstrukts nach zytosolischer Ansäuerung elektro-physiologisch überprüft.

Anhand der Ganzzellen (*whole-cell*) Patch-clamp Messungen konnte die pH-abhängige Aktivierung von SLAH3 durch die typischen S-Typ-Anionenkanalströme gezeigt werden und bestätigen zudem die Ergebnisse von vergleichbaren Messungen in *Xenopus laevis* Oozyten [21]. Neben dem pH-Wert benötigt SLAH3 für die Aktivierbarkeit extrazelluläres Nitrat [20, 23, 214]. Deshalb wurden die Messung in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat und einem zytosolischen pH von 5,6 durchgeführt, um die Aktivierbarkeit von SLAH3 zu gewährleisten. Zu sehen ist die Stromantwort von SLAH3::mEOS2 auf Spannungssprünge von -160 mV bis +60 mV in 20 mV Schritten (s. Abb. 4.28 A)). Zur besseren Vergleichbarkeit der Kanalaktivität ist die I-V-Auftragung der Messungen in B) gezeigt. Die Kontrolle (rot) wurde in Abwesenheit von Nitrat, der aktive Kanal (schwarz) wurde in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat gemessen. Aufgetragen ist das Stromstärkesignal, 600 ms nach Initiierung des jeweiligen Spannungsschritts (n=5 Experimente, angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung).

Man erkennt, dass SLAH3::mEOS2 in Abwesenheit von Nitrat keine Aktivität zeigt. Dagegen konnten in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat, typische, makroskopische S-Typ Anionenkanalströme von 1,5 nA bei -120 mV und ~1 nA bei +40 mV aufgezeichnet werden. Dadurch konnte die Funktionalität des SLAH3::mEOS2 Konstrukts in COS7-Zellen bewiesen sowie die korrekte Plasmamembran-Lokalisation aus den vorherigen mikroskopischen Studien bestätigt werden.

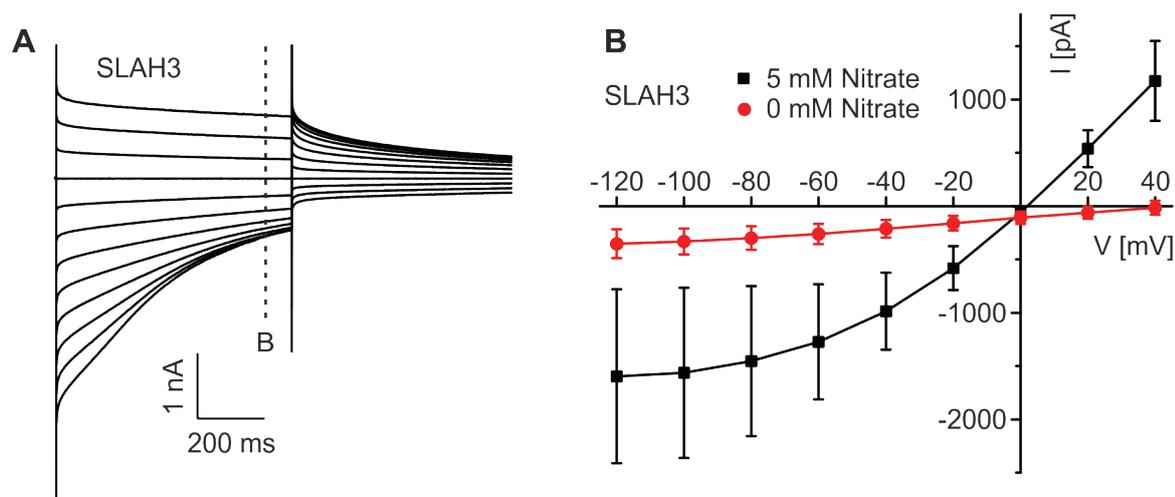


Abb. 4.28: Elektrophysiologische Funktionsprüfung von SLAH3::mEOS2 in COS7-Zellen. (A) Zu sehen ist die Antwort von SLAH3::mEOS2 auf die schrittweise applizierten Spannungen (-160 mV bis +60 mV; je 20 mV). Die Messung wurde bei Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat und einem pH von 5,6 durchgeführt. **(B)** Zur besseren Vergleichbarkeit der Kanalaktivität ist die Strom-Spannungs- (I-V-) Auftragung der Messungen gezeigt. Bei der Kontrolle (rot) bleibt SLAH3 in Abwesenheit von Nitrat inaktiv und zeigt keine wesentliche Stromänderung auf die Spannungsänderung. Dagegen ist die typische, von den Spannungsschritten abhängige Antwort in Anwesenheit von Nitrat von SLAH3 sichtbar (schwarz) und zeigt dessen resultierende Aktivität mit Strömen von $\sim 1,5$ nA bei -120 mV und ~ 1 nA bei +40 mV. Dies beweist die elektrophysiologische Funktionalität des SLAH3::mEOS2 Konstrukts in COS7-Zellen. Aufgetragen ist das Stromstärke-signal, 600 ms nach Initiierung des jeweiligen Spannungsschritts (-----). (n= 5 Experimente, angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung).

Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von SLAC/SLAH-Proteinen mittels PALM

Eine der wichtigsten Fragestellungen in dieser Arbeit war der Oligomerisierungsgrad und die Stöchiometrie der SLAC/SLAH-Proteine. Frühere Studien und Vorversuche ließen einen funktionellen Zusammenhang zwischen Oligomerisierungsgrad beziehungsweise Interaktion der Homologe und Kanal-Aktivität vermuten. Wichtige Hinweise auf eine Polymerisierung von SLAC/SLAH Untereinheiten lieferte die Kristallstruktur des bakteriellen Ortholog *HiTehA* von SLAC1 [3]. Anhand dieser Kristallstruktur wurde klar, dass diese strukturelle Familie von Anionenkanäle aus mehreren Untereinheiten besteht, obwohl jede Untereinheit eine eigene Pore besitzt. *HiTehA* wurde als Trimer kristallisiert. Ob pflanzliche Orthologe ebenfalls Trimere bilden und ob Heteromere zwischen allen fünf Arabidopsis SLAC/SLAH Anionenkanaluntereinheiten gebildet werden können war zu Beginn meiner Arbeit völlig unbekannt. Erste Hinweise auf eine Heteromerisierung zwischen SLAH1 und SLAH3 [24] beziehungsweise SLAH4 und SLAH3 wurden durch Coexpressionsversuche und elektrophysiologische Charakterisierungen in *Xenopus laevis* Oozyten erlangt. Allerdings wurde auch bei diesen Versuchen nicht klar, ob es sich um heteromere Dimere oder Trimere handelt und ob der Polymerisierungsgrad fix oder dynamisch reguliert ist. Aufgrund der vorangegangenen Kontrollversuche (CLSM, dSTORM, Patch-Clamp) war die Anwendbarkeit der Stöchiometrie-Analysen von SLAC/SLAHs in COS7-Zellen mittels PALM gegeben. Anhand von PALM-Studien konnte bereits der Oligomerisierungsgrad verschiedener Proteine (CD86, CTLA4, VSVG, CD80) bestimmt und bestätigt werden [37] sowie die stöchiometrische Verteilung von TLR4 und dessen Veränderlichkeit bei Anwesenheit sekundärer Interaktionspartner erhoben werden [215]. Die stöchiometrischen Analysen waren dabei robust und für alle bisher untersuchten Proteine anwendbar [216].

Zur Kalibrierung des Messaufbaus (Einstellung Messparameter: Laserleistung, Aufnahmedauer, Belichtungszeit etc.) und zur Erhebung stöchiometrischer Daten eines unbekanntes Proteins ist die Analyse von bekannten Proteinen wie die des monomeren CD86 und des dimerischen CTLA4 eine grundlegende Voraussetzung. Dabei ist vor allem die fundierte Definition der Variablen p und q der negativ binomialen Anpassungsfunktion für Oligomerisierungsanalysen (s. Kapitel 3.9.1 „Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisations-mikroskopischen Messungen“) von höchster Wichtigkeit, da diese für jeden Messaufbau unterschiedlich sind. Mithilfe der Anpassungsfunktion können die Daten angenähert werden, und basierend darauf kann dann die stöchiometrische Verteilung und damit der Oligomerisierungsgrad eines unbekanntes Proteins bestimmt werden. Hierfür wurde die „Anzahl Lokalisationen innerhalb eines Clusters“ von mindestens 1000 Clustern des jeweiligen Konstrukts bestimmt. Dieser Datensatz wurde dann nach der „Anzahl der Lokalisationen“

histogrammiert und mit der Anpassungsfunktion beschrieben. Diese Histogramme mit Anpassungsfunktion sind im Folgenden gezeigt, um die Stöchiometrie des untersuchten Proteins zu veranschaulichen. Zusätzlich sind Kuchendiagramme abgebildet, um die stöchiometrische Verteilung zwischen Mono- oder Polymeren zu veranschaulichen. Das Kuchendiagramm zeigt dabei die Verteilung der Proteine verhältnismäßig (360°= Gesamtbetrag %). Da der prozentuale Gesamtbetrag aufgrund der Fehler unter/ oberhalb 100 % liegen konnte, wurden die Kuchenstücke im Verhältnis angepasst (beispielsweise wurden 45 ± 10 % Monomer zu 45 ± 6 % Dimer als 50:50 im Kuchendiagramm dargestellt, die Standardfehler (± 10 %/ ± 6 %) wurde dabei nicht miteinbezogen oder dargestellt). Außerdem ist wichtig, dass in den Diagrammen die Verhältnismäßigkeit der Polymere angegeben ist und nicht die der in den Polymeren befindlichen Einzelproteine. Das bedeutet, dass sich bei einer 50 %/50 % Monomer-/Dimer-Verteilung, 33 % der Einzelproteine in einem Monomer und 67 % der Einzelproteine in einem Dimer befinden. Die methodische Vorgehensweise und die resultierenden Messparameter sind in den Kapiteln 1.2 „PALM-Messungen zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen“ und 3.9.1 „Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen und Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von Proteinen anhand von lokalisations-mikroskopischen Messungen“ detailliert beschrieben.

Um den Oligomerisierungsgrad zu bestimmen, wurden PALM-Aufnahmen der entsprechenden Konstrukte durchgeführt. Für die Rekonstruktion des hochaufgelösten Bildes wurden die Beugungsscheibchen der Fluorophore (mEOS2) mit einem FWHM von 320 nm lokalisiert. Man geht hierbei von einer Lokalisationspräzision von ≤ 90 nm aus [37]. Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades ist es wichtig, die Emissionen zu verfolgen und Lokalisationsgruppen zu Einzellokalisationen zusammenzufassen (s. Kapitel 3.9.1 „Emissionen verfolgen“). Lokalisationsgruppen wurden zusammengefasst, sobald Einzellokalisationen dabei in einem Umkreis von ≤ 90 nm (was der Lokalisationpräzision entspricht) in mindestens 3 aufeinander folgenden Einzelbildern verzeichnet wurden. Die Zusammenfassung der Lokalisationsgruppen wurde unterbrochen, sobald keine Lokalisation für mindestens 3 Einzelbilder in diesem Bereich verzeichnet wurde (s. Abb. 4.29). Anhand der Stöchiometriebestimmung von CD86 und CTLA4 wurden die Messparameter angepasst, um das notwendige photophysikalische Verhalten von mEOS2 zu generieren. Wie oben bereits beschrieben, lag der Schwerpunkt dabei auf der richtigen Einstellung der Anregungslaserleistungen. Zum einen soll die Laserleistung des 405 nm Laser so eingestellt sein, dass nur wenige mEOS2 pro Zeiteinheit konvertiert werden um Doppellokalisationen mehrerer Fluorophore im Sinne des Rayleigh-Kriteriums auszuschleissen und genug mEOS2 zu konvertieren, um die PALM-Messung möglichst kurz zu halten. Zum anderen soll die Laserleistung des 560 nm Anregungslasers so gering eingestellt werden, dass mEOS2 mindestens 3 Frames lang fluoresziert und so hoch, dass mEOS2 „blinkt“ und nach einer Zeit photogebleicht wird.

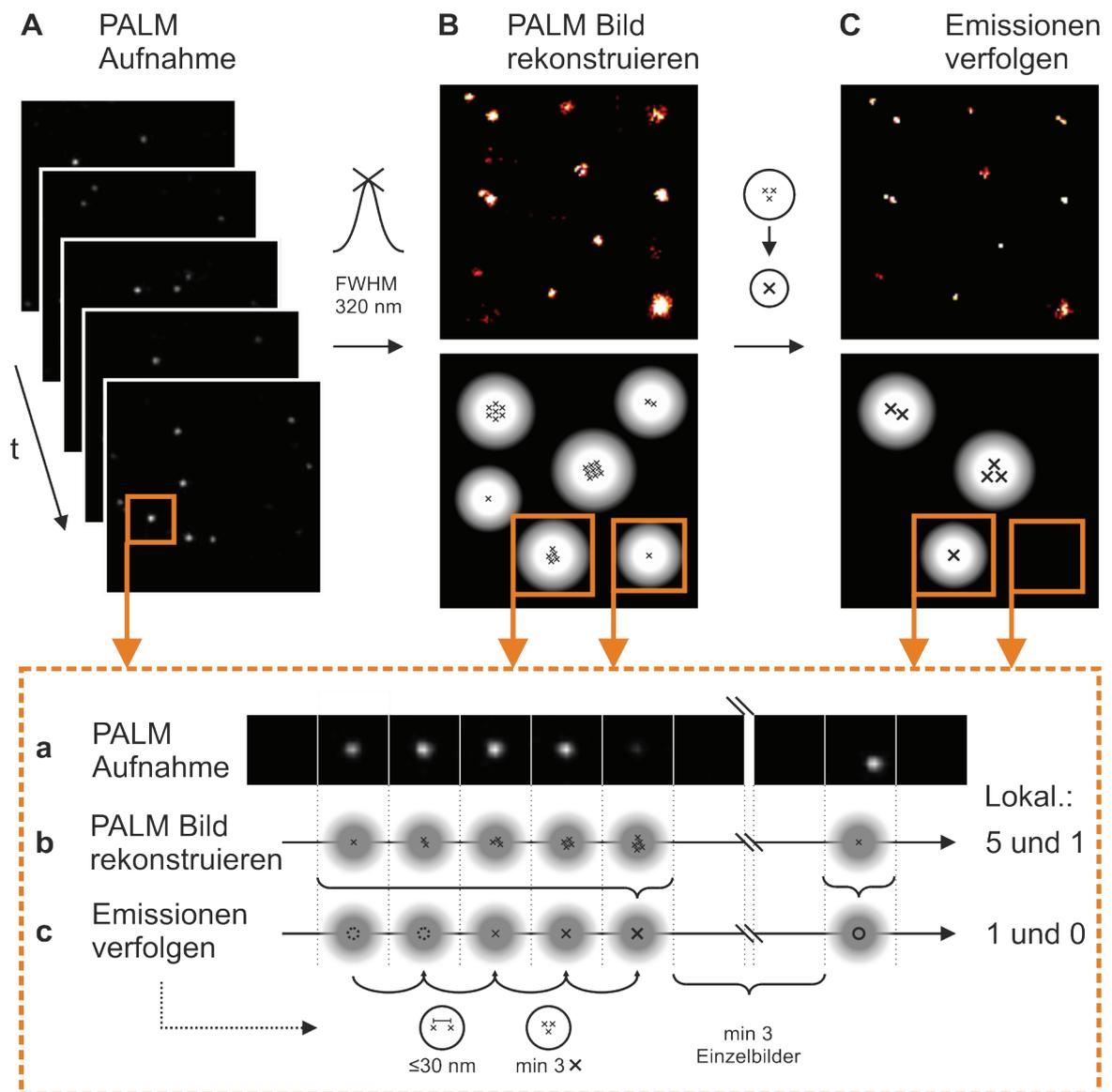


Abb. 4.29: Vorgehen für die Verfolgung der Emissionen (Beugungsscheibchen der Fluorophore) zwischen Einzelbildern und Anpassung der PALM-Daten für die Stöchiometrieanalyse. Für die Bestimmung von Proteinstöchiometrien müssen die Lokalisationsdaten bearbeitet und Einzelmoleküle zusammengefasst werden. **(A)** In der konventionelle PALM-Messung werden **(a)** die Fluorophore detektiert. **(B)** Für die Rekonstruktion des hochaufgelösten Bildes werden alle Fluorophore unabhängig voneinander mit einer zweidimensionalen Gaussion angepasst (der Parameter FWHM wird auf 320 nm festgesetzt) und eine Koordinatenliste der Lokalisierungen erstellt. **(b)** Dies führt zu Mehrfachlokalisationen von Einzelfluorophoren (beispielsweise 5) wenn dieser sich über mehrere Einzelbilder im An-Zustand befunden hatte. **(C und c)** Diese Mehrfachlokalisationen wurden anhand der Koordinatenliste zu einzelnen Lokalisierungen zusammengefasst, sofern in aufeinanderfolgenden Einzelbildern in einem Umkreis von 30 nm wiederholt detektiert. Zudem wurden bei diesem Prozess Einzellokalisationen verworfen, welche weniger als 3 mal in aufeinander folgenden Bildern lokalisiert wurden. Die Verfolgung der jeweiligen Emissionen wird unterbrochen, sobald kein Fluorophor für mindestens 3 Einzelbilder unter oben genannten Bedingungen lokalisiert wurde. Ein maximales Limit bei den verfolgten Emissionen wurde nicht eingestellt. Die Messparameter bei PALM-Messungen zur Analyse von Proteinstöchiometrien können so gewählt werden, dass durch die Verfolgung der Emissionen das mEOS2-Fluoreszenzsignal von der Hintergrundgrundfluoreszenz getrennt werden kann. Dies ist für die Qualität der Stöchiometriebestimmung essentiell.

Für die PALM-Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass das Protein von Interesse nicht überexprimiert war (~ 4 Proteincluster/ μm^2 [28]). Die PALM Aufnahmen von CD86 und CTLA4 zeigten eine homogene Verteilung beider Proteine in der Plasmamembran, wobei die einzelnen Cluster deutlich voneinander getrennt werden konnten (s. Abb. 4.30). PALM-Aufnahmen mit zu hoher Signaldichte wurden verworfen. Für die Auswahl der einzelnen Cluster zur Stöchiometriebestimmung wurde zuerst die Position der Zelle im Weißlichtbild kontrolliert (s. Abb. 4.30 WEISS). Ausschließlich im Bereich der Zelle wurden nun Cluster für die Stöchiometriebestimmung ausgewählt (s. Abb. 4.30 PALM/DETAIL, PALM-Aufnahme, nachdem die Emissionen verfolgt wurden).

Die Cluster wurden nach strikten Kriterien ausgewählt (s. Abb. 4.31) und die Anzahl der Lokalisationen innerhalb dieser Cluster bestimmt. In einer untransfizierten Kontrollzelle konnten unter den beschriebenen Kriterien keine Cluster ausgewählt werden (s. Abb. 4.30 Kontrolle).

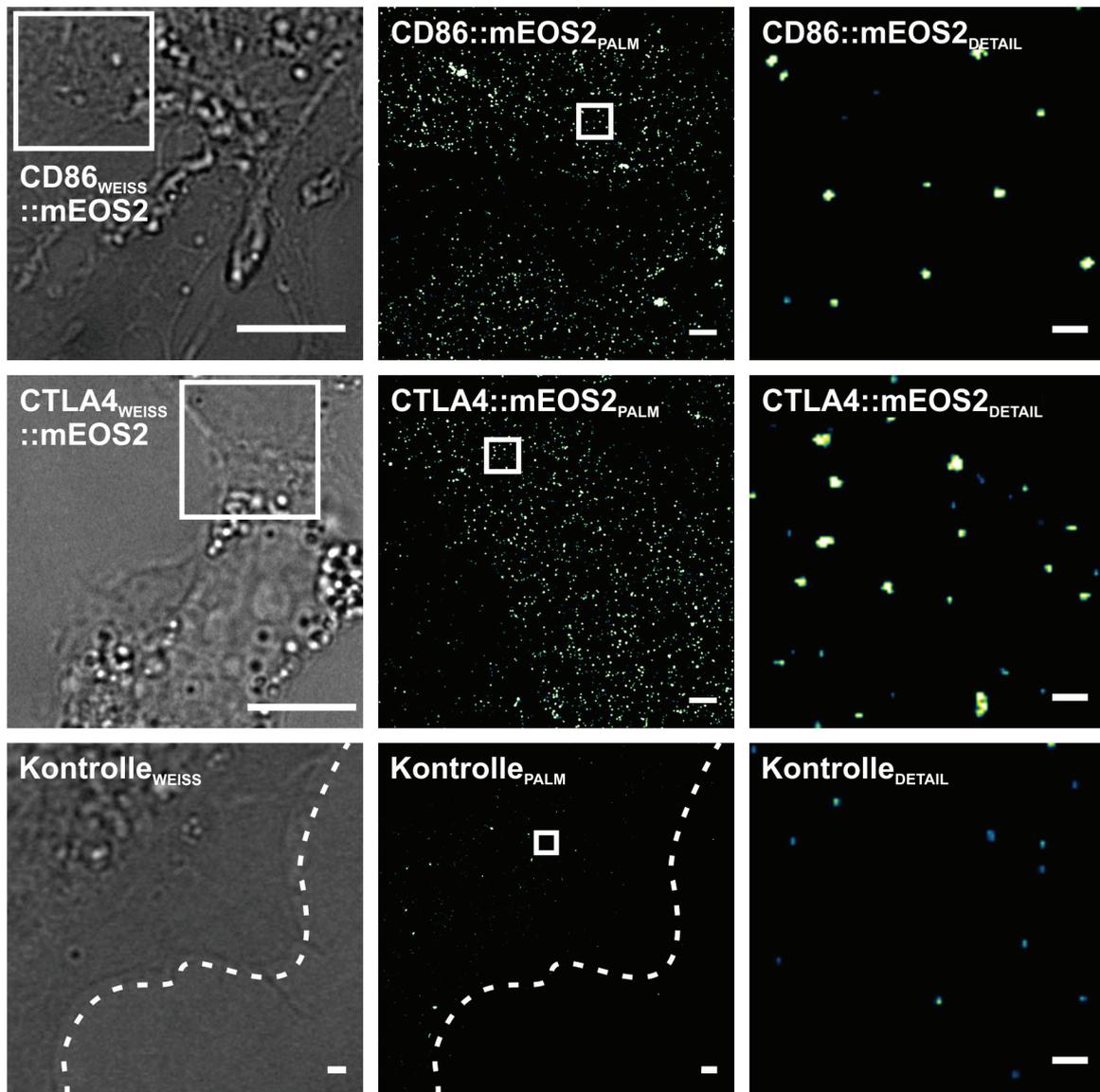


Abb. 4.30: PALM-Aufnahmen der Kontrollen. Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen wurde zur Kalibrierung der Messparameter, PALM-Messungen von dem monomeren CD86::mEOS2 und dem dimerischen CTLA4::mEOS2 durchgeführt. **(WEISS)** Zur leichteren Orientierung bei den späteren Stöchiometrieanalysen wurde zu Beginn einer Messung ein Durchlichtbild (**WEISS**) aufgenommen. Die Verteilung und Dichte der Proteine in der Plasmamembran ist vergleichbar mit bereits publizierten Daten [37] (**PALM/DETAIL**), wodurch in dieser Versuchsreihe das Vorgehen der Probenvorbereitung und die Messparameter festgelegt werden konnten. In alle weiteren Versuchsreihen der SLAC/SLAH-Proteine wurde dann identisch vorgegangen. **(PALM und DETAIL)** Die PALM-Aufnahmen, insbesondere die im Detail zu sehenden Gruppierungen, sind charakteristisch und essentiell für die Stöchiometrieanalyse. In einer untransfizierten Kontrollzelle konnte lediglich Hintergrundsignal detektiert werden, welches bei den Auswahlkriterien der Cluster für die Stöchiometrieanalyse (s. Abb. 4.31) aussortiert wurde. Die weißen Boxen kennzeichnen den Ausschnitt des jeweils rechts liegenden Bildes. Maßstabsbalken= 10 μm (**WEISS**)/1 μm (**PALM**)/0,1 μm (**DETAIL**).

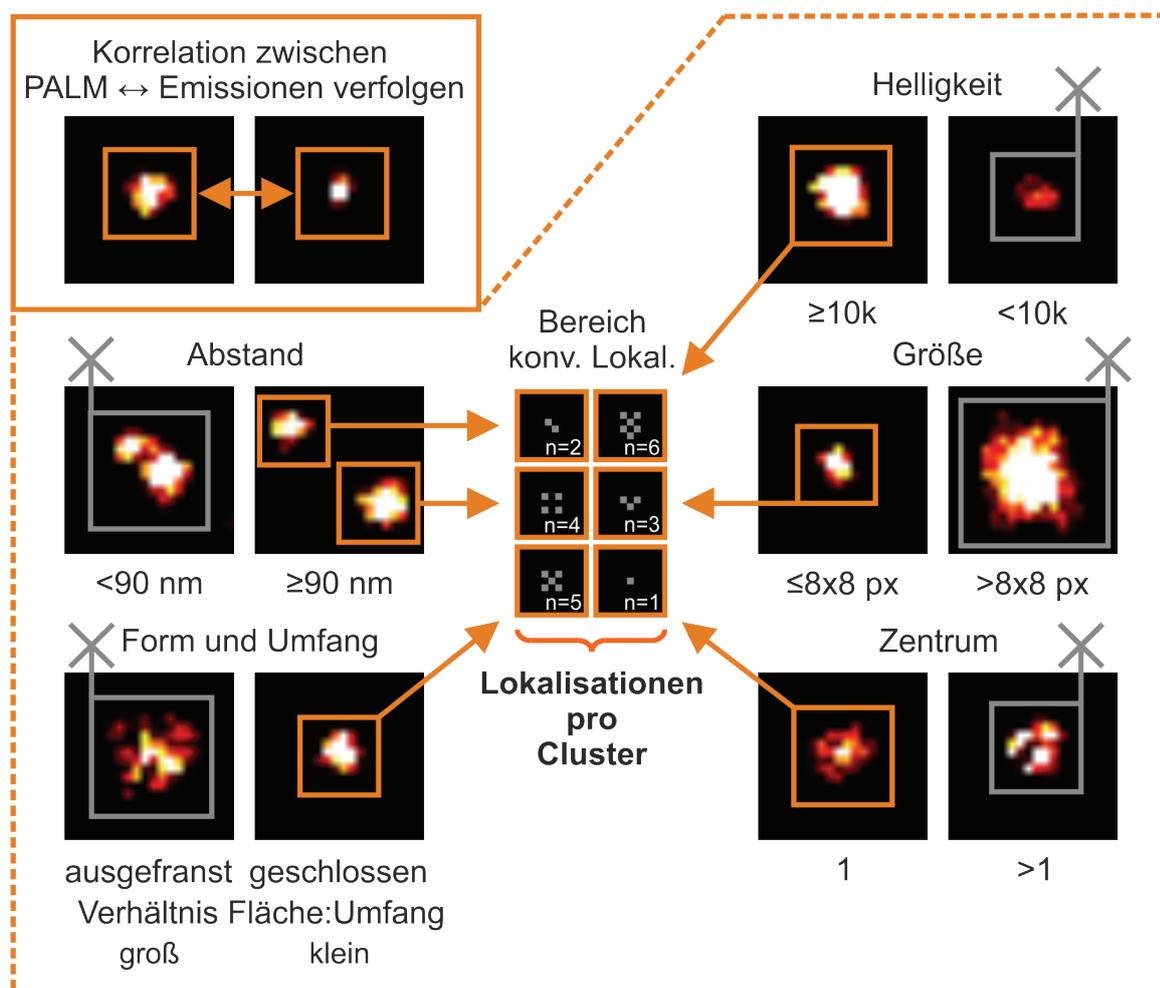


Abb. 4.31: Auswahlkriterien der Cluster für die Stöchiometrieanalyse. Die in den PALM-Aufnahmen sichtbaren Cluster wurden nach strikten Kriterien ausgewählt. **(Korrelation)** Im ersten Schritt wurde dabei die Passung und Übereinanderlagerung der Cluster aus PALM-Aufnahme und dem Bild der verfolgten Emissionen geprüft. Danach wurden Cluster ausgewählt, **(Abstand)** welche einen Mindestabstand von 90 nm zum nächstliegenden Cluster hatten, **(Form und Umfang)** welche einen geschlossenen Umriss zeigten und somit ein kleines Verhältnis von Umfang zu Fläche aufwiesen, **(Helligkeit)** welche eine Helligkeit ihres Zentrums von mindestens 10k zeigten, **(Größe)** welche in ihrer flächigen Ausdehnung nicht größer als 8x8 Pixel waren und **(Zentrum)** welche über ein einzelnes Zentrum verfügten. Ausschließlich in Clustern, welche alle Kriterien gleichermaßen erfüllten, wurde anhand der bildlichen Darstellung der konvertierten Lokalisationen die Anzahl der darin liegenden Lokalisationen bestimmt. Die Anzahl Lokalisationen pro Cluster wurde dann histogrammiert und der Oligomerisierungsgrad des entsprechenden Proteins bestimmt.

Die PALM-Aufnahmen von CD86::mEOS2 und CTLA4::mEOS2 wurden mit verschiedenen Messparametern durchgeführt, bis die histogrammierte „Anzahl Lokalisationen pro Cluster“ für CD86 die charakteristische geometrische Verteilung und für CTLA4 die Verteilung, welche sich sehr gut mit einer negativen Binomialfunktion annähern lässt, zeigten (s. Abb. 4.32). Zum einen konnten die Messungen aus [37] bestätigt und reproduziert werden, welche CD86 als Monomer und CTLA4 als Dimer charakterisieren. Zum anderen konnten die Variablen $p = 0,29 \pm 0,002$ (aus Anpassung von CD86, Formel 1, angegeben ist der Standardfehler) und $q = 0,26 \pm 0,01$ (aus Anpassung von CTLA4, Formel 2, angegeben ist der Standardfehler) ermittelt werden. Die Stichprobenanzahl wurde dafür sehr hoch angesetzt (CD86::mEOS2: $n_{\text{Zellen}(\text{CD86})} = 14$, $n_{\text{Cluster}(\text{CD86})} = 8016$; CTLA4::mEOS2: $n_{\text{Zellen}(\text{CTLA4})} = 12$, $n_{\text{Cluster}(\text{CTLA4})} = 2046$; Kontrolle: $n_{\text{Zellen}(\text{Kontrolle})} = 7$), da alle weiteren Stöchiometrien mit den fixierten Variablen p und q bestimmt wurden. Zur Beurteilung der Güte der Anpassungskurven wurde der Determinationskoeffizient R^2 bestimmt [217], betrug für $R^2_p(\text{CD86}) = 99,84\%$ und $R^2_q(\text{CTLA4}) = 99,32\%$ und war damit ausreichend hoch.

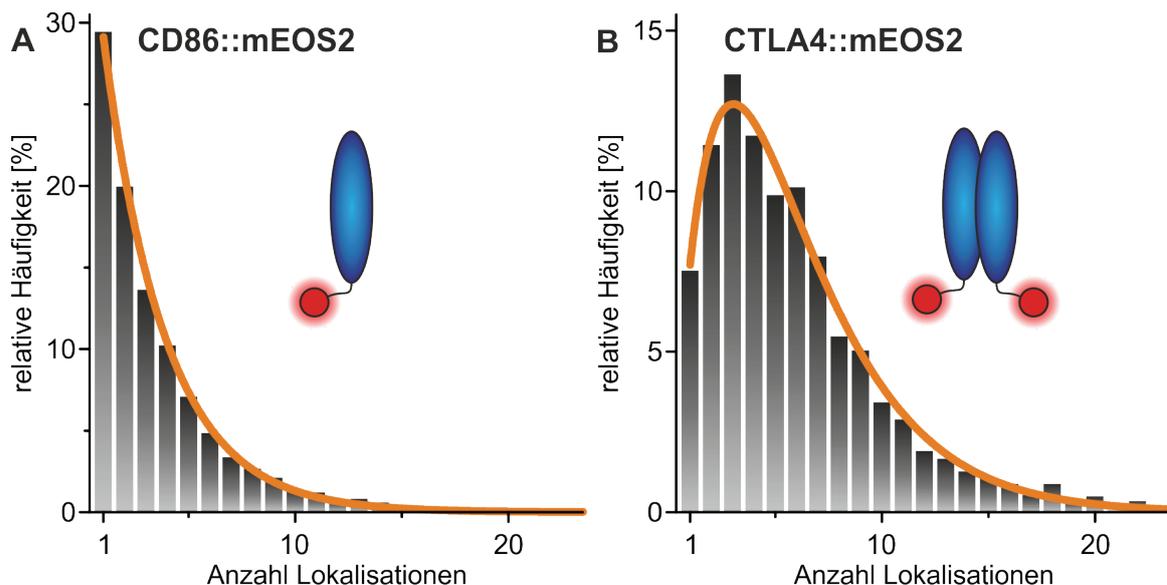


Abb. 4.32: Referenzstöchiometrie von CD86::mEOS2 und CTLA4::mEOS2. Gezeigt sind jeweils die Histogramme der „Anzahl Lokalisationen“ der analysierten Cluster. Die Stöchiometrieanalyse des monomeren CD86::mEOS2 und des dimeren CTLA4::mEOS2 sind für die Festlegung der Fitparameter p und q essentiell, um unbekannte Proteinstöchiometrien bestimmen zu können. **(A)** Die Daten von CD86::mEOS2 wurden mit der Anpassungsfunktion Monomer (Formel 1) angenähert (orange), wodurch der Fitparameter $p = 0,29$ bestimmt werden konnte. Die Anpassungsfunktion zeigt den charakteristischen geometrischen Kurvenverlauf [37]. **(B)** Die histogrammierten „Anzahl Lokalisationen“ von CTLA4::mEOS2 wurden mit der Anpassungsfunktion Dimer (Formel 2) angepasst (orange). Die Daten zeigen die charakteristische negativ-binomiale Verteilung eines Dimers [37]. Für die Anpassung wurde der Fitparameter p fixiert (aus der CD86::mEOS2 Analyse), wodurch man den zweiten Fitparameter $q = 0,26$ erhielt. Alle weiteren Stöchiometrieanalysen wurden mit diesen Fitparametern durchgeführt.

Für alle weiteren PALM-Messungen wurden die vorher etablierten Messparameter sowie die Probenpräparation übernommen. Die strukturelle Verteilung der Anionenkanäle in *d*STORM und PALM-Aufnahmen war durchwegs vergleichbar, weshalb stöchiometrische Analysen möglich waren. In Abb. 4.33 sind die PALM-Aufnahmen von SLAH3::mEOS2 sowie nach Ansäuerung mit NaAc gezeigt (da cytosolische Ansäuerung zur Aktivierung von SLAH3 führt (s.o.)). Analysiert man nun die Anzahl der Lokalisationen innerhalb dieser Cluster (s. Abb. 4.34 A) und B)), ist ein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen erkennbar. SLAH3::mEOS2 liegt bei neutralem zytosolischem pH mit $76 \pm 5 \%$ hauptsächlich als Homodimer vor ($n_{Z(H3)}=15$, $n_{C(H3)}=8008$, $R^2_{H3}=99,556 \%$). Wurde die Probe vor Fixierung angesäuert, monomerisiert SLAH3::mEOS2 (Monomer: $67 \pm 2 \%$, $n_{Z(H3+NaAc)}=13$, $n_{C(H3+NaAc)}=7026$, $R^2_{H3+NaAc}=99,66 \%$). Höherwertige Polymere, wie etwa Trimere, konnten nicht festgestellt werden.

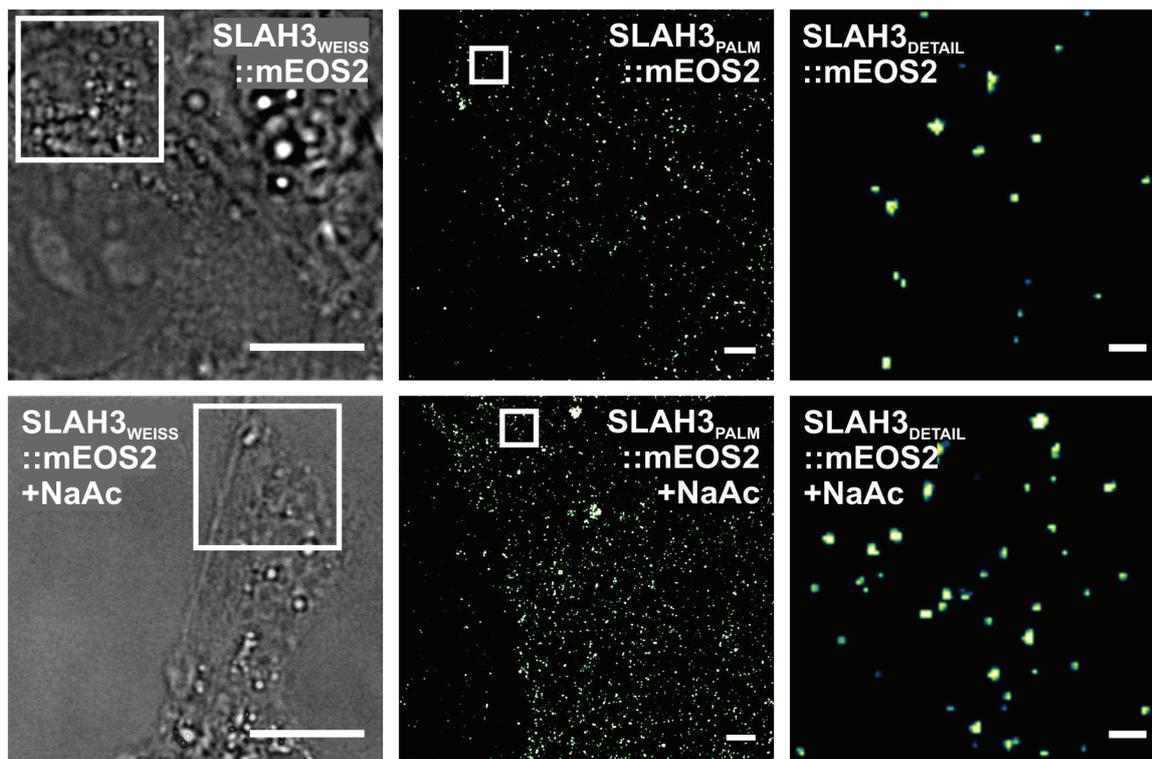


Abb. 4.33: PALM-Aufnahmen von SLAH3::mEOS2 bei neutralem pH und unter Einfluss von zytosolischer Ansäuerung. (WEISS) Anhand der Durchlichtaufnahme kann die transfizierte Zelle lokalisiert werden. **(PALM und DETAIL)** Die PALM-Aufnahmen zeigen die Gruppierungen von SLAH3::mEOS2 in der Plasmamembran von COS7-Zellen und dessen korrekte Expression. Die weißen Boxen kennzeichnen den Ausschnitt des jeweils rechts liegenden Bildes. Maßstabsbalken= 10 μm (WEISS)/1 μm (PALM)/0,1 μm (DETAIL).

Strukturell ist bereits eine Veränderung der Halbwertsbreite der Clustergröße (FWHM) für SLAH3::mEOS2 feststellbar und beträgt für SLAH3::mEOS2 24 ± 4 nm und für SLAH3::mEOS2 nach Behandlung mit NaAc 20 ± 2 nm ($n_{C(\text{beide Stichproben})} = 145$; mittlerer Standardfehler). Dieser Unterschied ist signifikant (T-Test: $p < 0,1\%$), eine Halbierung der Clustergröße zeigt sich jedoch nicht, da die Monomerisierung von SLAH3::mEOS2 unterhalb des Auflösungsvermögens von PALM-Messungen liegt. Im Vergleich dazu konnte für SLAH2::mEOS2 mit 21 ± 2 nm (-NaAc) und 20 ± 2 nm (+NaAc) kein signifikanter (T-Test: $p = 17\%$) Unterschied der Halbwertsbreite der Cluster festgestellt werden ($n_{C(\text{beide Stichproben})} = 157$; mittlerer Standardfehler).

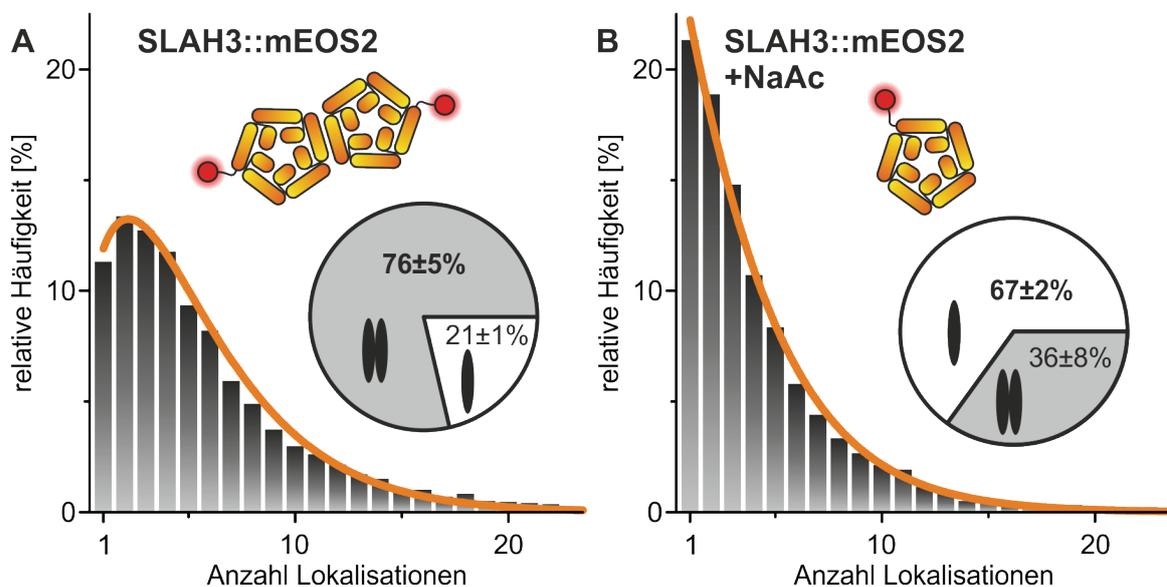


Abb. 4.34: Oligomerisierungsgrad von SLAH3. (A und B) Durch die Quantifizierung der Anzahl Lokalisation innerhalb der in **Abb. 4.33** beispielhaft gezeigten Gruppierungen aus den PALM-Bildern und der histogrammierten Auftragung dieser Daten kann der Oligomerisierungsgrad und dessen Wertigkeit (Monomer/Dimer/Trimer, etc.) mit Hilfe der Anpassung der Daten (orange) bestimmt werden. (A) SLAH3::mEOS2 ist bei neutralem pH elektrophysiologisch inaktiv und liegt mit $76 \pm 5\%$ hauptsächlich als Homodimer vor. ($n_{Z(H3)} = 15$, $n_{C(H3)} = 8008$, $R^2_{H3} = 99,556\%$). (B) Wurde die Probe vor Fixierung angesäuert, monomerisiert SLAH3::mEOS2 (Monomer: $67 \pm 2\%$, $n_{Z(H3+NaAc)} = 13$, $n_{C(H3+NaAc)} = 7026$, $R^2_{H3+NaAc} = 99,66\%$), was unter Anwesenheit von Nitrat zur Aktivierung von SLAH3 führt. Höherwertige Polymere konnten nicht festgestellt werden.

SLAH2 zeigt im Gegensatz zu SLAH3 keine elektrophysiologische Aktivität bei Veränderung des pH-Werts [218]. Die PALM-Aufnahmen sind mit denen von SLAH3::mEOS2 vergleichbar (s. Abb. 4.35). Bei unterschiedlichem pH-Wert zeigt SLAH2::mEOS2 jedoch keine deutliche Veränderung des Oligomerisierungsgrades und liegt mit $89 \pm 15 \%$ bei neutralem und $82 \pm 15 \%$ bei saurem pH maßgeblich als Homodimer vor (pH neutral: $n_{Z(H_2)} = 20$, $n_{C(H_2)} = 2136$, $R^2_{H_2} = 98,37 \%$; saurer pH: $n_{Z(H_2+NaAc)} = 6$, $n_{C(H_2+NaAc)} = 1252$, $R^2_{H_2+NaAc} = 98,34 \%$). Trotzdem ist zu erkennen, dass mit $35 \pm 4 \%$ der monomerische Anteil von SLAH2::mEOS2 zunimmt.

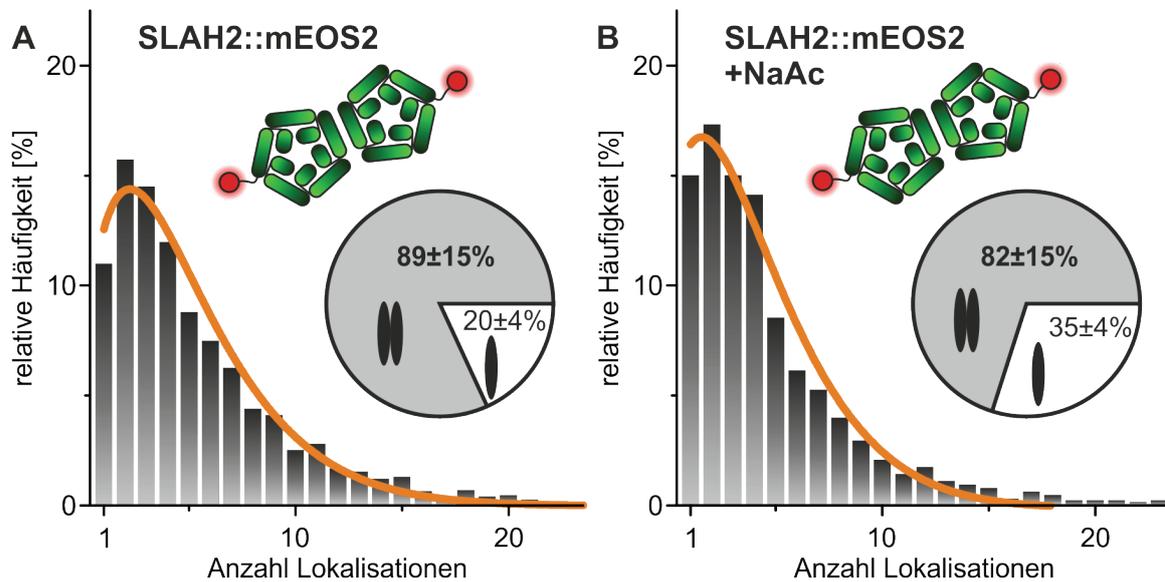
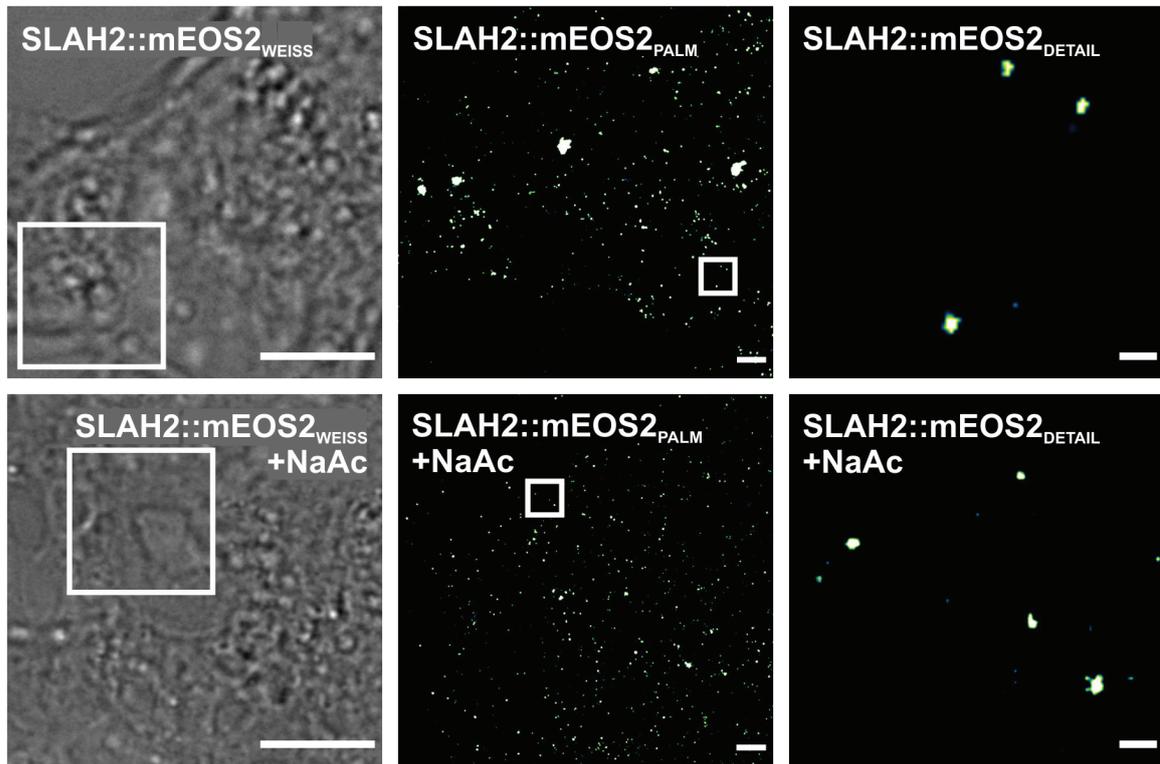


Abb. 4.35: PALM-Aufnahmen und der Oligomerisierungsgrad von SLAH2::mEOS2 bei neutralem pH und unter Einfluss von zytosolischer Ansäuerung. Gezeigt sind beispielhaft die (WEISS) Durchlichtaufnahme und die zugehörigen (PALM und DETAIL) PALM-Aufnahmen von SLAH2::mEOS2, welches in kleineren Gruppierungen in der Plasmamembran von COS7-Zellen vorliegt. (A und B) Bei unterschiedlichem pH-Wert zeigt SLAH2::mEOS2 keine deutliche Veränderung des Oligomerisierungsgrades und liegt mit (A) $89 \pm 15\%$ bei neutralem und zu (B) $82 \pm 15\%$ bei saurem pH, maßgeblich als Homodimer vor (pH neutral: $n_{Z(H2)} = 20$, $n_{C(H2)} = 2136$, $R^2_{H2} = 98,37\%$; saurer pH: $n_{Z(H2+NaAc)} = 6$, $n_{C(H2+NaAc)} = 1252$, $R^2_{H2+NaAc} = 98,34\%$). Für SLAH2 konnte bei elektrophysiologischen Messungen ebenfalls keine Variation der Aktivität bei Veränderung des zytosolischen pHs festgestellt werden [218]. Die weißen Boxen kennzeichnen den Ausschnitt des jeweils rechts liegenden Bildes. Maßstabsbalken= $10 \mu\text{m}$ (WEISS)/ $1 \mu\text{m}$ (PALM)/ $0,1 \mu\text{m}$ (DETAIL).

Im weiteren Verlauf wurde der Oligomerisierungsgrad von SLAH1::mEOS2 und SLAH4::mEOS2 untersucht. Dabei war von besonderem Interesse, ob und in welchem Verhältnis eine Interaktion zwischen SLAH3 und den beiden elektrisch stillen Homologen stattfindet. SLAH1::mEOS2 und SLAH4::mEOS2 konnten jeweils als Monomere charakterisiert werden (s. Abb. 4.36). SLAH1::mEOS2 wurde dabei als P2A-Konstrukt SLAH1::mEOS2--P2A--SLAH1::mEOS2 in den COS7-Zellen exprimiert. Die rein monomerische Verteilung von SLAH1::mEOS2 beweist aufgrund der Trennung der einzelnen SLAH1::mEOS2 zusätzlich die Funktionalität des P2A-Konstrukts [219].

Nun wurde SLAH3 mit SLAH1 und SLAH3 mit SLAH4 (jeweils mit mEOS2 markiert) mit Hilfe eines P2A-Konstrukts exprimiert (s. Abb. 4.36). Das Plasmidkonstrukt gewährleistet dabei, dass beide Proteine zu gleichen Anteilen (50:50) in der Zelle vorhanden waren. Die Verwendung des gleichen Fluorophors für beide Proteine bietet den Vorteil, dass keine unechte Stöchiometrie durch eine unterschiedliche Photophysik der Fluorophore entstehen kann. Daraus resultiert jedoch auch der Nachteil, dass die unterschiedlichen Proteine, insbesondere innerhalb eines Dimers, nicht voneinander zu unterscheiden sind.

Die Interaktion zwischen SLAH1 und SLAH3 ist bereits bekannt. Die Stöchiometrie der beiden Proteine ist zu $74 \pm 10\%$ dimerisch und zu $38 \pm 2\%$ monomerisch ($n_{Z(H3+H1)} = 15$, $n_{C(H3+H1)} = 4655$, $R^2_{H3+H1} = 99,64\%$). Für SLAH3 mit SLAH4 ergibt sich eine Monomer zu Dimer-Verteilung von $54 \pm 1\%$ zu $39 \pm 5\%$ ($n_{Z(H3+H4)} = 19$, $n_{C(H3+H4)} = 7234$, $R^2_{H3+H4} = 99,81\%$).

Berechnet man die Stöchiometrie von SLAH1::mEOS2 oder SLAH4::mEOS2 (100 % Monomer) mit SLAH3::mEOS2 (82 % Dimer; 18 % Monomer) unter der Annahme, dass keine Interaktion stattfindet, ergibt sich eine Verteilung von 59 % zu 41 % Monomer zu Dimer. Das bedeutet im Rückschluss, dass SLAH3 und SLAH1 als Heterodimer interagieren. Für SLAH3 mit SLAH4 kann anhand dieser Daten noch keine definitive Aussage bezüglich einer Heterodimerisierung getroffen werden. Dies liegt der oben beschriebenen Tatsache zugrunde, dass lediglich ein Fluorophor (mEOS2) zur Verfügung steht (s. Kapitel 1.2 Plasmidkonstrukte für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen mittels PALM).

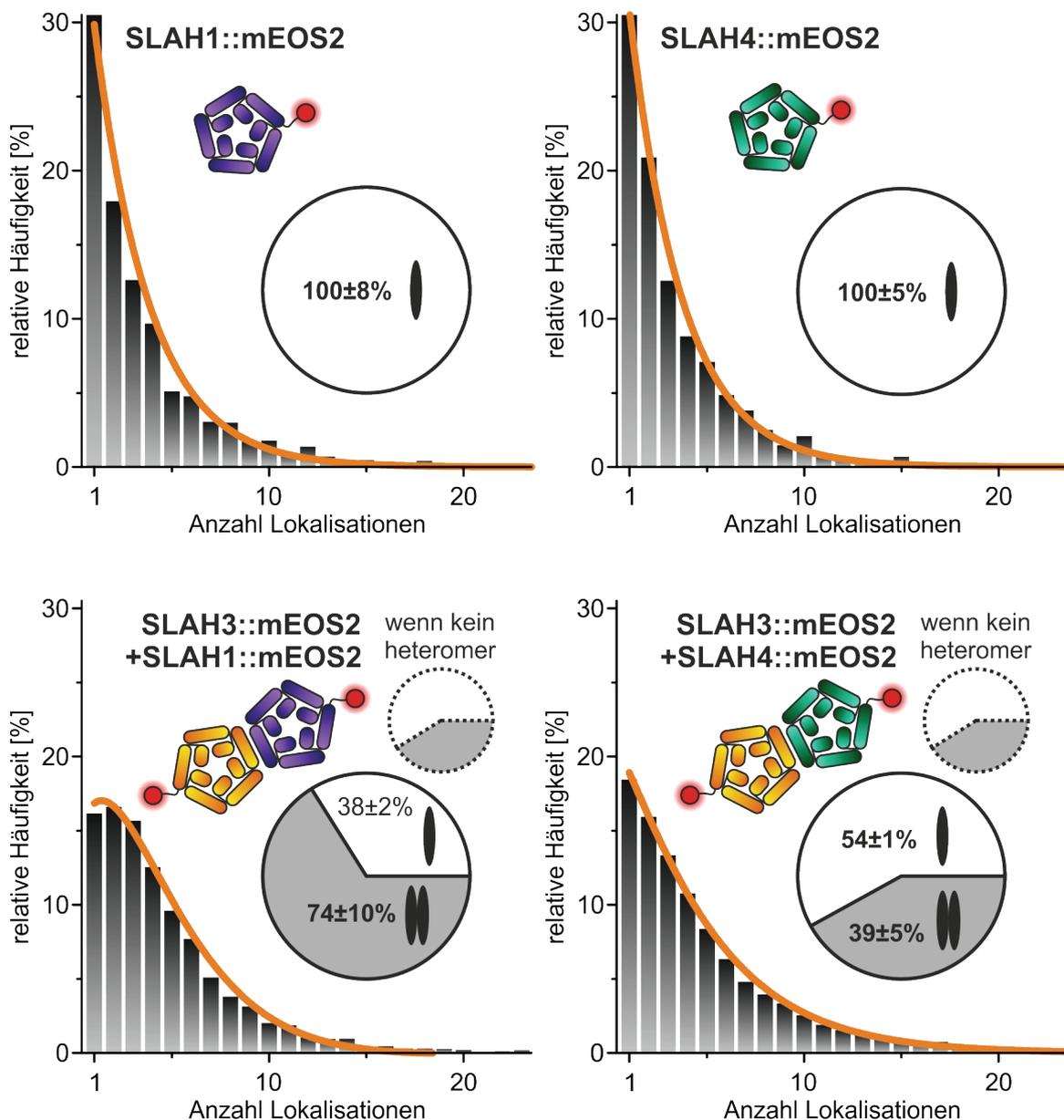


Abb. 4.36: Die Proteinstöchiometrie von SLAH1 und SLAH4, sowie stöchiometrische Interaktionsstudien mit SLAH3. (SLAH1/SLAH4) Die Stöchiometrieanalyse von SLAH1, charakterisiert den Interaktionspartner von SLAH3 ausschließlich als Monomer. **(SLAH4)** liegt ebenfalls als Monomer vor. Um die Stöchiometrie bei Interaktion zu bestimmen, wurde SLAH3 jeweils mit einem der beiden Homologe (SLAH1/SLAH4) mit Hilfe eines P2A-Konstrukts in den COS7-Zellen exprimiert. **(SLAH3+SLAH1)** Dieses Interaktionspaar liegt zu $74 \pm 10\%$ als Dimer vor. Dies beweist, dass SLAH3 mit SLAH1 ein Heterodimer bildet, da eine Berechnung der stöchiometrischen Verteilung von SLAH1 (oder auch SLAH4) (100 % Monomer) mit SLAH3 (82 % Dimer; 18 % Monomer) unter der Annahme, dass keine Interaktion stattfindet eine Verteilung von 59 %/41 % Monomer/Dimer (s. gestricheltes Kreisdiagramm) ergibt. **(SLAH3+SLAH4)** Das bedeutet ebenfalls, dass für SLAH3 mit SLAH4 anhand dieser Daten noch keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, da sich die berechnete Verteilung und die gemessenen Daten nicht unterscheiden. Alle Anionenkanäle sind mit ::mEOS2 markiert und ist aufgrund der besseren Übersichtlichkeit hier nicht gesondert angeführt.

Um die Heterodimerisierung von SLAH3 mit SLAH1/SLAH4 genauer untersuchen zu können, wurden P2A-Konstrukte hergestellt, bei welchen lediglich SLAH3 mit mEOS2 markiert, die Interaktionspartner SLAH1 oder SLAH4 dagegen unmarkiert exprimiert wurden (s. Abb. 4.37). Die Expression des unmarkierten Interaktionspartners ermöglicht dabei die konsequente Unterscheidung ob ein Homo- oder ein Heterodimer gebildet wird. Bildet das gefärbte SLAH3::mEOS2 beispielsweise weiterhin hauptsächlich Homodimere, so zeigt die PALM-Untersuchung auch weiterhin nur eine Dimerverteilung an. Bildet das gefärbte SLAH3::mEOS2 mit dem ungefärbten SLAH1 oder SLAH4 jedoch ausschliesslich Heterodimere ist eine rein monomerische Verteilung zu erwarten.

Für SLAH3::mEOS2 mit SLAH1 konnte eine rein monomerische Verteilung ($95 \pm 5 \%$) und mit SLAH4 eine maßgeblich monomerische Verteilung ($84 \pm 3 \%$) festgestellt werden. Das bedeutet für beide Versuche, dass sich SLAH3::mEOS2 maßgeblich (für SLAH1 fast ausschließlich) in der heterodimerischen Interaktion mit SLAH1 oder SLAH4 befindet. Das SLAH3::mEOS2-Homodimer ist somit kaum mehr vorhanden, und SLAH3::mEOS2 scheint weniger affin zu sich selbst als zu den beiden Homologen SLAH1 und SLAH4 zu sein. Aufgrund der heterogenen Verteilung von $25 \pm 12 \%$ Dimeranteil, kann von einer etwas geringeren Affinität von SLAH3 zu SLAH4, im Vergleich zu SLAH3 zu SLAH1 ausgegangen werden. Der dimerische Anteil bei SLAH3::mEOS2 mit SLAH4 sind verbliebene SLAH3::mEOS2-Homodimere. Die Interaktion zwischen SLAH3 und SLAH4 ist anhand dieser Daten bestätigt.

Da eine cytosolische Ansäuerung zu einer Aktivierung von SLAH3 führen kann und dies mit der Monomerisierung von SLAH3 einhergeht, wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die cytosolische Ansäuerung die Heteromerisierung von SLAH3 mit den aktivitätsbeeinflussenden Homologen SLAH1/SLAH4 verändert. Dies vervollständigt das Bild der Einflussfaktorenlandschaft in Bezug auf die De-/Aktivierbarkeit von SLAH3.

Das Heterodimer von SLAH3mEOS2 und SLAH1::mEOS2 monomerisiert im Gegensatz zu dem SLAH3::mEOS2-Homodimer nicht durch eine Ansäuerung mit NaAc. Der Oligomerisierungsgrad ist gleichbleibend mit und ohne Behandlung mit NaAc (mit NaAc: $42 \pm 3 \%/62 \pm 14 \%$ Monomer/Dimer; ohne NaAc: $39 \pm 3 \%/74 \pm 10 \%$ Monomer/Dimer; ($n_{Z(H3+H1+NaAc)} = 6$, $n_{C(H3+H1+NaAc)} = 1754$, $R^2_{H3+H1+NaAc} = 99,21 \%$)).

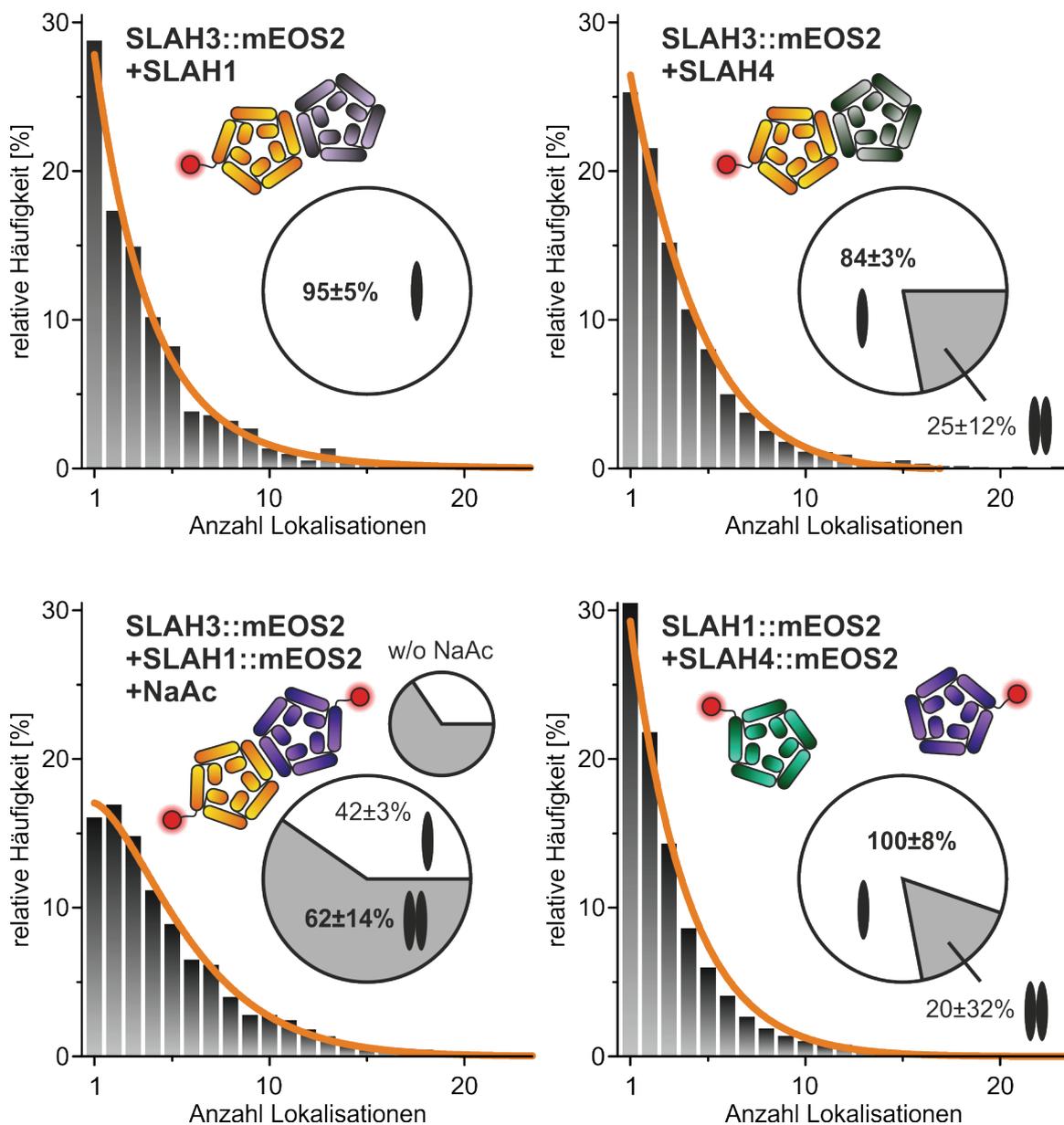


Abb. 4.37: Differenzierte Interaktionsanalysen mittels PALM-Stöchiometrien zwischen SLAH3, SLAH1 und SLAH4. Die differenziertere Analyse der Interaktion ist durch die ausschließliche Färbung von SLAH3::mEOS2 möglich. Kommt es zu einer Heteromerisierung zeigt sich eine ausschliesslich monomerischen Verteilung. **(SLAH3::mEOS2+SLAH1)** SLAH3::mEOS2 ist fast ausschließlich als Monomer zu sehen und bestätigt die Bildung eines Heterodimers mit dem ungefärbten SLAH1. Aufgrund der Verteilung (95% Monomer) ist von einer hohen Affinität der beiden Proteine zueinander auszugehen. **(SLAH3::EOS2+SLAH4)** Die vornehmlich monomerische Verteilung (84%) beweist die Interaktion und die Bildung eines Heterodimers von SLAH3::mEOS2 mit SLAH4. Der dimerische Anteil sind verbliebene SLAH3::mEOS2-Homodimere. **(SLAH3::mEOS2+SLAH1::mEOS2+NaAc)** Das Heterodimer von SLAH3::mEOS2 und SLAH1::mEOS2 monomerisiert im Gegensatz zu dem SLAH3::mEOS2-Homodimer nicht durch die zytosolische Ansäuerung mit NaAc. **(SLAH1::mEOS2+SLAH4::mEOS2)** Für SLAH1::mEOS2 und SLAH4::mEOS2 konnte anhand der PALM-Stöchiometrie-Untersuchungen keine eindeutige Interaktion festgestellt werden, die Proteine verbleiben monomerisch.

Die PALM-Stöchiometrie-Untersuchungen zeigen für SLAH1::mEOS2 und SLAH4::mEOS2 keine eindeutige Interaktion. Die Proteine zeigen eine rein monomerische Verteilung ($100 \pm 8\%$ Monomer; ($n_{Z(H1+H4)} = 12$, $n_{C(H1+H4)} = 2042$, $R^2_{H1+H4} = 98\%$)).

SLAC1 gehört mit SLAH2 und SLAH3 zu den S-Typ Anionenkanälen, welchen eine eigene Leitfähigkeit zugeschrieben werden kann, und liegt ebenso als Homodimer wie SLAH2::mEOS2 und SLAH3::mEOS2 ($100 \pm 28\%$ Dimer; s. Abb. 4.38; $n_{Z(C1)} = 3$, $n_{C(C1)} = 583$, $R^2_{C1} = 95,71\%$) vor.

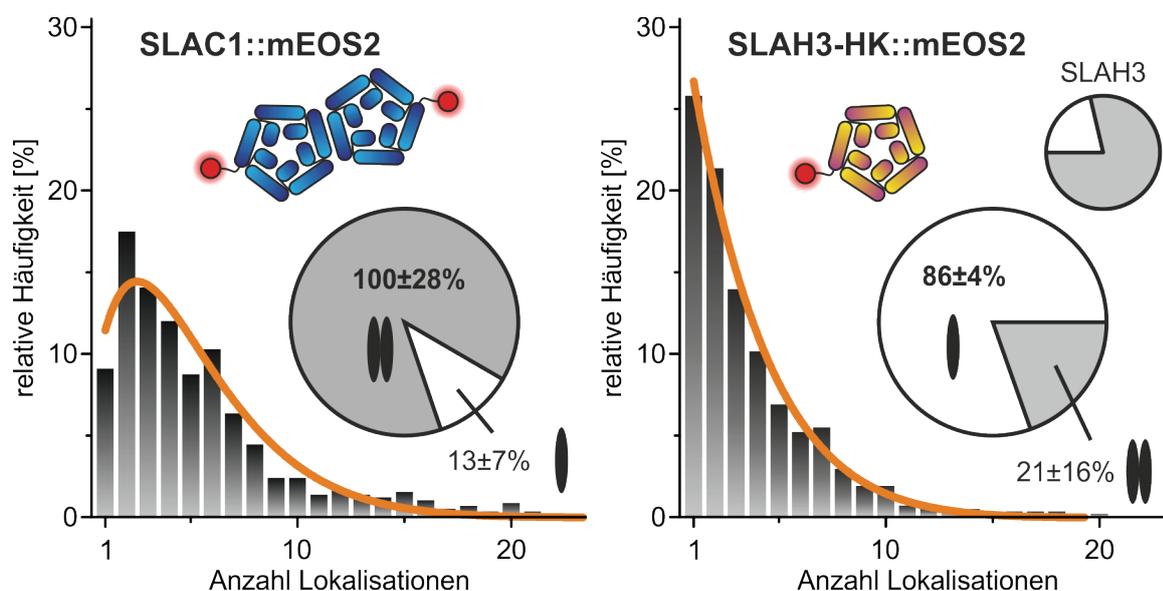


Abb. 4.38: Oligomerisierungsgrad von SLAC1::mEOS2 und der SLAH3-HK::mEOS2-Mutante. (SLAC1::mEOS2) Als einer der wichtigsten Vertreter der SLAC/SLAHs wurde von SLAC1 bestimmt ebenfalls der Polymerisierungsgrad bestimmt, welches als Dimer vorliegt. Die Aktivierbarkeit von SLAC1 ist nach aktuellem Kenntnisstand im Gegensatz zu SLAH3 nicht pH-abhängig oder durch Interaktion mit den Homologen SLAH1 oder SLAH4 möglich, sondern von komplexen Signalkaskaden abhängig [21]. **(SLAH3-HK::mEOS2)** Bei der pH-abhängigen Regulierung von SLAH3 könnten die Histidine (H) His330 und His454 involviert sein, weshalb die SLAH3-HK::mEOS2-Mutante hergestellt wurde, bei welcher die Histidine durch Lysin (K) ersetzt wurden, um eine Protonierung der Seitenketten zu imitieren. Die elektrophysiologisch konstitutiv aktive Mutante zeigt im Gegensatz zum wildtypischen SLAH3 eine hauptsächlich monomerische Verteilung.

SLAH3 lässt sich durch eine pH Verschiebung von pH 7 zu pH 6 aktivieren. Der pK_S -Wert des Imidazolrings von Histidinen liegt mit 6,5 in genau diesem Bereich [220], weshalb die Histidine bei der pH-abhängigen Regulierung von SLAH3 involviert sein könnten. Aufgrund dessen wurden verschiedene Mutanten von SLAH3 hergestellt, bei welchen die Histidine (H) His330 und His454 entweder durch Lysin (K) ersetzt wurden, um eine Protonierung der Seitenketten zu imitieren, oder durch Alanin (A) oder Phenylalanin (F), um eine Protonierung zu unterbinden [218].

Der Oligomerisierungsgrad des wildtypischen (WT) SLAH3::mEOS2 ist maßgeblich dimerisch und ist elektrophysiologisch inaktiv. Eine cytosolische Ansäuerung führt zur Monomerisierung des WT-SLAH3::mEOS und zur elektrophysiologischen Aktivierung.

Im Gegensatz hierzu war die HK-Mutante elektrophysiologisch konstitutiv aktiv und zeigte eine monomerische Stöchiometrie (s. Abb. 4.38; $n_{Z(HK)}=6$, $n_{C(HK)}=1419$, $R^2_{HK}=99,29\%$). Dagegen waren die HA- und HF-Mutanten elektrophysiologisch inaktiv und konnten auch durch eine pH-Änderung nicht aktiviert werden. Dimer und Monomer sind bei beiden Mutanten zu gleichen Teilen vertreten (~50%/50% Monomer/Dimer; HA-Mutante: $n_{Z(HA)}=6$, $n_{C(HA)}=1656$, $R^2_{HA}=99,22\%$; HF-Mutante: $n_{Z(HF)}=8$, $n_{C(HF)}=2525$, $R^2_{HF}=97,75\%$). Dabei wurde deutlich, dass durch Ansäuerung keinerlei Veränderung des Polymerisierungszustandes für beide Mutanten induzierbar war (HA-Mutante nach Ansäuerung: $n_{Z(HA+NaAc)}=10$, $n_{C(HA+NaAc)}=1674$, $R^2_{HA+NaAc}=98,08\%$; HF-Mutante nach Ansäuerung: $n_{Z(HF+NaAc)}=6$, $n_{C(HF+NaAc)}=1188$, $R^2_{HF+NaAc}=97,68\%$) (s. Abb. 4.39). Die PALM-Abbildungen der SLAH3-Mutanten sind im Anhang (s. Abb. 7.1-Abb. 7.2) zu finden. Diese Ergebnisse bestätigen die elektrophysiologischen Daten und deuten darauf hin, dass die Monomerisierung von SLAH3 für die pH-abhängige Aktivierung essentiell ist.

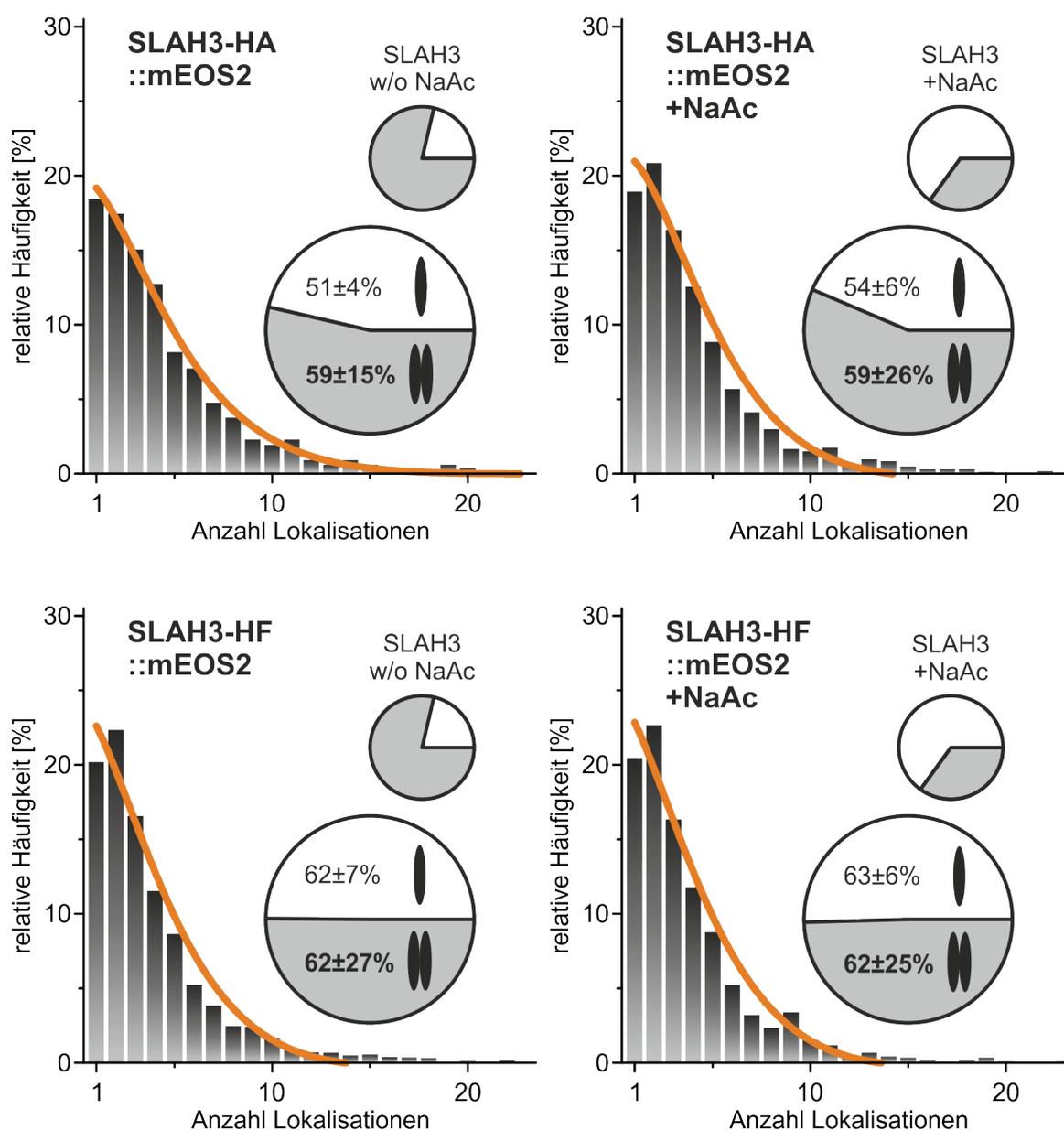


Abb. 4.39: Polymerisierungsgrad der HA- und HF-Mutanten von SLAH3 mit und ohne zytosolischer Ansäuerung. Bei den beiden SLAH3-Mutanten wurden die Histidine (H) His330 und His454 durch Alanin (A) oder Phenylalanin (F) ersetzt, um eine Protonierung zu unterbinden. Die HA- und HF-Mutanten waren elektrophysiologisch inaktiv und konnten auch durch eine pH-Änderung nicht aktiviert werden. Dimer und Monomer sind bei beiden Mutanten zu gleichen Teilen vertreten (~50%/50% Monomer/Dimer). Was jedoch deutlich war, dass keinerlei Veränderung des Polymerisierungsgrades durch Ansäuerung für beide Mutanten induzierbar war. Die Stöchiometrie der HA- und HF-Mutanten bestätigen die Annahme, dass die getauschten Histidine bei der pH-sensitiven Regulierung von SLAH3 eine entscheidende Rolle übernehmen.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass zu den S-Typ Anionenkanälen der SLAC/SLAH-Familie zum einen drei Kanäle gehören, welche für sich einen funktionellen Anionenkanal bilden (SLAC1, SLAH2 und SLAH3) und zum anderen die beiden regulatorischen Untereinheiten SLAH1 und SLAH4 [4, 5, 21, 221], die selbst keine Ionenkanalaktivität in Oozyten zeigten. SLAC1, SLAH2 und SLAH3 können durch Phosphorylierung aktiviert werden, wobei die beiden letztgenannten Kanäle dabei auf die Verfügbarkeit von extrazellulärem Nitrat angewiesen sind. Keiner dieser Kanäle ist ohne diese Kofaktoren konstitutiv aktiv [20, 21, 23, 222]. Jedoch verfügt SLAH3 über weitere Möglichkeiten zur Beeinflussung seiner Aktivität. SLAH3 interagiert innerhalb von Nanodomänen mit der aktivierenden Kinase [223] und kann durch die Interaktion mit SLAH1 reguliert und aktiviert werden [24], was in dieser Arbeit von besonderem Interesse war.

Die Ansäuerung des Zytoplasmas von Pflanzenzellen gehört neben der Erhöhung der Calciumkonzentration zu einer der schnellen Reaktionen auf äußere Stressfaktoren und kann durch die Translokation der Protonen vom Apoplast in das Zytoplasma [32], durch Inhibierung des H⁺-ATPase oder durch metabolische Prozesse generiert werden, weshalb Protonen als Botenstoff für assoziierte Signalkaskaden in Frage kommen [29]. Die zytosolische pH-Änderung und die daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran konnte bereits in Pflanzenwurzeln mit einem Anionen-Efflux in Verbindung gebracht werden [31, 224, 225]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von S-Typ Anionenkanälen direkt durch die Protonenkonzentration beeinflusst wird [5, 21, 33, 221].

SLAH3 liegt bei neutralem pH-Werten als Homodimer vor und monomerisiert durch zytosolische Ansäuerung. Dies weist darauf hin, dass die Erhöhung der Protonenkonzentration im Zytoplasma direkt die Aktivität von SLAH3 beeinflusst und infolgedessen die Plasmamembran depolarisiert wird. Die Aktivierbarkeit von SLAH3 durch eine pH-Änderung konnte für physiologische pH-Werte (pH 5,6 - 8,5) elektrophysiologisch gezeigt werden. Dabei reichte bereits ein pH-Wert von 7,15 aus, um SLAH3 zu aktivieren [218]. Die Histidine His330 und His454 von SLAH3 sind für die pH-abhängige Regulierung von entscheidender Bedeutung. Die Protonierung dieser Aminosäuren vermittelt vermutlich die Monomerisierung, weshalb die Doppelmutante SLAH3-HK ausschließlich als Monomer vorliegt. Die Stöchiometrie der HA- und HF-Mutanten bestätigen diese Annahme, da beide Mutanten insensitive auf eine Änderung des pH-Werts sind.

Elektrophysiologische Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten dieser Mutanten konnten diese Annahme noch detaillierter beschreiben. Die SLAH3-HA-Doppelmutante (H330A/H454A) war dabei in Standard Nitratpuffern konstitutiv aktiv und eine zytosolische Ansäuerung führte zu keinen erhöhten Strömen. Zusätzlich wurden SLAH3-Einzelmutanten untersucht, bei welchen entweder das His330 oder das His454 durch Alanin ersetzt wurde. Diese Mutanten waren ebenfalls konstitutiv aktiv. Im Vergleich zur

Doppelmutante waren die Amplituden der Ströme dabei höher als die der Doppelmutante und die cytosolische Ansäuerung führte zudem zu erhöhten Aktivitäten. Bei der elektrophysiologische Untersuchung der SLAH3-HK-Doppelmutante konnten nochmals erhöhte Ströme festgestellt werden. Das Ersetzen der Histidine durch Lysin ahmt dabei eine Seitenkettenprotonierung nach. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Protonierung der Histidine His330 und His454 ausreicht eine pH-abhängige Aktivierung von SLAH3 zu induzieren [218]. Der direkte Zusammenhang dieser Protonierung und der pH-abhängigen Aktivierung über den Oligomerisierungsgrad von SLAH3 (Monomerisierung bei cytosolischer Ansäuerung) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die Anionenkanäle SLAC1 und SLAH2 liegen im Grundzustand ebenso wie SLAH3 als Homodimer vor und zeigen im Gegensatz zu SLAH3 keine Veränderung des Polymerisierungsgrades bei pH-Änderung, weshalb die Aktivierbarkeit beider Kanäle auf diesem Wege sehr unwahrscheinlich ist, was einhergeht mit vorangegangenen elektrophysiologischen Studien.

Die PALM-Stöchiometrie-Studien zeigten außerdem, dass die beiden regulatorischen Proteine SLAH1 und SLAH4 als Monomer vorliegen und keine Affinität zueinander haben. Beide Untereinheiten interagieren mit SLAH3 und bilden dabei ein Heterodimer. Die Affinität von SLAH3 zu SLAH1 oder SLAH4 ist dabei höher als die Bildung des SLAH3-Homodimers (SLAH3-SLAH3) und begünstigt dadurch im Vergleich die Bildung eines heterodimerischen Komplexes (SLAH3-SLAH1 und SLAH3-SLAH4). Die Trennung des Heterodimers ist mittels Ansäuerung nicht möglich. Die Aktivierung durch SLAH1 als Einflussfaktor auf die SLAH3 Aktivität ist entsprechend dominant.

Die Variabilität regulatorischer Einflüsse auf SLAH3, abhängig von Kofaktoren wie SLAH1, SLAH4 und Kinasen, der Position in der Plasmamembran sowie des pH und zusätzlich Unterschiede in der Dominanz dieser Faktoren, ermöglichen der Pflanze ein außerordentliches breites Repertoire, um auf äußere und innere Stressfaktoren angemessen mit einem Minimum an Anionenkanaluntereinheiten reagieren zu können.

5 Folgerung und Ausblick

Anionenkanäle sind hochsensible Komponenten bei der pflanzlichen Reaktion auf äußere Stressfaktoren und die Vielseitigkeit zur Beeinflussung der Kanalaktivität ermöglicht der Pflanze spezifisch auf den jeweiligen Stress/Stimulus zu reagieren. Dabei spielen entsprechende Expressionsmuster und die Lokalisation der Kanäle im Pflanzengewebe eine entscheidende Rolle.

In diesem Zusammenhang konnte SLAH2 in den Endodermis- und Perizykelzellen der Pflanzenwurzel lokalisiert werden, was die Funktion von SLAH2 bei der Beladung des Xylems mit Nitrat darlegt. Die Untersuchung einer zellulären Polarität des SLAH2 würde diese Funktion noch weiter verdeutlichen. Ebenfalls ist SLAH2 in Bereichen der Seitenwurzelbildung hochreguliert und ist bei der Formierung involviert. Genexpressionsanalysen sowie umfassende mikroskopische Untersuchungen könnten dabei ebenfalls die spezifische Integration in diesen Prozess klären.

Der Einsatz von hochauflösenden Mikroskopietechniken könnte dabei weitreichende Fragestellungen klären. In der Wurzel sind Aufnahmen mittels SIM mit einer Auflösung von 75 nm möglich. Dabei konnten sehr einfach Referenzstrukturen wie beispielsweise die Zellwände mit calcofluor-weiß gefärbt werden, wodurch die subzelluläre, polare Verteilung von SLAH2 in der Wurzel sehr detailliert beschrieben werden könnte. In Verbindung mit Ultradünnschnitten könnten zudem dreidimensionale Modelle mit dieser Auflösung möglich sein.

Es konnten erste Präparationsprotokolle für die ExM und deren Anwendbarkeit gezeigt werden. Diese ersten Versuche konnten bereits eine Auflösungsverbesserung von ~3x zeigen, was Thylakoid-Grana sichtbar machte. Insbesondere die Verminderung der Hintergrundfluoreszenz und die Verwendung von Standardmikroskopiemethoden bei maximaler Eindringtiefe in das Gewebe eröffnen neue Möglichkeiten bei bildgebenden Messmethoden im Pflanzengewebe. Hier konnte mittels CLSM gezeigt werden, dass sich SLAH4 in der Plasmamembran von Pflanzenzellen befindet. Mit Hilfe der ExM wird es möglich sein, beispielsweise darzustellen, ob SLAH4 homogen über die Plasmamembran verteilt ist oder in Nanodomänen vorliegt (wie SLAH3 [223]). Dies würde wiederum neue Erkenntnisse über die Funktionsweisen der langsamen Anionenkanäle liefern.

Es ist wichtig, die Anwendbarkeit und Durchführbarkeit der Probenpräparation und Untersuchungsmethoden für spezifische Fragestellungen zu prüfen und gegebenenfalls kritisch zu hinterfragen. So waren beispielsweise PALM-Messungen im Pflanzenmaterial

aufgrund des Hintergrundsignals sehr schwierig. Die Etablierung von Präparationsprotokollen und Messbedingungen sind für die Zukunft sicherlich sehr anspruchsvoll. Nichtsdestotrotz ist die Untersuchung eines Proteins im nativen System immer relevant und muss möglicherweise mit Hilfe anderer Methoden gemeistert werden. Die verminderte Hintergrundfluoreszenz durch die Präparationsprotokolle für die ExM bieten die Möglichkeit, dass Lokalisationsmikroskopische Untersuchungen im pflanzlichen Gewebe möglich werden.

Die Etablierung neuer Untersuchungsmethoden ermöglicht immer detailliertere und differenziertere Einblicke in biologische Systeme und ist von höchstem Interesse für die Wissenschaft. Die Kombination von elektrophysiologischen Untersuchungen mit hochauflösenden Mikroskopiemethoden könnte dabei hochkomplexe Zusammenhänge aufzeigen.

Lokalisationsanalysen der aktivierenden Kinasen wie beispielsweise OST1 oder CPK21 und die nm-genaue Lokalisation dieser in Bezug/in Verbindung mit den SLAC/SLAH-Anionenkanäle ist von großem Interesse und würde neue Einblicke in die Regulationsprozesse und Interaktionsstöchiometrie ermöglichen.

Mit Hilfe von FRET-FLIM-Untersuchungen konnte die Interaktion von SLAH3 und SLAH4 gezeigt werden, wodurch SLAH4 als inaktivierender Faktor von SLAH3 bestätigt werden konnte. Um eine umfassende Vorstellung der ineinandergreifenden Signalkaskaden zu erhalten sind auch hier weiterführende Untersuchungen mit anderen Unter-einheiten und weiterer beeinflussender Faktoren induziert (s. Abb. 1.1).

Durch umfassende Lokalisationsanalysen mittels *d*STORM einhergehend mit funktionsprüfenden Patch-Clamp Messungen, konnte die Funktionalität der mit mEOS2 gefärbten Anionenkanäle in Säugerzellen gezeigt werden. Diese Tatsache ermöglichte umfassende PALM-Untersuchungen des Oligomerisierungsgrads der pflanzlichen Anionenkanäle.

Grundzustand der elektrophysiologisch aktiven Anionenkanäle SLAC1, SLAH2 und SLAH3 ist dabei die Formierung eines Homodimers. Die Dimerisierung unter Standardbedingungen ist dabei die Grundlage für eine Konformationsänderung durch Heteromerisierung (mit SLAH1 oder SLAH4), Monomerisierung (SLAH3) oder sogar Interaktion mit sekundären Proteinen (OST1, CPKs) des Kanalproteins, was zu einer hohen Aktivitätsflexibilität führt. Ebenso ist die Heterogenität der Aktivitätskontrolle (beispielsweise lediglich SLAH3 monomerisiert bei zytosolischer Ansäuerung) von essentieller Bedeutung, da so eine Redundanz der Nährstoffversorgung oder Stressreaktion für die Pflanze zu jeder Zeit gewährleistet ist.

SLAC1 und SLAH2 verweilen als Homodimer. Es ist dabei von großem Interesse, ob sich der Oligomerisierungsgrad dieser beiden Kanäle durch bestimmte Einflüsse ändert. Für SLAH3 konnte eindeutig gezeigt werden, dass cytosolische Ansäuerung zu Monomerisierung und einhergehender Aktivierung des Proteins führt. Die Heterodimerisierung von SLAH3 verändert ebenfalls die Aktivität des SLAH3. Dabei ist ist

SLAH3 im SLAH3-SLAH1-Heterodimer aktiv und im SLAH3-SLAH4-Heterodimer inaktiv. Die Heterodimerisierung ist pH-insensitiv. Ob es noch weitere Einflüsse gibt, welche den Oligomerisierungsgrad beeinflussen muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Der Einsatz beziehungsweise die Etablierung von Multifarben Aufnahmen, das heißt die Färbung der einzelnen Proteine und Interaktionspartnern mit unterschiedlichen Fluorophoren könnte weitere Felder und Analysemethoden eröffnen. Zum einen kann der Oligomerisierungsgrad verschiedener Untereinheiten innerhalb eines Komplexes untersucht werden. Zum anderen sind Diffusionsbewegung und dynamische Interaktionsprozesse mittels Einzelmolekülverfolgung im nativen System denkbar.

Die Tatsache der pH-abhängigen Regulierung von SLAH3 lässt die Hypothese zu, dass SLAH3 eine Schlüsselkomponente bei der protonenabhängigen Stressreaktion darstellt. Daraus ausgerichtete Untersuchungen werden dabei Erkenntnisse ermöglichen, inwieweit die Pflanze von der pH-abhängigen Regulierung von SLAH3 profitiert. Dies kann Möglichkeiten aufzeigen wie die Resistenz von Pflanzen auf bestimmte Umweltbedingungen erhöht werden kann. Detaillierte Expressionsmusteranalysen im Kontext weiterer involvierter Proteine in Verbindung mit der Bestimmung stöchiometrischer Verteilungen und Oligomerisierungsgrade dieser Proteine, werden weitere Erkenntnisse über die Zusammenhänge der pflanzlichen Stressantwort bringen und zum besseren Verständnis der Funktionsweisen innerhalb eines Organismus beitragen.

6 Liste der Publikationen

Publikationen die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind

Titel: The S-type anion channel SLAH3 operates as a proton sensor and master switch during stress-induced cytosolic acidosis.
Autoren: Julian Lehmann, Morten E. Jørgensen, Stefanie Huettl, Sönke Scherzer, Jennifer Boehm, Thomas D. Mueller, Ulrich Terpitz, Markus Sauer, Dietmar Geiger, Rainer Hedrich and Tobias Maierhofer
Journal: PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)
Submitted February 2020

In der oben genannten Publikation wurden die Bestimmungen des Oligomerisierungsgrades mittels PALM durchgeführt.

Tobias Maierhofer

Publikationen, welche nicht aus dieser Dissertation hervorgegangen sind

- Waldchen, S., et al., *Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy*. Sci Rep, 2015. 5: p. 15348.
- Borrie, S.C., et al., *Loss of Nogo receptor homolog NgR2 alters spine morphology of CA1 neurons and emotionality in adult mice*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2014. 8.
- Schafer, P., et al., *Methylene Blue- and Thiol-Based Oxygen Depletion for Super-Resolution Imaging*. Analytical Chemistry, 2013. 85(6): p. 3393-3400.

7 Anhang

7.1 Bildberechtigungen

Für die Abbildungen Abb. 1.4, Abb. 1.6, Abb. 1.7, Abb. 1.8 und Abb. 4.5 gilt die "Creative Commons CC BY" Lizenzvereinbarung, welche die uneingeschränkte Verwendung, Verteilung und Reproduktion auf jedem Medium gestattet, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Die Quelle ist in den jeweiligen Abbildungen in der Bildunterschrift eindeutig angegeben.

Die Berechtigungen für die Abbildungen

Abb. 1.1, Abb. 1.2, Abb. 1.3 und Abb. 1.5 sind im Folgenden angegeben:

Abb. 1.1 und Abb. 1.2:

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Feb 08, 2020
This Agreement between Julian Lehmann ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.
License Number: 4761510861699
License date: Feb 03, 2020
Licensed Content Publisher: John Wiley and Sons
Licensed Content Publication: New Phytologist
Licensed Content Title: Biology of SLAC1-type anion channels – from nutrient uptake to stomatal closure
Licensed Content Author: Dietmar Geiger, Rainer Hedrich
Licensed Content Date: Jul 19, 2017
Licensed Content Volume: 216
Licensed Content Issue: 1
Licensed Content Pages: 16

Type of use: Dissertation/Thesis
Requestor type: University/Academic
Format: Print and electronic
Portion: Figure/table
Number of figures/tables: 2
Original Wiley figure/table number(s): Figure 3, Figure 5
Will you be translating? Yes, without English rights
Number of languages: 1
Languages: German
Title of your thesis / dissertation
Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie
beleuchtet den Oligomerisierungsstatus
pflanzlicher Membranproteine
Expected completion date: Feb 2020
Expected size (number of pages): 180
Requestor Location: Julian Lehmann, Am Exerzierplatz 1, Würzburg, BY 97072, Germany
Attn: Julian Lehmann
Publisher Tax ID: EU826007151
Total: 0.00 EUR

Abb. 1.3:

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 08, 2020

This Agreement between Julian Lehmann ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number: 4761511245589

License date: Feb 03, 2020

Licensed Content Publisher: Elsevier

Licensed Content Publication: Chemistry & Biology

Licensed Content Title: An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells

Licensed Content Author: Arnaud Gautier, Alexandre Juillerat, Christian Heinis, Ivan Reis Corrêa, Maik Kindermann, Florent Beaufile, Kai Johnsson

Licensed Content Date: Feb 22, 2008

Licensed Content Volume: 15

Licensed Content Issue: 2

Licensed Content Pages: 9

Start Page: 128

End Page: 136

Type of Use: reuse in a thesis/dissertation

Portion: figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations: 1

Format: both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article?: No

Will you be translating?: Yes, without English rights

Number of languages: 1

Title: Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie beleuchtet den Oligomerisierungsstatus pflanzlicher Membranproteine

Institution name: n/a

Expected presentation date: Feb 2020

Portions: Figure 1

Specific Languages: German

Requestor Location: Julian Lehmann, Am Exerzierplatz 1, Würzburg, BY 97072, Germany

Attn: Julian Lehmann

Publisher Tax ID: GB 494 6272 12

Total: 0.00 EUR

Abb. 1.5:

This is a License Agreement between Julian Lehmann ("You") and Royal Society of Chemistry ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions

provided by Royal Society of Chemistry, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date: 03-Feb-2020

Order license ID: 1016421-1

ISSN: 1474-9092

Type of Use Republish in a thesis/dissertation

Publisher: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

Portion: Chart/graph/table/figure

Licensed Content: Publication Title

Photochemical & photobiological sciences

Article Title: Photoinduced formation of

reversible dye radicals and their impact on super-

resolution imagingElectronic supplementary

information (ESI) available: Fig. S1–S6. See

DOI: 10.1039/c0pp00317d

Author/Editor: Korean Society of Photoscience.,

Asia and Oceania Society for Photobiology.,

European Society for Photobiology., European

Photochemistry Association.

Date: 01/01/2002

Language: English

Country: United Kingdom of Great Britain and

Northern Ireland

Rightsholder: Royal Society of Chemistry

Publication Type: e-Journal

Start Page: 499

End Page: 506

Issue: 4

Volume: 10

URL:

<http://xlink.rsc.org/jumptonjournal.cfm?journal%5>

Fcode=PP

Request Details:

Portion Type: Chart/graph/table/figure

Number of charts / graphs / tables / figures requested: 1

Format (select all that apply): Print, Electronic

Who will republish the content?: Academic institution

Duration of Use: Life of current edition

Lifetime Unit Quantity: Up to 499

Rights Requested: Main product

Distribution: Worldwide

Translation: Original language plus one translation

Copies for the disabled?: No

Minor editing privileges?: Yes

Incidental promotional use?: No

Currency: EUR

New Work Details:

Title: Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie beleuchtet den Oligomerisierungsstatus pflanzlicher Membranproteine

Instructor name: Dr Dietmar Geiger

Institution name: Botany 1, Biophysics an Plantphysiology

Expected presentation date: 2020-02-04

Additional Details:

Order reference number:N/A

The requesting person / organization to appear on the license: Julian Lehmann

Reuse Content Details:

Title, description or numeric reference of the portion(s): Figure 4

Editor of portion(s): van de Linde, Sebastian; Krstić, Ivan; Prisner, Thomas; Doose, Sören; Heilemann, Mike; Sauer, Markus

Volume of serial or monograph: 10

Page or page range of portion: 499-506

Title of the article/chapter the portion is from: Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imagingElectronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S6. See DOI: 10.1039/c0pp00317d

Author of portion(s): van de Linde, Sebastian; Krstić, Ivan; Prisner, Thomas; Doose, Sören; Heilemann, Mike; Sauer, Markus

Issue, if republishing an article from a serial: 4

Publication date of portion: 2011-03-30

7.2 Zusätzliche Abbildungen

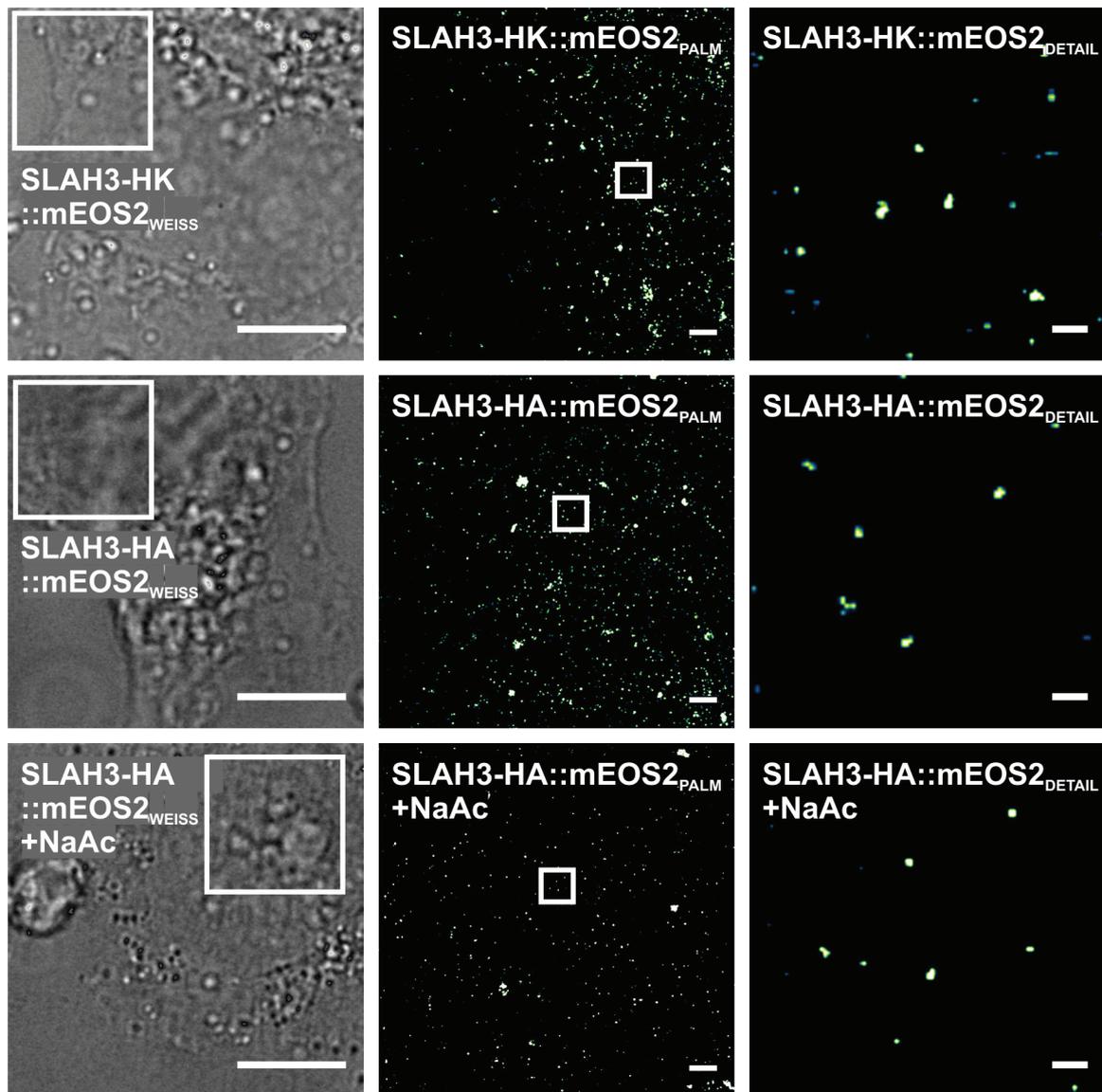


Abb. 7.1: PALM-Abbildungen der HK- und HF-Mutanten von SLAH3. Maßstabsbalken= 10 μm (_{WEISS})/1 μm (_{PALM})/0,1 μm (_{DETAIL}).

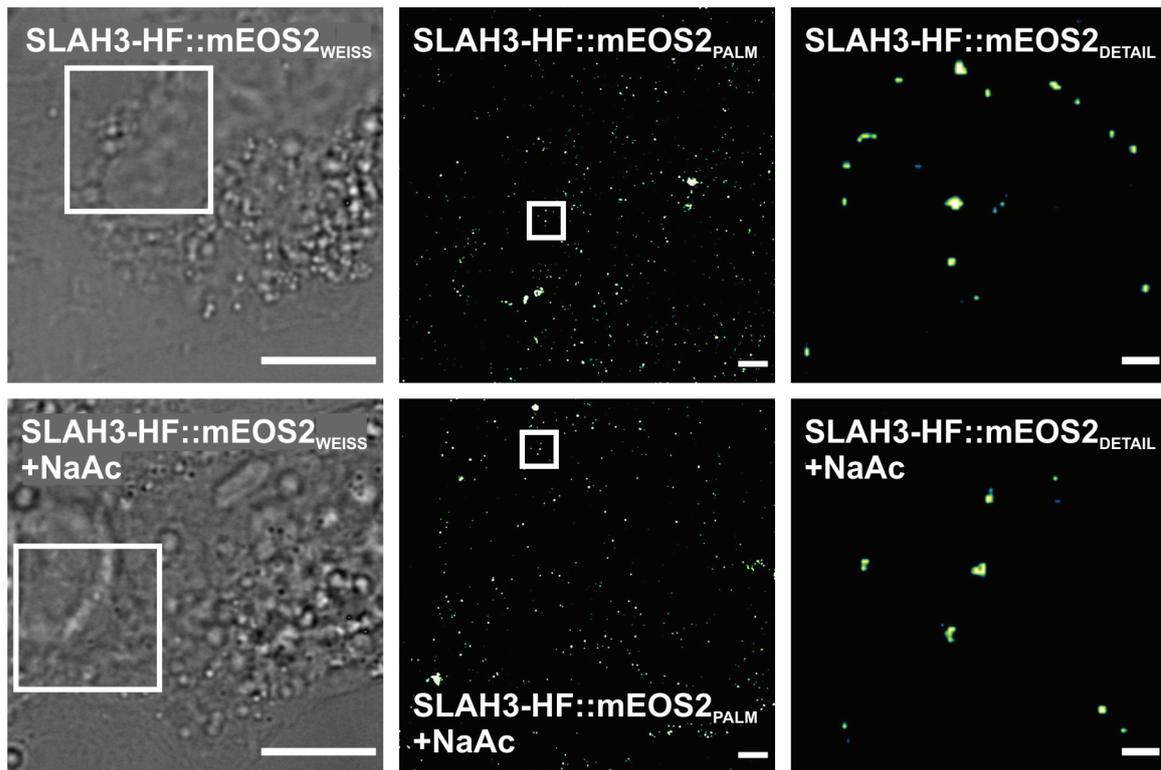


Abb. 7.2: PALM-Aufnahmen von SLAH3-HF::mEOS2. Maßstabsbalken= 10 μm (_{WEISS})/1 μm (_{PALM})/0,1 μm (_{DETAIL}).

7.3 Liste der Formeln

Formel 1: Anpassungsfunktion Monomer (Anpassungsfunktion geometrische Verteilung):	63
Formel 2: Anpassungsfunktion Dimer (negative Binomialfunktion):.....	63
Formel 3: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer:	64
Formel 4: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer-Trimer:	64
Formel 5: Anpassungsfunktion Monomer-Dimer-Trimer-Tetramer:	64

7.4 Liste der Abbildungen

Abb. 1.1:	Multisensorisches Modell zur Aktivitätskontrolle von SLAC1.....	3
Abb. 1.2:	Elektrophysiologische Charakterisierung und Funktionsmodell von SLAH1, SLAH2 und SLAH3.	5
Abb. 1.3:	Spezifische Färbung von Proteinen mit Hilfe von Protein-Tags.	8
Abb. 1.4:	Zusammenhänge von Punktspreizfunktion, Rayleigh Kriterium und Gassanpassungen zur Bestimmung des Auflösungsvermögens von Fluoreszenzmikroskopen.	11
Abb. 1.5:	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm und Reaktionsschema für die Schaltprozesse von Fluorophoren.	19
Abb. 1.6:	Vier-Zustände-Modell.....	21
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung des <i>At</i> Wurzelbaus.	27
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung der Blattanatomie.	28
Abb. 3.1:	Übersicht über die Pflanzenprobenpräparation.....	48
Abb. 3.2:	Zwei Pipettentchnik (PPT).....	50
Abb. 3.3:	Übersicht der Arbeitsschritte zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen anhand von PALM Daten.	57
Abb. 4.1:	Referenzstrukturen mittels Standardfärbungen.....	69
Abb. 4.2:	Die SLAH2 Lokalisation in der Pflanzenwurzel anhand der SLAH2-Promotor induzierten YFP Expression.	71
Abb. 4.3:	SLAH2 Lokalisation in der Pflanzenwurzel anhand des SLAH2-YFP Fusionskonstrukts.....	73
Abb. 4.4:	SLAH2 im Bereich der lateralen Wurzelformierung.....	75
Abb. 4.5:	Schematische Darstellung der Formierung von Seitenwurzeln.	78
Abb. 4.6:	SLAH4 Lokalisation in der Plasmamembran.	80
Abb. 4.7:	Negativkontrolle zu SLAH4 in der Plasmamembran.	81
Abb. 4.8:	Die polare Verteilung von PIN1 und PIN2 im Wurzelgewebe anhand von SIM-Aufnahmen.	84
Abb. 4.9:	SIM-Aufnahme von Ultradünnschnitten der <i>At</i> -Wurzel.	88
Abb. 4.10:	Strukturelle Detailanalyse des CFW-gefärbten Wurzelquerschnitts mittels SIM.....	89
Abb. 4.11:	Zellspezifische Analyse der Zellwanddicke von <i>At</i> -Wurzelzellen im Bereich des Basalmeristems anhand von SIM-Aufnahmen.....	91
Abb. 4.12:	<i>d</i> STORM-Aufnahme von MT in <i>At</i> -Wurzelzellen und lokalisationsmikroskopische Probleme in Pflanzengewebe.	94
Abb. 4.13:	ExM von <i>At</i> -Setzlingen vor und nach Expansion.	97
Abb. 4.14:	ExM von Chloroplasten.	99
Abb. 4.15:	ExM von <i>At</i> -Blättern nach Denaturierung und enzymatischem Verdau.....	101

Abb. 4.16: Homogenitätskontrolle der Expansion in der Übersicht des <i>At</i> -Blattes.....	103
Abb. 4.17: ExM der <i>At</i> -Wurzel.....	104
Abb. 4.18: Bestimmung der Expansionsfaktoren und Expansionshomogenitätsanalyse der <i>At</i> -Wurzel.....	106
Abb. 4.19: ExM Versuche nach Denaturierung des <i>At</i> -Blattes – Übersicht.....	108
Abb. 4.20: ExM Versuche nach Denaturierung des <i>At</i> -Blattes – Detailansichten.....	109
Abb. 4.21: ExM Versuche der <i>At</i> -Wurzel mittels Denaturierung.....	113
Abb. 4.22: Denaturierungsgrad der Xylemstruktur.....	114
Abb. 4.23: CLSM-Aufnahmen zur Expressionskontrolle der SLAH1/SLAH3-Konstrukte.....	117
Abb. 4.24: Interaktionswahrscheinlichkeit der unterschiedlichen SLAC/SLAHs anhand von FRET-FLIM-Untersuchungen.....	121
Abb. 4.25: Membranständigkeit der SLAC/SLAH-Konstrukte mit mEOS2. CLSM-Aufnahmen der SLAC/SLAH::mEOS2-Konstrukte (grün) in COS7-Zellen.....	124
Abb. 4.26: Hochaufgelöste Darstellung von SLAC1 und SLAH1 in COS7-Zellen.....	126
Abb. 4.27: dSTORM-Abbildungen von SLAH3 und dem pflanzlichen Zuckertransporter ZmSUT1 in COS7-Zellen.....	128
Abb. 4.28: Elektrophysiologische Funktionsprüfung von SLAH3::mEOS2 in COS7-Zellen.....	130
Abb. 4.29: Vorgehen für die Verfolgung der Emissionen (Beugungsscheibchen der Fluorophore) zwischen Einzelbildern und Anpassung der PALM-Daten für die Stöchiometrieanalyse.....	133
Abb. 4.30: PALM-Aufnahmen der Kontrollen.....	135
Abb. 4.31: Auswahlkriterien der Cluster für die Stöchiometrieanalyse.....	136
Abb. 4.32: Referenzstöchiometrie von CD86::mEOS2 und CTLA4::mEOS2.....	137
Abb. 4.33: PALM-Aufnahmen von SLAH3::mEOS2 bei neutralem pH und unter Einfluss von zytosolischer Ansäuerung.....	138
Abb. 4.34: Oligomerisierungsgrad von SLAH3.....	139
Abb. 4.35: PALM-Aufnahmen und der Oligomerisierungsgrad von SLAH2::mEOS2 bei neutralem pH und unter Einfluss von zytosolischer Ansäuerung.....	141
Abb. 4.36: Die Proteinstöchiometrie von SLAH1 und SLAH4, sowie stöchiometrische Interaktionsstudien mit SLAH3.....	143
Abb. 4.37: Differenzierte Interaktionsanalysen mittels PALM-Stöchiometrien zwischen SLAH3, SLAH1 und SLAH4.....	145
Abb. 4.38: Oligomerisierungsgrad von SLAC1::mEOS2 und der SLAH3-HK::mEOS2-Mutante.....	146
Abb. 4.39: Polymerisierungsgrad der HA- und HF-Mutanten von SLAH3 mit und ohne zytosolischer Ansäuerung.....	148
Abb. 7.1: PALM-Abbildungen der HK- und HF-Mutanten von SLAH3.....	160
Abb. 7.2: PALM-Aufnahmen von SLAH3-HF::mEOS2.....	161

7.5 Liste der Tabellen

Tab. 1:	Plasmidkonstrukte. Liste der hergestellten Plasmidkonstrukte für die transiente Transfektion.....	37
Tab. 2:	Antikörper.....	43
Tab. 3:	Präparationsschritte für Dünnschnitte.....	45
Tab. 4:	<i>rapid</i> STORM-Parameter-Einstellungen für die Rekonstruktion von lokalisations-mikroskopischer Aufnahmen.....	58
Tab. 5:	<i>rapid</i> STORM-Parameter-Einstellungen für die Verfolgung von Emissionen aus den bereits rekonstruierten Lokalisationsdaten.....	60
Tab. 6:	Kriterien für die Auswahl der Cluster.....	62
Tab. 7:	Fluoreszenzlebensdauer der FRET-FLIM-Experimente in <i>Nb</i> -Blattepidermiszellen.....	119

7.6 Zusatzinformationen

Bauteile Weitfeldmikroskop-Aufbau:

Basisbauteile

Kamera:

iXon Ultra 897	Andor Technology
TuCam camera adapter	Andor Technology

Mikroskop:

IX71	Olympus
APON 60xOTIRF objective	Olympus
IX2-NPS nose-piece	Olympus

Montageplattform:

Luftgefederter Lasertisch	Qioptiq
---------------------------	---------

Laser

Genesis MX 561-500 STM	Coherent
Genesis MX 639-1000 STM	Coherent
iBeam smart 488-S	Toptica Photonics

Filter

Dichroitische Spiegel/ Strahlteiler:

1. ZT405/514/635rpc	Chroma	mit EF 1.
2. FF403/497/574-Di01 BrightLine	Semrock	mit EF 2.
LMUX-427.0-25.0M	Semrock	
LMUX-503.0-25.0M	Semrock	
LMUX-613.0-25.0M	Semrock	
LMUX-659.0-25.0M	Semrock	

Emissionsfilter:

1. Em01-R442/514/647	Semrock	mit DS 1.
2. FF01-433/517/613 BrightLine	Semrock	mit DS 2.

Bandpassfilter:

FF01-607/70 BrightLine	Semrock	mEOS2
LP647 RazorEdge	Semrock	AlexaFluor647

Langpassfilter:

BLP01-514R-25	Semrock
---------------	---------

Wellenlängensäuberung (Bandpassfilter/ Clean-up Filter):

FF01-405/10-25	Semrock
----------------	---------

FF01-488/10-25	Semrock
----------------	---------

FF01-561/10-25	Semrock
----------------	---------

FF01-642/10-25	Semrock
----------------	---------

Optische Bauteile

Linsen:

Achr. VIS ARB2; D= 50; F= 120	Qioptiq
Achr., 12,5 mm D., x 15 mm	Edmund Optics
Achr., 17,5 mm D., x 15 mm	Edmund Optics
Achr., 20 mm D., x 15 mm	Edmund Optics

Neutraldichtfilter:

ND Filter 100 mm D. 0.04-4.0 oD	Edmund Optics
---------------------------------	---------------

Feldblende:

SP60	Owis
------	------

Spiegel:

BB1-E02	Thorlabs
---------	----------

7.7 Danksagung

Hier möchte ich allen Personen Danken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Sauer und Herrn Prof. Dr. Dietmar Geiger für die Bereitstellung der Thematik, die Ermöglichung, und für die Begutachtung dieser Arbeit danken. Die zahllosen fruchtbaren Diskussionen und die vielseitige Unterstützung waren Grundlage für meine Zeit als Doktorand, die ich sehr zu schätzen weiß.

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Ermöglichung meiner Arbeit. Die vielen kreativen, fachlichen Gespräche haben meine Horizonte immer wieder erweitert.

Tobias Maierhofer sowohl für den differenzierten Austausch, als auch für die grandiose, nette, offene Zusammenarbeit am Lehrstuhl. Meiner Bürokollegin Sarah Aufmkolk, manchmal saß die letzte Rettung nur 2 m neben mir. Fabian Zwettler für die fachliche Unterstützung.

Insbesondere meinem gesamten Kollegium. Die zahllosen Antworten, Hilfestellungen, Gespräche, Freundschaften und gemeinsamen Kaltgetränke sind unbezahlbar und haben die Zeit zu etwas ganz Besonderem gemacht.

Meinen Eltern und meinem Bruder mit Max. Euer Rückhalt bietet mir immer Rückenwind in Richtung meiner Ziele, vielen Dank für alles.

Meinen Freunden Tobias Maisch, Tobias Klamp, Kai Pehoviak, Sebastian Mayer und Stephan Göb für die vielen Stunden, in denen ich den Laboralltag einmal hinter mir lassen konnte. Durch eure Veränderung des Blickwinkels konnte ich auf manche Fragestellung erst so die Antwort sehen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

All meinen Freunden, denn das Wichtigste kommt immer zum Schluss. Ich hoffe wir sehen uns bald wieder, jetzt habe ich ja hoffentlich endlich mal wieder Zeit:
GEHTSCHOOO.

8 Literaturverzeichnis

1. Zhu, J.K., *Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants*. Cell, 2016. **167**(2): p. 313-324.
2. Schroeder, J.I. and B.U. Keller, *Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 5025-9.
3. Chen, Y.H., et al., *Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1074-U157.
4. Negi, J., et al., *CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 483-U13.
5. Vahisalu, T., et al., *SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 487-U15.
6. Boominathan, P., et al., *Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in Cicer arietinum*. Plant Physiology, 2004. **135**(3): p. 1608-20.
7. Zhang, J.H., et al., *Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses*. Field Crops Research, 2006. **97**(1): p. 111-119.
8. Hu, H.H., et al., *Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells*. Nature Cell Biology, 2010. **12**(1): p. 87-U234.
9. Xue, S.W., et al., *Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell*. Embo Journal, 2011. **30**(8): p. 1645-1658.
10. Sierla, M., et al., *Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements*. Plant Physiology, 2016. **171**(3): p. 1569-1580.
11. Sawinski, K., et al., *Guarding the Green: Pathways to Stomatal Immunity*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013. **26**(6): p. 626-632.
12. McLachlan, D.H., M. Kopschke, and S. Robatzek, *Gate control: guard cell regulation by microbial stress*. New Phytologist, 2014. **203**(4): p. 1049-1063.
13. Roelfsema, M.R.G. and R. Hedrich, *In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'*. New Phytologist, 2005. **167**(3): p. 665-691.
14. Marten, H., R. Hedrich, and M.R.G. Roelfsema, *Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner*. Plant Journal, 2007. **50**(1): p. 29-39.
15. Gonzalez-Guzman, M., et al., *Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid*. Plant Cell, 2012. **24**(6): p. 2483-2496.

16. Sase, I., et al., *Real-Time Imaging of Single Fluorophores on Moving Actin with an Epifluorescence Microscope*. Biophysical Journal, 1995. **69**(2): p. 323-328.
17. Geiger, D., et al., *Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(50): p. 21425-21430.
18. Mori, I.C., et al., *CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure*. PLoS Biol, 2006. **4**(10): p. e327.
19. Geiger, D., et al., *Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(17): p. 8023-8028.
20. Maierhofer, T., et al., *Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid*. Science Signaling, 2014. **7**(342).
21. Hedrich, R. and D. Geiger, *Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure*. New Phytologist, 2017. **216**(1): p. 46-61.
22. Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones, *Biochemistry & molecular biology of plants*. second edition ed2015: John Wiley & Sons, Ltd.
23. Geiger, D., et al., *Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1*. Science Signaling, 2011. **4**(173).
24. Cubero-Font, P., et al., *Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation*. Current Biology, 2016. **26**(16): p. 2213-2220.
25. Bayle, V., L. Nussaume, and R.A. Bhat, *Combination of novel green fluorescent protein mutant TSapphire and DsRed variant mOrange to set up a versatile in planta FRET-FLIM assay*. Plant Physiology, 2008. **148**(1): p. 51-60.
26. Maierhofer, T., et al., *A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective*. Plant Cell, 2014. **26**(6): p. 2554-2567.
27. Kohler, B., et al., *Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots*. Plant Journal, 2002. **30**(2): p. 133-142.
28. Kruger, C.L., et al., *Quantitative single-molecule imaging of TLR4 reveals ligand-specific receptor dimerization*. Science Signaling, 2017. **10**(503).
29. Felle, H.H., *pH: Signal and messenger in plant cells*. Plant Biology, 2001. **3**(6): p. 577-591.
30. Kader, M.A. and S. Lindberg, *Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress*. Plant Signal Behav, 2010. **5**(3): p. 233-8.
31. Planes, M.D., et al., *A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of Arabidopsis thaliana based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions*. Journal of Experimental Botany, 2015. **66**(3): p. 813-825.
32. Behera, S., et al., *Cellular Ca(2+) Signals Generate Defined pH Signatures in Plants*. Plant Cell, 2018. **30**(11): p. 2704-2719.

33. Colcombet, J., et al., *Distinct pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of Arabidopsis thaliana hypocotyl cells*. Journal of Experimental Botany, 2005. **56**(417): p. 1897-1903.
34. Roelfsema, M.R.G., R. Hedrich, and D. Geiger, *Anion channels: master switches of stress responses*. Trends in Plant Science, 2012. **17**(4): p. 221-229.
35. Schubert, V., *Super-resolution Microscopy - Applications in Plant Cell Research*. Frontiers in Plant Science, 2017. **8**.
36. Wassie, A.T., Y. Zhao, and E.S. Boyden, *Expansion microscopy: principles and uses in biological research*. Nature Methods, 2019. **16**(1): p. 33-41.
37. Fricke, F., et al., *One, two or three? Probing the stoichiometry of membrane proteins by single-molecule localization microscopy*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14072.
38. Rodriguez, E.A., et al., *The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 2017. **42**(2): p. 111-129.
39. Keppler, A., et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 86-89.
40. Gautier, A., et al., *An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells*. Chemistry & Biology, 2008. **15**(2): p. 128-136.
41. Los, G.V., et al., *HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis*. Acs Chemical Biology, 2008. **3**(6): p. 373-82.
42. Klein, T., et al., *Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins*. Nature Methods, 2011. **8**(1): p. 7-9.
43. Klein, T., S. van de Linde, and M. Sauer, *Live-Cell Super-Resolution Imaging Goes Multicolor*. Chembiochem, 2012. **13**(13): p. 1861-1863.
44. Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **77**(1): p. 13-22.
45. van de Linde, S., et al., *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. Nature Protocols, 2011. **6**(7): p. 991-1009.
46. Terasaki, M., et al., *Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria*. Curr Protoc Cell Biol, 2001. **Chapter 4**: p. Unit 4 4.
47. Suzuki, T., et al., *DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997. **45**(1): p. 49-53.
48. Bureau, C., et al., *A protocol combining multiphoton microscopy and propidium iodide for deep 3D root meristem imaging in rice: application for the screening and identification of tissue-specific enhancer trap lines*. Plant Methods, 2018. **14**.
49. Hunter, C.T., et al., *Cellulose Synthase-Like D1 Is Integral to Normal Cell Division, Expansion, and Leaf Development in Maize*. Plant Physiology, 2012. **158**(2): p. 708-724.
50. Herth, W. and E. Schnepf, *The Fluorochrome, Calcofluor White, Binds Oriented to Structural Polysaccharide Fibrils*. Protoplasma, 1980. **105**(1-2): p. 129-133.
51. Abbe, Ernst (1873). "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung". In: Archiv für Mikroskop. Anatomie 9, pp. 413–418.
52. Lord Rayleigh, F.R.S., *Investigations in optics, with special reference to the spectroscopy*. Philosophical Magazine, 1879. **5**(8 (49)): p. 261–274.

53. Amos, B., G. McConell, and T. Wilson, *Confocal Microscopy*. Band 2 ed. E. Egelman (Hrsg.): Biophysical Techniques for Characterization of Cells (= Comprehensive Biophysics)2012: Elsevier, Academic Press.
54. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Airy_disk_spacing_near_Rayleigh_criterion.png
55. KaiMartin author of the figure:Diffraction limited intensity distribution in the far field behind a circular aperture. The distribution was calculated by $I(r) = (J_1(r)/r)^2$ with the first order bessel function J_1 and the distance r from the center. The gray shading scales logarithmically.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diffraction_disc_calculated.png
56. Cox, G. and C.J. Sheppard, *Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy*. Microsc Res Tech, 2004. **63**(1): p. 18-22.
57. Jares-Erijman, E.A. and T.M. Jovin, *FRET imaging*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1387-1395.
58. Lakowicz, J.R., et al., *Fluorescence Lifetime Imaging of Intracellular Calcium in Cos Cells Using Quin-2*. Cell Calcium, 1994. **15**(1): p. 7-27.
59. Bastiaens, P.I.H. and A. Squire, *Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(2): p. 48-52.
60. Harpur, A.G., F.S. Wouters, and P.I.H. Bastiaens, *Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(2): p. 167-169.
61. Elangovan, M., R.N. Day, and A. Periasamy, *Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell*. J Microsc, 2002. **205**: p. 3-14.
62. Wallrabe, H. and A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(1): p. 19-27.
63. Aoki, K., Y. Kamioka, and M. Matsuda, *Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: Basis of biosensor construction, live imaging, and image processing*. Development Growth & Differentiation, 2013. **55**(4): p. 515-522.
64. Bajar, B.T., et al., *A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs*. Sensors, 2016. **16**(9).
65. Zapata-Hommer, O. and O. Griesbeck, *Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP*. BMC Biotechnology, 2003. **3**.
66. Shcherbakova, D.M., et al., *An Orange Fluorescent Protein with a Large Stokes Shift for Single-Excitation Multicolor FCCS and FRET Imaging*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(18): p. 7913-7923.
67. Schoberer, J. and S.W. Botchway, *Investigating protein-protein interactions in the plant endomembrane system using multiphoton-induced FRET-FLIM*. Methods Mol Biol, 2014. **1209**: p. 81-95.
68. Neil, M.A.A., R. Juškaitis, and T. Wilson, *Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope*. Optics Letters, 1997. **22**(24): p. 1905-1907.
69. Langhorst, M.F., J. Schaffer, and B. Goetze, *Structure brings clarity: structured illumination microscopy in cell biology*. Biotechnol J, 2009. **4**(6): p. 858-65.

70. Gustafsson, M.G.L., *Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(37): p. 13081-13086.
71. Gustafsson, M.G.L., *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of Microscopy-Oxford, 2000. **198**: p. 82-87.
72. Guerra, J.M., *Superresolution through illumination by Diffraction-Born Evanescent Waves*. Applied Physics Letters, 1995. **66**(26): p. 3555-3557.
73. Chen, F., P.W. Tillberg, and E.S. Boyden, *Optical imaging. Expansion microscopy*. Science, 2015. **347**(6221): p. 543-8.
74. Gambarotto, D., et al., *Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM)*. Nature Methods, 2019. **16**(1): p. 71-+.
75. Tillberg, P.W., et al., *Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(9): p. 987-+.
76. Muller, A., et al., *Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23108-11.
77. Ebeling, W., et al., *Proteinase K from Tritirachium-Album Limber*. European Journal of Biochemistry, 1974. **47**(1): p. 91-97.
78. Bayer, E.A., et al., *Cellulose, cellulases and cellulosomes*. Current Opinion in Structural Biology, 1998. **8**(5): p. 548-557.
79. Benoit, I., et al., *Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin*. BMC Genomics, 2012. **13**.
80. Beg, Q.K., et al., *Microbial xylanases and their industrial applications: a review*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56**(3-4): p. 326-338.
81. Reynolds, J.A. and C. Tanford, *Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios - Possible Implications for State of Proteins in Biological Membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1970. **66**(3): p. 1002-+.
82. Chung, K., et al., *Structural and molecular interrogation of intact biological systems*. Nature, 2013. **497**(7449): p. 332-+.
83. Ku, T., et al., *Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(9): p. 973-+.
84. Betzig, E., *Proposed Method for Molecular Optical Imaging*. Optics Letters, 1995. **20**(3): p. 237-239.
85. Jablonski, A., *Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes*. Nature, 1933. **131**(3319): p. 839-840.
86. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed2006: Springer US. XXVI, 954.
87. van de Linde, S., et al., *Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011. **10**(4): p. 499-506.

88. Heilemann, M., et al., *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(33): p. 6172-6176.
89. Betzig, E., et al., *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.
90. McKinney, S.A., et al., *A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein*. Nature Methods, 2009. **6**(2): p. 131-133.
91. Annibale, P., et al., *Photoactivatable Fluorescent Protein mEos2 Displays Repeated Photoactivation after a Long-Lived Dark State in the Red Photoconverted Form*. Journal of Physical Chemistry Letters, 2010. **1**(9): p. 1506-1510.
92. Lando, D., et al., *Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during G2 in fission yeast*. Open Biology, 2012. **2**.
93. Coltharp, C., R.P. Kessler, and J. Xiao, *Accurate Construction of Photoactivated Localization Microscopy (PALM) Images for Quantitative Measurements*. PLoS One, 2012. **7**(12).
94. Lee, S.H., et al., *Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(43): p. 17436-17441.
95. Tokunaga, M., N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa, *Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells (vol 5, pg 159, 2008)*. Nature Methods, 2008. **5**(5): p. 455-455.
96. Fish, K.N., *Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2009. **Chapter 12**: p. Unit12 18.
97. Wang, Y.C., et al., *2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm Bombyx mori*. Scientific Reports, 2015. **5**.
98. Petricka, J.J., C.M. Winter, and P.N. Benfey, *Control of Arabidopsis Root Development*. Annual Review of Plant Biology, Vol 63, 2012. **63**: p. 563-590.
99. Benkova, E. and J. Hejatko, *Hormone interactions at the root apical meristem*. Plant Molecular Biology, 2009. **69**(4): p. 383-396.
100. Wolters, H. and G. Jurgens, *Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(5): p. 305-317.
101. De Smet, S., et al., *Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in Arabidopsis thaliana: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(8): p. 19195-19224.
102. Von Zephyris - Diese Datei wurde von diesem Werk abgeleitet: Leaf Tissue Structure.svg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18666178>
103. Gross J (1991). Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold. ISBN 978-0442006570.

104. Dong, B., et al., *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Microtubule Arrays in Intact Arabidopsis thaliana Seedling Roots*. Scientific Reports, 2015. **5**.
105. Nour-Eldin, H.H., et al., *Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(18).
106. Pasternak, T., et al., *Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants*. Plant Methods, 2015. **11**.
107. Latz, A., et al., *In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel*. Planta, 2007. **225**(5): p. 1179-1191.
108. Romeis, T., et al., *Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response*. Embo Journal, 2001. **20**(20): p. 5556-5567.
109. Markert, S.M., et al., *3D subcellular localization with superresolution array tomography on ultrathin sections of various species*. Correlative Light and Electron Microscopy Iii, 2017. **140**: p. 21-47.
110. Asano, S.M., et al., *Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues*. Curr Protoc Cell Biol, 2018. **80**(1): p. e56.
111. Pardo, A.G. and F. Forchiassin, *Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in Nectria catalinensis*. Rev Argent Microbiol, 1999. **31**(1): p. 31-5.
112. Burgert, A., et al., *Artifacts in single-molecule localization microscopy*. Histochemistry and Cell Biology, 2015. **144**(2): p. 123-131.
113. Panzer, S., et al., *Opsin 1 and Opson 2 of the Corn Smut Fungus Ustilago maydis Are Green Light-Driven Proton Pumps*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**.
114. Hummer, G., F. Fricke, and M. Heilemann, *Model-independent counting of molecules in single-molecule localization microscopy*. Molecular Biology of the Cell, 2016. **27**(22): p. 3637-3644.
115. Broess, K., J.W. Borst, and H. van Amerongen, *Applying two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy to study photosynthesis in plant leaves*. Photosynthesis Research, 2009. **100**(2): p. 89-96.
116. Donaldson, L.A. and K. Radotic, *Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood*. J Microsc, 2013. **251**(2): p. 178-87.
117. Knox, J.P., *In situ detection of cellulose with carbohydrate-binding modules*. Methods Enzymol, 2012. **510**: p. 233-45.
118. Coskun, D., et al., *Silver ions disrupt K(+) homeostasis and cellular integrity in intact barley (Hordeum vulgare L.) roots*. J Exp Bot, 2012. **63**(1): p. 151-62.
119. Avramova, Z.V., *Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences*. Plant Physiol, 2002. **129**(1): p. 40-9.
120. Baxter, I., et al., *Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in Arabidopsis*. Plos Genetics, 2009. **5**(5).
121. Naseer, S., et al., *Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(25): p. 10101-10106.
122. Peret, B., et al., *Arabidopsis lateral root development: an emerging story*. Trends in Plant Science, 2009. **14**(7): p. 399-408.

123. Dolan, L., et al., *Cellular-Organization of the Arabidopsis-Thaliana Root*. Development, 1993. **119**(1): p. 71-84.
124. Kohler, B. and K. Raschke, *The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley*. Plant Physiology, 2000. **122**(1): p. 243-54.
125. Lin, S.H., et al., *Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport*. Plant Cell, 2008. **20**(9): p. 2514-2528.
126. Zheng, X.J., et al., *Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in Arabidopsis*. Plant Cell and Environment, 2015. **38**(3): p. 474-486.
127. Kim, M.K., et al., *Specimen block counter-staining for localization of GUS expression in transgenic arabidopsis and tobacco*. Plant Cell Rep, 2002. **21**(1): p. 35-39.
128. Johansson, I., et al., *External K⁺ modulates the activity of the Arabidopsis potassium channel SKOR via an unusual mechanism*. Plant Journal, 2006. **46**(2): p. 269-281.
129. Dubrovsky, J.G., et al., *Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana*. Planta, 2001. **214**(1): p. 30-36.
130. Dubrovsky, J.G., et al., *The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation*. Annals of Botany, 2009. **103**(5): p. 807-817.
131. Malamy, J.E. and P.N. Benfey, *Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana*. Development, 1997. **124**(1): p. 33-44.
132. Peret, B., A. Larrieu, and M.J. Bennett, *Lateral root emergence: a difficult birth*. Journal of Experimental Botany, 2009. **60**(13): p. 3637-3643.
133. Laskowski, M.J., et al., *Formation of lateral root meristems is a two-stage process*. Development, 1995. **121**(10): p. 3303-3310.
134. Hirayama, T. and K. Shinozaki, *Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future*. Plant Journal, 2010. **61**(6): p. 1041-1052.
135. Urano, K., et al., *'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses*. Current Opinion in Plant Biology, 2010. **13**(2): p. 132-138.
136. Zhu, J.K., *Salt and drought stress signal transduction in plants*. Annual Review of Plant Biology, 2002. **53**: p. 247-273.
137. Sun, C.H., J.Q. Yu, and D.G. Hu, *Nitrate: A Crucial Signal during Lateral Roots Development*. Frontiers in Plant Science, 2017. **8**.
138. Bouguyon, E., et al., *Nitrate Controls Root Development through Posttranscriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 Transporter/Sensor*. Plant Physiology, 2016. **172**(2): p. 1237-1248.
139. Muntz, K., *Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles*. Journal of Experimental Botany, 2007. **58**(10): p. 2391-407.
140. Willmer, C.M., Fricker, M., , *Stomata*. 2 ed, ed. M. Black, Charlwood, B. Vol. 2. 1996, Topics in plant functional biology: Chapman & Hall.
141. Wydro, M., E. Kozubek, and P. Lehmann, *Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of Nicotiana benthamiana*. Acta Biochimica Polonica, 2006. **53**(2): p. 289-298.

142. Heilemann, M., et al., *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(33): p. 6172-6.
143. van de Linde, S., et al., *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. *Nat Protoc*, 2011. **6**(7): p. 991-1009.
144. Wassie, A.T., Y. Zhao, and E.S. Boyden, *Expansion microscopy: principles and uses in biological research*. *Nat Methods*, 2019. **16**(1): p. 33-41.
145. Kleine-Vehn, J., et al., *Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane*. *Molecular Systems Biology*, 2011. **7**.
146. Blilou, I., et al., *The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots*. *Nature*, 2005. **433**(7021): p. 39-44.
147. Grieneisen, V.A., et al., *Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth*. *Nature*, 2007. **449**(7165): p. 1008-1013.
148. Krecek, P., et al., *The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters*. *Genome Biol*, 2009. **10**(12).
149. Grunewald, W. and J. Friml, *The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells*. *Embo Journal*, 2010. **29**(16): p. 2700-2714.
150. Friml, J., *Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport*. *European Journal of Cell Biology*, 2010. **89**(2-3): p. 231-235.
151. Feraru, E. and J. Friml, *PIN polar targeting*. *Plant Physiol*, 2008. **147**(4): p. 1553-9.
152. Retzer, K., et al., *Evolutionary Conserved Cysteines Function as cis-Acting Regulators of Arabidopsis PIN-FORMED 2 Distribution*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **18**(11).
153. Pinosa, F, *Analysis of PIN2 polarity regulation and Mob1 function in Arabidopsis root development*, Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der biologischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2010. p. 35-56
154. Komis, G., et al., *Superresolution live imaging of plant cells using structured illumination microscopy*. *Nature Protocols*, 2015. **10**(8): p. 1248-1263.
155. Komis, G., et al., *Advances in Imaging Plant Cell Dynamics*. *Plant Physiology*, 2018. **176**(1): p. 80-93.
156. Loschberger, A., et al., *Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution*. *Journal of Cell Science*, 2012. **125**(3): p. 570-575.
157. Raab, M., et al., *Using DNA origami nanorulers as traceable distance measurement standards and nanoscopic benchmark structures*. *Scientific Reports*, 2018. **8**.
158. Keegstra, K., *Plant Cell Walls*. *Plant Physiology*, 2010. **154**(2): p. 483-486.
159. Huang, C., et al., *The Receptor-Like Kinase AtVRLK1 Regulates Secondary Cell Wall Thickening*. *Plant Physiology*, 2018. **177**(2): p. 671-683.
160. Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (2008). *Biology* (8th ed.). p. 118. ISBN 978-0-8053-6844-4.

161. Reza, M., et al., *Transmission Electron Microscopy for Wood and Fiber Analysis - A Review*. *Bioresources*, 2015. **10**(3): p. 6230-6261.
162. Wang, W., et al., *Spatially and temporally restricted expression of PtrMYB021 regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 2016. **59**(1): p. 16-23.
163. Carlsbecker, A. and Y. Helariutta, *Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005. **8**(5): p. 512-517.
164. Kubo, M., et al., *Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation*. *Genes & Development*, 2005. **19**(16): p. 1855-1860.
165. Burgert, A., et al., *Artifacts in single-molecule localization microscopy*. *Histochem Cell Biol*, 2015. **144**(2): p. 123-31.
166. Clancy, B. and L.J. Cauller, *Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride*. *Journal of Neuroscience Methods*, 1998. **83**(2): p. 97-102.
167. Kopek, B.G., et al., *Diverse protocols for correlative super-resolution fluorescence imaging and electron microscopy of chemically fixed samples*. *Nature Protocols*, 2017. **12**(5): p. 916-946.
168. Klein, T., S. Proppert, and M. Sauer, *Eight years of single-molecule localization microscopy*. *Histochem Cell Biol*, 2014. **141**(6): p. 561-75.
169. Endesfelder, U. and M. Heilemann, *Direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM)*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1251**: p. 263-76.
170. Liesche, J., I. Ziomkiewicz, and A. Schulz, *Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells*. *Bmc Plant Biology*, 2013. **13**.
171. Ledbetter, M.C. and K.R. Porter, *A Microtubule in Plant Cell Fine Structure*. *Journal of Cell Biology*, 1963. **19**(1): p. 239-&.
172. Austin, J.R. and L.A. Staehelin, *Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography*. *Plant Physiology*, 2011. **155**(4): p. 1601-1611.
173. Dekker, J.P. and E.J. Boekema, *Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1706**(1-2): p. 12-39.
174. Rumak, I., et al., *3-D modelling of chloroplast structure under (Mg²⁺) magnesium ion treatment. Relationship between thylakoid membrane arrangement and stacking*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2010. **1797**(10): p. 1736-1748.
175. Ruban, A.V. and M.P. Johnson, *Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane*. *Nat Plants*, 2015. **1**(11).
176. Belgio, E., P. Ungerer, and A.V. Ruban, *Light-harvesting superstructures of green plant chloroplasts lacking photosystems*. *Plant Cell and Environment*, 2015. **38**(10): p. 2035-2047.
177. Chuartzman, S.G., et al., *Thylakoid membrane remodeling during state transitions in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008. **20**(4): p. 1029-1039.

178. Somssich, M., G.A. Khan, and S. Persson, *Cell Wall Heterogeneity in Root Development of Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science, 2016. **7**.
179. Mori, B. and L.M. Bellani, *Differential staining for cellulosic and modified plant cell walls*. Biotech Histochem, 1996. **71**(2): p. 71-2.
180. Maeda, H. and N. Ishida, *Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener*. J Biochem, 1967. **62**(2): p. 276-8.
181. Wood, P.J., *Specificity in the Interaction of Direct Dyes with Polysaccharides*. Carbohydrate Research, 1980. **85**(2): p. 271-287.
182. J. Hughes & Margaret E. McCully (1975) The Use of an Optical Brightener in the Study of Plant Structure, Stain Technology, 50:5, 319-329
183. Reese, E.T., R.G.H. Siu, and H.S. Levinson, *The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and Its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis*. Journal of Bacteriology, 1950. **59**(4): p. 485-497.
184. Brunecky, R., et al., *Revealing Nature's Cellulase Diversity: The Digestion Mechanism of Caldicellulosiruptor bescii CelA*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1513-1516.
185. Zhang, Y.H.P., M.E. Himmel, and J.R. Mielenz, *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(5): p. 452-481.
186. Kuhad, R.C., A. Singh, and K.E. Eriksson, *Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 1997. **57**: p. 45-125.
187. Himmel, M.E., M.F. Ruth, and C.E. Wyman, *Cellulase for commodity products from cellulosic biomass*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(4): p. 358-64.
188. Deswal, D., Y.P. Khasa, and R.C. Kuhad, *Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation*. Bioresour Technol, 2011. **102**(10): p. 6065-72.
189. Barnes, A.C., C.G. Elowsky, and R.L. Roston, *An Arabidopsis protoplast isolation method reduces cytosolic acidification and activation of the chloroplast stress sensor SENSITIVE TO FREEZING 2*. Plant Signal Behav, 2019: p. 1-7.
190. Priyadarshani, S., et al., *Correction to: Simple protoplast isolation system for gene expression and protein interaction studies in pineapple (Ananas comosus L.)*. Plant Methods, 2018. **14**: p. 106.
191. Wu, J.Z., et al., *Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. BMC Biotechnology, 2017. **17**(1): p. 29.
192. Nanjareddy, K., et al., *Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf disc infiltration of Phaseolus vulgaris: tools for rapid gene expression analysis*. BMC Biotechnology, 2016. **16**(1): p. 53.
193. <https://searchlight.semrock.com/>
194. Chuong, S.D., V.R. Franceschi, and G.E. Edwards, *The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C4 photosynthesis in Chenopodiaceae species*. Plant Cell, 2006. **18**(9): p. 2207-23.

195. Wada, M. and S.G. Kong, *Actin-mediated movement of chloroplasts*. J Cell Sci, 2018. **131**(2).
196. Kumar, A.S., et al., *Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity*. Elife, 2018. **7**.
197. Kwok, E.Y. and M.R. Hanson, *Stromules and the dynamic nature of plastid morphology*. J Microsc, 2004. **214**(Pt 2): p. 124-37.
198. Kohler, R.H., et al., *Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2039-2042.
199. Caviston, J.P. and E.L.F. Holzbaur, *Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport*. Trends in Cell Biology, 2006. **16**(10): p. 530-537.
200. Suetsugu, N., et al., *Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(19): p. 8860-8865.
201. Dong, B., et al., *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Microtubule Arrays in Intact Arabidopsis thaliana Seedling Roots*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15694.
202. Ovecka, M., et al., *Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy*. Nat Plants, 2018. **4**(9): p. 639-650.
203. Schubert, V., *Super-resolution Microscopy - Applications in Plant Cell Research*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 531.
204. Wymer, C.L., et al., *Confocal microscopy of plant cells*. Methods Mol Biol, 1999. **122**: p. 103-30.
205. Palmer, W.M., et al., *PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13492.
206. Kurihara, D., et al., *ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging*. Development, 2015. **142**(23): p. 4168-79.
207. Puchtler, H. and S.N. Meloan, *On the Chemistry of Formaldehyde Fixation and Its Effects on Immunohistochemical Reactions*. Histochemistry, 1985. **82**(3): p. 201-204.
208. Sung, H.W., et al., *Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds*. Biomaterials, 1996. **17**(14): p. 1405-1410.
209. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. Journal of Microscopy-Oxford, 2006. **224**: p. 213-232.
210. Dreyer, I., et al., *Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately*. Biophysical Journal, 1997. **72**(5): p. 2143-2150.
211. Klein, T., et al., *Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins*. Nat Methods, 2011. **8**(1): p. 7-9.
212. Baker, R.F., et al., *Sucrose Transporter ZmSut1 Expression and Localization Uncover New Insights into Sucrose Phloem Loading*. Plant Physiology, 2016. **172**(3): p. 1876-1898.

213. Carpaneto, A., et al., *Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(22): p. 21437-21443.
214. Scherzer, S., et al., *Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels*. Molecular Plant, 2012. **5**(6): p. 1409-1412.
215. Kruger, C.L., et al., *Quantitative single-molecule imaging of TLR4 reveals ligand-specific receptor dimerization*. Sci Signal, 2017. **10**(503).
216. Hummer, G., F. Fricke, and M. Heilemann, *Model-independent counting of molecules in single-molecule localization microscopy*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(22): p. 3637-3644.
217. Werner Timischl: Angewandte Statistik. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. 2013, 3. Auflage, S. 313.
218. Lehmann, J., et al., *The S-type anion channel SLAH3 operates as a proton sensor and master switch during stress-induced cytosolic acidosis*. . PNAS (submitted), 2020.
219. Wang, Y., et al., *2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm Bombyx mori*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16273.
220. Liao, S.M., et al., *The multiple roles of histidine in protein interactions*. Chem Cent J, 2013. **7**(1): p. 44.
221. Dreyer, I., et al., *Molecular evolution of slow and quick anion channels (SLACs and QUACs/ALMTs)*. Frontiers in Plant Science, 2012. **3**.
222. Maierhofer, T., et al., *A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective*. Plant Cell, 2014. **26**(6): p. 2554-2567.
223. Demir, F., et al., *Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(20): p. 8296-8301.
224. Felle, H.H., *Control of cytoplasmic pH under anoxic conditions and its implication for plasma membrane proton transport in Medicago sativa root hairs*. Journal of Experimental Botany, 1996. **47**(300): p. 967-973.
225. Beffagna, N., et al., *Effects of abscisic acid and cytoplasmic pH on potassium and chloride efflux in Arabidopsis thaliana seedlings*. Plant and Cell Physiology, 1997. **38**(5): p. 503-510.