

**Molekulare Mechanismen
des protonengekoppelten Zuckertransportes in
Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana***

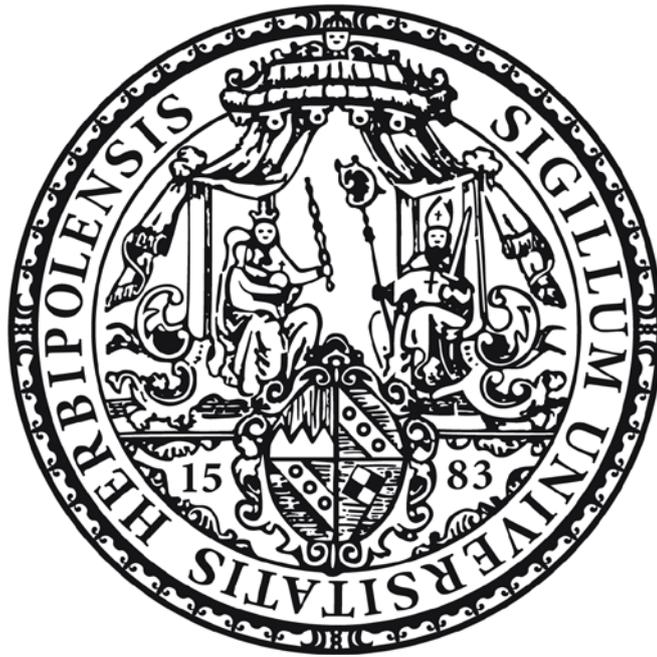
Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Schulz

aus Würzburg

Würzburg 2012



**Molekulare Mechanismen
des protonengekoppelten Zuckertransportes in
Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Schulz

aus Würzburg

Würzburg 2012

EINGEREICHT AM:

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

VORSITZENDER:

GUTACHTER: PROF. DR. RAINER HEDRICH

GUTACHTER: PROF. DR. HERMANN KOEPEL

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Die pflanzliche Vakuole.....	1
1.2 Transportprozesse am Tonoplasten.....	3
1.3 Zuckertransport in höheren Pflanzen	6
1.4 Die Familien der Zuckertransporter	8
1.4.1 Die SWEET-Transporterfamilie.....	9
1.4.2 Die Monosaccharidtransporter-ähnliche Genfamilie	10
1.4.3 Die Familie der Saccharosetransporter.....	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Pflanzenmaterial.....	17
2.1.1 Pflanzenanzucht	17
2.1.2 Protoplasten- und Vakuolenisolation	17
2.2 Patch-Clamp-Technik.....	18
2.2.1 Patch-Clamp-Messplatz	20
2.2.2 Funktionsprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers	21
2.2.3 Präparation der Patch- und der Referenzelektrode.....	23
2.2.4 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente	24
2.2.5 Substrat-Applikationssystem.....	27
2.2.6 Vorzeichenkonvention.....	28
2.2.7 Auswertung der Rohdaten	29
2.3 Lösungen für Patch-Clamp-Messungen	29
2.3.1 Lösungen zur Untersuchung von Zuckertransportern	29
2.3.2 Lösungen zur Untersuchung der V-ATPase.....	30
2.4 Protoplastentransformation	31
2.4.1 Bakterienanzucht.....	31
2.4.2 Isolation und Konzentrationsbestimmung der DNA.....	31
2.4.3 Transformationsprotokoll.....	31
2.5 Fluoreszenzmikroskopische Methoden.....	33
2.5.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC)	33

2.5.2 Lokalisationsstudien.....	34
2.6 Genexpressionsanalysen	35
2.6.1 mRNA-Isolierung	35
2.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	36
2.6.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	37
3. Ergebnisse	40
3.1 Experimentelle Strategie zur elektrophysiologischen Untersuchung vakuolärer Zuckertransporter und der V-ATPase in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen	40
3.2 Elektrische und kinetische Eigenschaften der V-ATPase in Mesophyllvakuolen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
3.3 Molekulare Mechanismen des Glucosetransportes in Mesophyllvakuolen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
3.3.1 Transportmechanismus von <i>AtTMT1/2</i>	43
3.3.2 Einfluss der protonenmotorischen Kraft auf die Aktivität von <i>AtTMT1</i>	46
3.3.3 Rolle von <i>AtVGT1/2</i>	47
3.3.4 Einfluss der Glucosekonzentration auf glucoseinduzierte Protonenströme in Wildtypvakuolen.....	50
3.3.5 Effekt von Salzstress auf die Expression von <i>TMT1/TMT2</i> und <i>VHA-a2</i>	52
3.3.6 Interaktionsstudien zu <i>AtTMT1</i> und <i>AtVIK1</i>	53
3.3.7 Transportmechanismus von <i>AtERDL6</i>	56
3.4 Molekulare Mechanismen des Saccharosetransportes in Mesophyllvakuolen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
3.4.1 Saccharose/Protonen-Antiport in Wildtypvakuolen.....	58
3.4.2 Rolle von <i>AtTMT1/2</i> beim Saccharosetransport.....	60
3.4.3 Transportmechanismus von <i>AtSUC4</i>	63
4. Diskussion	66
4.1 <i>AtTMT1/2</i> mit zentraler Rolle bei der protonengekoppelten Glucoseaufnahme ..	66
4.2 pH-abhängige Aktivität von <i>AtTMT1</i> und der V-ATPase	69
4.3 Anwesenheit weiterer Glucose/Protonen-Antiporter	72
4.4 Vakuoläre Zuckertransporter mit geringer Affinität.....	73
4.5 <i>AtVIK1</i> -abhängiger <i>AtTMT1</i> -vermittelter Glucosetransport	74

4.6 Beteiligung des Glucose/Protonen-Symporter <i>AtERDL6</i> am Glucoseexport aus der Vakuole.....	77
4.7 Konzentrationsabhängige vakuoläre Saccharose/ Protonen-Antiportaktivität.....	80
4.8 <i>AtTMT1/2</i> -vermittelter Transport von Saccharose.....	81
4.9 Funktion von <i>AtSUC4</i> als Saccharose/Protonen-Symporter <i>in planta</i>	82
4.10 Anzahl und Umsatzrate von vakuolären Zuckersymportern und der V-ATPase.	84
4.11 Koordination von vakuolären Transportprozessen unter verschiedenen Umwelteinflüssen	85
5. Zusammenfassung	89
6. Summary	91
7. Anhang	93
7.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten und Vektoren.....	93
7.1.1 Mutanten	93
7.1.2 Vektoren.....	93
7.2 Literaturverzeichnis.....	95
7.3 Abbildungsverzeichnis	105
7.4 Abkürzungsverzeichnis.....	105
7.5 Publikationen.....	109
7.6 Lebenslauf.....	110
7.7 Danksagung	112
7.8 Eidesstattliche Erklärung.....	113

1. Einleitung

1.1 Die pflanzliche Vakuole

Pflanzenzellen weisen im Vergleich zu tierischen Zellen einzigartige strukturelle Charakteristika, wie Zellwand, Plastide und Vakuolen auf. Vakuolen gehen als terminales Produkt des sekretorischen Stoffwechselweges hervor und können im ausdifferenzierten Zustand mehr als 80-90% des Zellvolumens in Pflanzen einnehmen (Wink, 1993; Marty, 1999). Sie weisen eine hohe Vielfalt in Größe, Form und Funktion auf, wobei prinzipiell wenigstens zwei Arten von Vakuolen, die lytische Vakuole und die Proteinspeichervakuole, unterschieden werden (Wink, 1993; Carter et al., 2004). Die beiden Typen nehmen verschiedene Funktionen ein und können gemeinsam in einer pflanzlichen Zelle vorkommen (Carter et al., 2004; Frigerio et al., 2008; Martinoia et al., 2012). Lytische Vakuolen sind, ähnlich den Hefevakuolen und den Lysosomen tierischer Zellen, mit einer großen Anzahl an hydrolytischen und oxidierenden Enzymen, wie Hydrolasen, Esterasen, Nukleasen und Peroxidasen, ausgestattet (Wink, 1993). Proteinspeichervakuolen kommen vornehmlich in Samen und Wurzeln vor und dienen dort der Speicherung von Proteinen (Carter et al., 2004). Die beiden Vakuolentypen können weiterhin anhand im Tonoplasten lokalisierter Aquaporine, den sogenannten TIPs (tonoplast intrinsic protein), differenziert und zugeordnet werden (Jauh et al., 1999). Dabei sind die α -TIPs und δ -TIPs in der Membran von Proteinspeichervakuolen und die γ -TIPs in der Membran von lytischen Vakuolen lokalisiert (Martinoia et al., 2012). In ausdifferenzierten Geweben fusionieren Speichervakuole und lytische Vakuole häufig zu einer großen zentralen Vakuole, wobei die funktionellen Charakteristika der beiden Vakuolentypen erhalten bleiben (Carter et al., 2004). Aufgrund der beschriebenen Komplexität sowie der zusätzlich vorhandenen Vorstufen ausdifferenzierter Vakuolen bezeichnet man die Summe aller Vakuolen als „vacuome“ (Martinoia et al., 2000).

Erkenntnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass Vakuolen eine zentrale Rolle im zellulären Energiemanagement, bei der Akkumulierung von Reserve- und Nährstoffen, bei der Regulierung des Zellurgors, bei der Homöostase von Ionen und pH, bei der Entgiftung und in der Pflanzenentwicklung spielen. Sie leisten somit einen

großen Beitrag zur Steuerung des Metabolismus in Pflanzen (Marty, 1999; Neuhaus 2007). Dabei scheinen Vakuolen hoch spezialisierte Funktionen je nach Gewebe- und Zelltyp sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erfüllen (Martinoia et al., 2007).

In ihrer Funktion als temporäre und langfristige Speicherorganelle für viele Stoffe, wie z.B. Proteine, Aminosäuren, organische Säuren, anorganische Ionen, Polysaccharide und Zucker, sorgen Vakuolen für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase. Dabei stellen sie der Pflanze für Stoffwechselfvorgänge erforderliche Metabolite zur Verfügung und akkumulieren toxische Substanzen zur Minimierung schädlicher zytosolischer Effekte (Taiz, 1992; Martinoia et al., 2007). So werden viele Signalwege durch den zytosolischen Kalziumspiegel gesteuert, der üblicherweise im Ruhezustand sehr niedrig bei etwa 100 nM liegt. Die Vakuole stellt den internen Hauptspeicher für Kalziumionen dar und beliefert das Zytosol z.B. unter abiotischen oder biotischen Stresssituationen mit dem Signal-Kation (Martinoia et al., 2007). Ebenso muss die Homöostase der zytosolischen Natriumkonzentration präzise reguliert werden, da erhöhte Konzentrationen toxische Effekte im Zytosol induzieren, die zum Absterben der Zellen führen können. Um entsprechende Schädigungen zu vermeiden, wird Natrium sowohl in den Apoplasten als auch in die Vakuole abtransportiert (Mahajan et al., 2008). Ebenso agieren Vakuolen als wichtige Regulatoren bei Homöostase und Entgiftung von Schwermetallen (Martinoia et al., 2007). Dabei ist es wichtig, dass die Konzentration toxischer Schwermetalle, wie Cadmium, Zink und Eisen, im Zytosol nur so hoch ist, wie sie in metabolischen Prozessen Nutzen findet (Martinoia et al., 2007). So wird z.B. Eisen bei photosynthetischen Prozessen in den Chloroplasten benötigt, wohingegen Zink als Kofaktor vieler Transkriptionsfaktoren und Enzyme fungiert (Martinoia et al., 2007). Um eine Homöostase zu garantieren, die schädliche Effekte der Schwermetalle im Zytosol ausschließt, werden diese in die Vakuole abtransportiert (Taiz, 1992). Vakuolen spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen und beeinflussen folglich den Stoffwechselmetabolismus der gesamten Pflanze. Speicherprodukte wie Zucker, Sulfat, Phosphat und Nitrat werden der Pflanze für zukünftige Wachstumsphasen, Samenentwicklung, Ausdifferenzierung neuer Blätter sowie unter kritischen Umweltbedingungen aus dem Vakuolenspeicher zur Verfügung gestellt (Martinoia et al., 2007; Neuhaus, 2007; Poschet et al., 2011).

Eine weitere zentrale Aufgabe ist die Aufrechterhaltung des Turgordruckes und der Homöostase des intrazellulären pH-Wertes (Taiz, 1992). Über den Turgor garantieren Vakuolen der Pflanze eine mechanische Stabilität sowie eine große Oberfläche, die eine breitflächige Verteilung der Chloroplasten zur optimalen Lichtabsorption garantiert (Wink, 1993; Martinoia et al., 2000). Der pH-Wert ist für Stabilität und Funktionalität von Proteinen essentiell. Zudem dient der pH-Gradient über Membransysteme als Energiequelle für sekundär aktive Transportprozesse (Kap. 1.2).

1.2 Transportprozesse am Tonoplasten

Speicherung und Entlassung von Stoffen erfordern einen Austausch zwischen Vakuolenlumen und Zytosol. Dieser findet über die semi-permeable Membran der Vakuole, dem Tonoplasten, statt. Zusätzlich zur passiven Diffusion von H₂O und niedermolekularen ungeladenen Stoffen existieren in allen biologischen Membranen drei Arten von integralen Transportproteinen: Pumpen, Transporter (Carrier) und Kanäle.

Kanäle liegen entweder im offenen oder im geschlossenen Zustand vor und vermitteln den passiven Transport von Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten. Dies hat zur Folge, dass Kanäle eine hohe Transportrate von ca. 10⁸ s⁻¹ aufweisen. Der prominenteste Kanal im Tonoplasten ist der SV-Kanal (Slow-Activating-Vacuolar-Channel). Dieser ist für di- und monovalente Kationen permeabel, spannungsabhängig und sowohl zytosolisch als auch luminal kalziumgesteuert (Hedrich et al., 1986; Hedrich und Neher, 1987; Allen und Sanders, 1996; Ivashikina und Hedrich 2005; Beyhl et al., 2009; Dadacz et al., 2011; Hedrich und Marten, 2011). Weiterhin residieren in der Vakuolenmembran der FV-Kanal (Fast-Activating-Vacuolar-Channel), der für monovalente Kationen durchlässig ist, und der kaliumselektive VK-Kanal (Vacuolar-K⁺-Selective-Channel) (Hedrich und Neher, 1987; Ward und Schroeder, 1994; Allen und Sanders, 1996; Voelker et al., 2010). Zwei weitere Kanäle *AtALMT6* und *AtALMT9* vermitteln den Transport des Anions Malat über die Vakuolenmembran (Kovermann et al., 2007; Meyer et al., 2011).

Pumpen werden direkt über die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) zu ADP+P_i (Adenosindiphosphat+Orthophosphat) bzw. PP_i (Pyrophosphat) zu P_i+P_i energetisiert und weisen daher einen primär aktiven Transportmechanismus auf. Im Tonoplasten sind zwei Typen von Protonenpumpen lokalisiert, die H⁺-ATPase (V-ATPase) und die H⁺-Pyrophosphatase (H⁺-PP_iase). Die aus der Hydrolyse von ATP (V-ATPase) bzw. PP_i (H⁺-PP_iase) gewonnene Energie wird dabei genutzt, um Protonen aktiv in das Vakuolenlumen zu pumpen. Dadurch wird am Tonoplasten in der Regel eine Potentialdifferenz von -20 bis -30 mV sowie ein pH-Gradient von ca. 2 pH-Einheiten generiert (Martinoia et al., 2007). In der Vakuole liegt im Allgemeinen ein pH-Wert von ca. 5,5 und im Zytosol ein pH-Wert von ca. 7,5 vor (Martinoia et al., 2000; Martinoia et al., 2007; Krebs et al., 2010). Pumpen operieren mit einer Transportrate von ca. 10² s⁻¹. Nach heutigem Kenntnisstand kommen die beiden vakuolären Protonenpumpen in allen Arten von pflanzlichen Vakuolen vor, was die außerordentliche Bedeutung dieser Enzyme widerspiegelt (Hedrich und Schroeder, 1989; Neuhaus, 2007). Zusätzlich zu den beiden Protonenpumpen wurden mit der Ca²⁺-ATPase und den ABC-Transportern weitere primär energetisierte Transportproteine im Tonoplasten identifiziert, die aus der Hydrolyse von ATP ihre Energie für den Transport beziehen (Lu et al., 1998; Martinoia et al., 2002; Geisler et al., 2000).

Transporter (Carrier) werden prinzipiell in sekundär aktive Transporter und Uniporter klassifiziert. Die Translokation der Substrate geht in beiden Fällen mit einer Konformationsänderung des Membranproteins einher. Uniporter ermöglichen eine erleichterte Diffusion der Stoffe entlang des elektrochemischen Gradienten (Martinoia et al., 2007; Neuhaus, 2007). Sekundär aktive Transporter nutzen den H⁺-elektrochemischen Gradienten an der Membran (protonenmotorische Kraft) als Energiequelle, um Stoffe meist gegen ihren Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Sekundär aktive Transporter werden zudem in Symporter, die ihr Substrat entlang des H⁺-Gradienten, und Antiporter, die ihr Substrat entgegen dem H⁺-Gradienten transportieren, unterteilt. Da der Protonengradient am Tonoplasten in das Zytosol gerichtet ist, werden Stoffe somit über H⁺/Substrat-Antiporter in die Vakuole und über H⁺/Substrat-Symporter in das Zytosol transportiert. In Abhängigkeit von der Nettoladung und Stöchiometrie der

Transportvorgänge kann der Austausch elektrogen oder elektroneutral erfolgen. Die Transportrate von Transportern liegt üblicherweise bei ca. 10^2 s^{-1} - 10^4 s^{-1} .

In den letzten Jahren wurden einige sekundär aktive Transporter der Vakuolenmembran identifiziert, die die Aufnahme von Kationen und Anionen im Austausch mit Protonen in die Vakuole vermitteln. Hirschi und Mitarbeiter identifizierten 1996 zwei Gene, *AtCAX1* und *AtCAX2*, welche für elektrogene $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter kodieren. Diese vermitteln einen Ca^{2+} -Transport in die Vakuole und sind an der Aufrechterhaltung einer geringen freien zytosolischen Kalziumkonzentration beteiligt (Hirschi et al., 1996). Für die Aufnahme von Natrium wurde ebenfalls ein $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter, genannt *AtNHX1*, beschrieben. Diesem konnte eine Funktion hinsichtlich einer erhöhten Stresstoleranz gegenüber Salzstress zugeordnet werden (Martinoia et al., 2007). Weiterhin wurden für den Transport der Anionen Nitrat und Malat Antiportmechanismen aufgedeckt, sowie die korrespondierenden Gene *AtCLCa* und *AttdT* identifiziert (Emmerlich et al., 2003; De Angeli et al., 2006). Für die Aufnahme positiv geladener Schwermetallionen wie Zink, Eisen und Cadmium in die Vakuole wird ebenfalls ein Antiportmechanismus postuliert (Martinoia et al., 2007).

Die bisher identifizierten vakuolären Transportproteine zeigen, dass verschiedene Transportmechanismen für ein Substrat, z.B. Kalzium oder Malat, existieren können. Wie den vorherigen Ausführungen zu entnehmen ist, existieren für den Transport von Kalzium sowohl sekundär aktive Transporter (*AtCAX1* und *AtCAX2*) als auch eine Ca^{2+} -ATPase (Hirschi et al., 1996; Geisler et al., 2000). Malat kann die Vakuolenmembran entweder über die Kanäle *AtALMT6* und *AtALMT9* oder den Transporter *AttdT* passieren (Emmerlich et al., 2003; Kovermann et al., 2007; Meyer et al., 2011). Mehrere Transportvarianten werden ebenfalls für Zuckertransporter vermutet. So wurden sowohl erleichterte Diffusion als auch sekundär aktiver Transport für Beladung und Entladung von Vakuolen vorgeschlagen (Kaiser und Heber, 1984; Thom und Komor, 1984; Martinoia et al., 1987; Bush, 1990; Martinoia et al., 2000; Etxeberria und Gonzalez, 2001).

1.3 Zuckertransport in höheren Pflanzen

In höheren Pflanzen spielen Zucker eine fundamentale Rolle als Nährstoffe und Signalmoleküle während des gesamten Lebenszyklus (Büttner, 2007). Dabei dienen sie vielen Biosynthesewegen als Kohlenstoffquelle, bilden die Grundlage für zelluläre Strukturen, beeinflussen die Expression vieler Gene, spielen eine Rolle bei der Pathogenabwehr und regulieren sowohl die Entwicklung als auch die Seneszenz der Pflanzen (Koch, 1996; Büttner und Sauer, 2000; Büttner, 2007; Neuhaus, 2007; Slewinski, 2011). Zur erfolgreichen Bewerkstelligung dieser komplexen Aufgaben muss die gesamte Pflanze durchgehend mit den benötigten Zuckern versorgt werden. Um dies zu gewährleisten, produzieren die grünen autotrophen Gewebe der Pflanzen („Source“) Zucker als Produkte ihrer photosynthetischen Aktivität und beliefern die nicht-grünen Gewebe („Sink“) mit diesen über das Phloem (Büttner, 2007). Der Einfachzucker Glucose und der Zweifachzucker Saccharose sind die bedeutendsten gelösten Zucker in vielen Pflanzen (Poschet et al., 2011). In den meisten höheren Pflanzen wird fixierter Kohlenstoff in Form von Saccharose über das Phloem zu den heterotrophen Geweben transportiert, da es sich bei Saccharose um einen stabilen, nicht reduzierenden Zucker handelt, der nur von sehr wenigen Enzymen abgebaut werden kann (van Bel, 2003). Glucose dagegen geht als reduzierender Zucker schnell Reaktionen mit Aminen ein (Glykation), wodurch es zu Schädigung vieler Proteine kommen kann, und ist folglich nicht für den Langstreckentransport in Pflanzen geeignet (Yamauchi et al., 2002; Bechthold et al., 2009; Slewinski, 2011). Der Zuckertransport von den autotrophen Mesophyllzellen zu den heterotrophen Geweben, wie Wurzel, Samen, Knollen und Blüten, erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 1.1; Williams et al., 2000; Kühn, 2003; Sauer, 2007; Braun, 2012). Ausgehend von den Mesophyllzellen bzw. den benachbarten Bündelscheiden- oder Phloemparenchymzellen, die beide symplastisch über Plasmodesmen mit den Mesophyllzellen verknüpft sind, wird die Saccharose entweder symplastisch oder apoplastisch in die Geleitzellen und/oder Siebelemente des Phloems transportiert (Abb. 1.1; Kühn et al., 1999; Lalonde et al., 2004; Geiger, 2011; Chen et al., 2012; Braun, 2012). Am apoplastischen Transportweg sind zum einen Uniporter, die die Abgabe von Saccharose in den Apoplasten vermitteln, und zum anderen sekundär aktive Saccharosetransporter, die die Aufnahme in das Phloem bewerkstelligen,

beteiligt (Abb. 1.1; Kühn et al., 1999; Lalonde et al., 2004; Geiger, 2011; Chen et al., 2012; Braun, 2012). Der Transport im Phloem zu den Sink-Geweben erfolgt passiv über Plasmodesmen, die Siebelemente und Geleitzellen des Phloems untereinander verknüpfen (Abb. 1.1; Sauer, 2007). In den Sink-Geweben existieren ebenfalls zwei unterschiedliche Transportvarianten zur Beladung der Zielzellen (Abb. 1.1). Der symplastische Transport erfolgt über Plasmodesmen, wobei Saccharose wahrscheinlich über sogenannte Entladungsdomänen (ULD) in die Zielzellen diffundiert (Abb. 1.1; Sauer, 2007). Beim apoplastischen Transport wird Saccharose wahrscheinlich durch sekundär aktive Saccharosetransporter aus dem Phloem in den Apoplasten entlassen und anschließend entweder direkt über Saccharosetransporter von den Zielzellen akkumuliert oder durch zellwandgebundene Invertasen in Glucose und Fructose gespalten, welche dann über Monosaccharidtransporter in den Zielzellen aufgenommen werden (Carpaneto et al., 2005; Büttner, 2007; Sauer, 2007). Die beiden Transportwege sind oft abhängig von Pflanzenart, Gewebe oder Entwicklungsstadium, können aber durchaus simultan in einer Pflanzenart vorkommen (Williams et al., 2000). Zusätzlich zum Langstreckentransport von Saccharose findet sowohl in den Source- als auch in den Sink-Geweben eine Verteilung der Zucker zwischen einzelnen intrazellulären Organellen statt (Abb. 1.1; Büttner, 2007). Hier spielen vor allem Vakuolen und Plastiden eine bedeutende Rolle. So vermitteln z.B. plastidäre Monosaccharidtransporter in Source-Geweben den Export von fixiertem Kohlenstoff und abgebauter Stärke. Des Weiteren wurde in den Plastiden von Sink-Zellen ein Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator für die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat beschrieben (Cho et al., 2010; Kunz et al., 2010; Slewinski, 2011). Zudem ist bekannt, dass zur Kontrolle der Photosynthese in Blättern und des primären Metabolismus in Speichergeweben ca. 90% der Hexosen und hohe Konzentrationen an Saccharose in Vakuolen akkumuliert werden, was die große Bedeutung der temporären und langfristigen Speicherung von Mono- und Disacchariden in Vakuolen von Source- und Sink-Geweben widerspiegelt (Echeverria et al., 1997; Neuhaus, 2007; Reinders et al., 2008; Slewinski, 2011). In diesem Zusammenhang sind Vakuolen von großem agrarökonomischem Interesse, da ihre zuckerspeichernde Eigenschaft z.B. in der Zuckerrübe und im Zuckerrohr zur kommerziellen Erschließung von Zuckerressourcen dient.

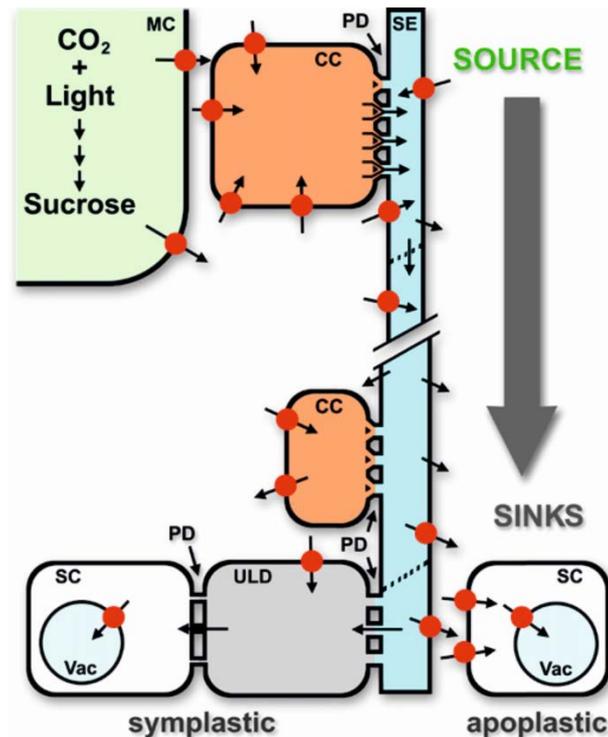


Abbildung 1.1. Symplastischer und apoplastischer Transportweg von Saccharose von Source zu Sink, sowie Speicherung von Saccharose, Glucose und Fructose in den Vakuolen von Sink-Geweben (modifiziert nach Sauer, 2007). Das Schaubild zeigt den Weg von Saccharose von einer Mesophyllzelle in den Siebelement-Geleitzellen-Komplex sowie in symplastische und apoplastische Sinkgewebe. Saccharosetransporter verschiedener Zellen und Membranen sind als rote Kreise dargestellt, wobei die Pfeile die Transportrichtung andeuten. In den Sink-Geweben wird entweder Saccharose oder nach Spaltung durch Invertasen Glucose und Fructose in den Vakuolen gespeichert. Abkürzungen: MC, Mesophyllzelle; CC, Geleitzelle; PD, Plasmodesmen; SE, Siebzelle; ULD, Entladungsdomäne; SC, Sinkzelle; Vac, Vakuole.

1.4 Die Familien der Zuckertransporter

In vaskulären Pflanzenarten existieren drei Genfamilien, die für Monosaccharid- und Dissaccharidtransporterproteine kodieren: Die kürzlich identifizierte SWEET-Transporterfamilie, die Monosaccharidtransporter-ähnliche Genfamilie (MST-ähnliche Familie) und die Saccharosetransporterfamilie (Büttner, 2007; Sauer, 2007; Chen et al., 2010; Slewinski, 2011; Chen et al., 2012).

1.4.1 Die SWEET-Transporterfamilie

SWEETs sind kleine Membranproteine, die im Allgemeinen etwa halb so groß sind wie die meisten Monosaccharidtransporter (Chen et al., 2010, Chen et al., 2012; Slewinski, 2011). SWEETs sind aus sieben transmembranen Helices aufgebaut und formen wahrscheinlich eine Pore, die als bidirektionaler Zuckeruniporter fungiert (Chen et al., 2010; Slewinski, 2011). Pflanzlichen Sweets konnten bereits physiologische Rollen zugeteilt werden. So sind diese an der apoplastischen Saccharosebeladung in Source-Geweben, der Pollenentwicklung, der Pathogenabwehr, der Seneszenz und an der Glucoseaufnahme in Wurzelspitzen von *Arabidopsis* beteiligt (Chen et al., 2010; Slewinski, 2011; Chen et al., 2012). Das Arabidopsisgenom sowie das Reisgenom beinhalten jeweils 17 SWEET-Gene, die in vier Untergruppen unterteilt werden (Abb. 1.2). Einer fünften Untergruppe (Clade V) sind Sweets von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* sowie von Invertebraten und Vertebraten zugeordnet. Das *Caenorhabditis elegans*-Genom beinhaltet sieben SWEET-Gene, das *Chlamydomonas reinhardtii*-Genom drei Gene und das menschliche sowie das Maus- Genom jeweils ein einziges Gen. Hinsichtlich der physiologischen Relevanzen der tierischen SWEETS wurde bisher ausschließlich über das menschliche Homolog *HsSWEET1* spekuliert (Chen et al., 2010). *HsSWEET1* wurde dabei als Kandidat für den postulierten alternativen vesikulären Glucose-Efflux aus den Darm- und Leberzellen vorgeschlagen (Chen et al., 2010).

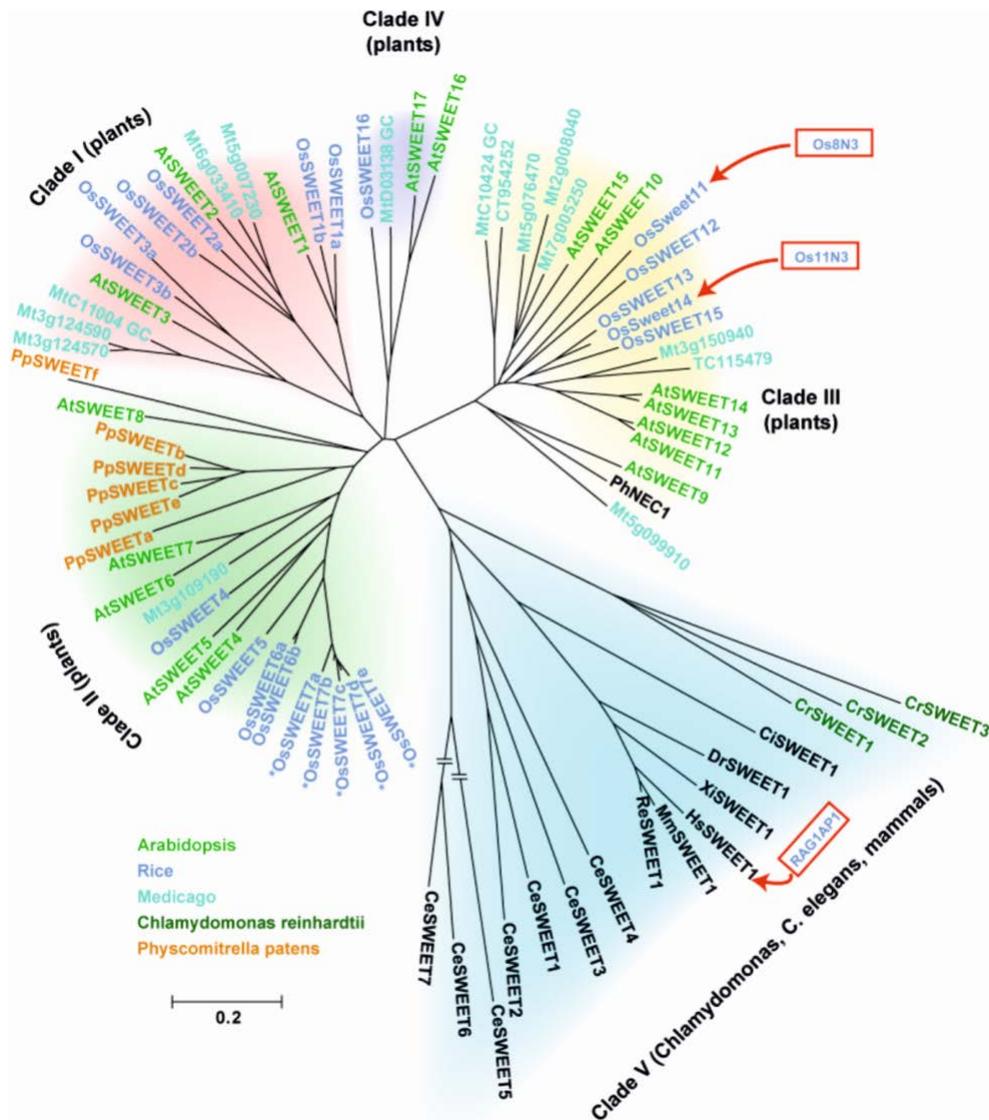


Abbildung 1.2. Phylogenetischer Stammbaum der SWEET-Genfamilie verschiedener Spezies (aus Chen et al., 2010). Die Familienmitglieder der einzelnen Spezies wurden mit unterschiedlichen Farben markiert. At, *Arabidopsis thaliana* (hellgrün); Os, *Oryza sativa* (blau); Mt, *Medicago trunculata* (türkies); Cr, *Chlamydomonas reinhardtii* (dunkelgrün); Pp, *Physcomitrella patens* (orange); Ce, *Caenorhabditis elegans* und Säugetiere (dunkelblau).

1.4.2 Die Monosaccharidtransporter-ähnliche Genfamilie

Monosaccharidtransporter der MST-ähnlichen Familie sind integrierte Membranproteine, die aus zwölf transmembranen Domänen aufgebaut sind und eine zentrale Bindungsstelle für den Transport besitzen (Büttner und Sauer, 2000). In *Arabidopsis* konnten 53 putative Monosaccharidtransporter identifiziert werden (Abb. 1.3; Büttner, 2007). Diese lassen sich phylogenetisch in sieben Untergruppen aufteilen

(Abb. 1.3). Die aus 14 Mitgliedern bestehende Unterfamilie der *AtSTPs* (Sugar Transport Protein) ist derzeit am besten untersucht. Innerhalb dieser Familie wurden acht *AtSTPs* (1, 2, 3, 4, 6, 9, 11 und 13) untersucht und dabei als plasmamembranständige Hexosen/H⁺-Symporter identifiziert, die die Aufnahme von Hexosen aus dem Apoplasten in die umgebenden Zielzellen in Sink-Geweben bewerkstelligen (Büttner, 2010). In Expressionsstudien wurden diese acht *AtSTPs* vornehmlich in Pollen und Samen lokalisiert. Weiterhin wurde kürzlich *AtSTP14* als erster Monosaccharidtransporter identifiziert, der im weiblichen Gametophyten exprimiert und spezifisch für Galactose ist (Poschet et al., 2010). Folglich scheinen die *AtSTPs* eine zentrale Aufgabe bei der Pflanzenentwicklung zu erfüllen (Büttner, 2007; Büttner, 2010). Die Untergruppe der *AtVGTs* (Vacuolar Glucose Transporter) steht den *AtSTPs* phylogenetisch am nächsten und besteht aus drei Genen. *AtVGT1* konnte in der Vakuolenmembran lokalisiert und als sekundär aktiver Glucosetransporter über transiente Expression in Hefezellen identifiziert werden (Aluri und Büttner, 2007). Eine Funktion scheint *AtVGT1* bei der Samenkeimung und Blütenentwicklung einzunehmen (Aluri und Büttner, 2007). Für *AtVGT3* wird eine Lokalisation in der Chloroplastenmembran angenommen (Aluri und Büttner, 2007). Aus der Untergruppe der plastidären Glucosetransporter *AtpGccTs* (Plastidic Glucose Transporter) wurde ein putativer Glucosetransporter *pGlcT* aus Spinat in der inneren Plastidenmembran identifiziert (Weber et al., 2000). Das korrespondierende Gen in *Arabidopsis* hat drei Isoformen. Diese scheinen ebenfalls für plastidäre Glucosetransporter zu kodieren und transportieren wahrscheinlich die nach amyolytischem Abbau entstandene Glucose in das Zytosol (Servaites et al., 2002; Büttner, 2007). Zu der *AtINT* (Inositol Transporter)-Untergruppe zählen vier Gene. Unter diesen kodiert *AtINT3* für ein unvollständiges Protein (Schneider et al., 2007). *AtINT1*, *AtINT2* und *AtINT4* konnten als funktionelle myo-Inositol/Protonen-Symporter identifiziert werden (Schneider et al., 2006, 2007, 2008). Interessanterweise ist *AtINT1* im Tonoplasten lokalisiert, während *AtINT2* und *AtINT4* in der Plasmamembran vorliegen (Schneider et al., 2006, 2007, 2008). In der Gruppe der *AtPLTs* (Polyol Transporter) ist bisher nur *AtPLT 5* intensiver untersucht worden. Es handelt sich um einen plasmamembranständigen H⁺-Symporter, der ein breites Spektrum an Substraten, darunter myo-Inositol und verschiedene Hexosen, transportiert und in Sink-Geweben zu finden ist (Klepek et al., 2005; Reinders et al.,

2005). Die *AtERD6*-ähnliche Untergruppe (early-responsive to dehydration 6) weist die meisten Gene der MST-ähnlichen Familie auf, von denen bisher zwei Kandidaten, *AtERD6* und *AtESL1*, als tonoplastidäre Uniporter für Monosaccharide beschrieben wurden (Yamada et al., 2010). Weiterhin wurde kürzlich *AtERD16* im Tonoplasten lokalisiert und als Glucosetransporter identifiziert, der den Import von Glucose in das Zytosol vermittelt. *AtERD16* ist wahrscheinlich an der zellulären Zuckerhomöostase beteiligt und kann die Zusammensetzung der Speicherprodukte in den Samen beeinflussen (Poschet et al., 2011). Interessanterweise weisen die *AtERD6*-ähnlichen Gene eine moderate Homologie zu den Genen der tierischen GLUT-Familie (Glucose Transporter) auf, deren Mitglieder als Uniporter operieren (Büttner, 2007).

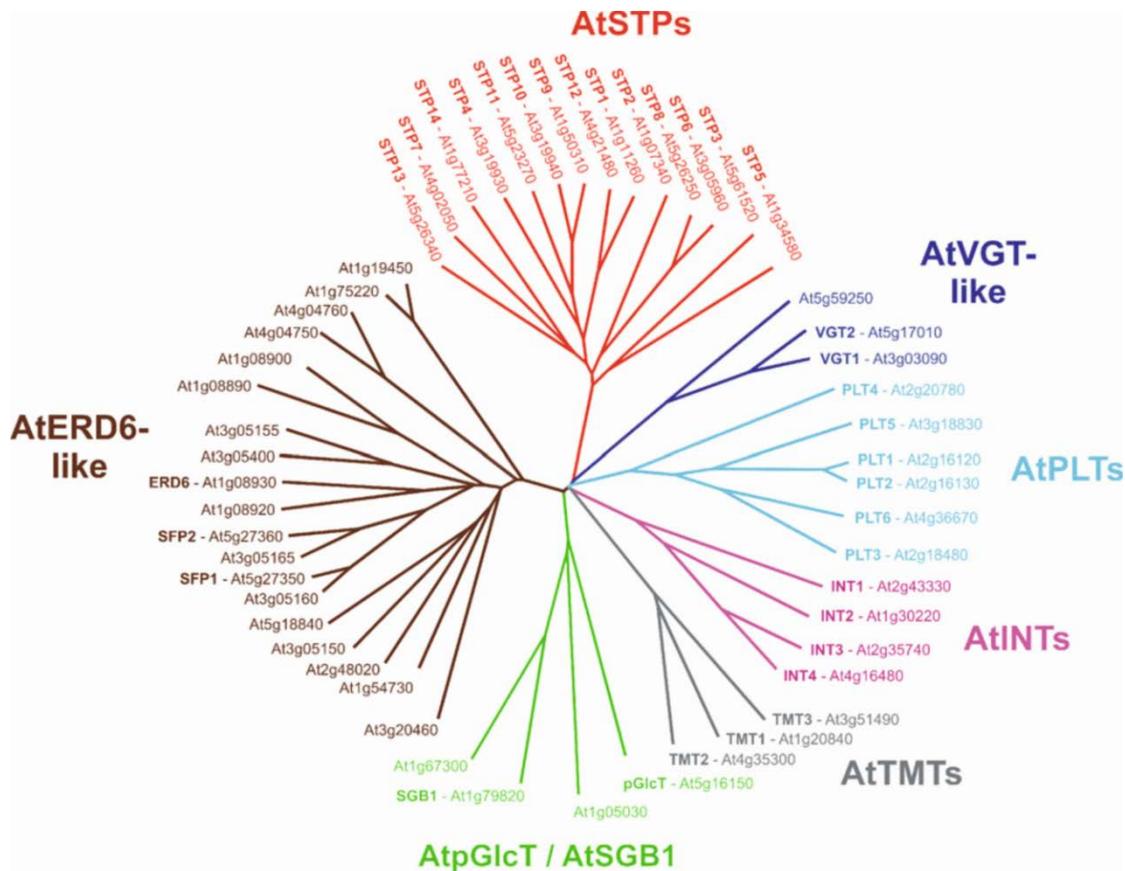


Abbildung 1.3. Phylogenetischer Stammbaum der Monosaccharidtransporter-ähnlichen Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* mit den Atg-Nummern der Gene (aus Büttner, 2007). *AtSTPs*: „sugar transport protein“; *AtVGT*-like: „vacuolar glucose transporter“, *AtTMTs*: „tonoplast monosaccharide transporter“; *AtERD6*-like: „early responsive to dehydration 6“; *AtpGlcT/AtSGB1*: „plastidic glucose transporter/ suppressor of G protein beta1“; *AtINT*: „inositol transporter“; *AtPLTs*: „polyol transporter“.

Die Untergruppe der *AtTMTs* (Tonoplast Monosacchride Transporter), bestehend aus drei Genen, hebt sich strukturell aufgrund eines außerordentlich langen hydrophilen Loops zwischen den Transmembrandomänen sechs und sieben von den anderen Gruppen der MST-ähnlichen Familie ab (Neuhaus, 2007; Wingenter et al., 2011). Für die drei *AtTMT*-Proteine konnte eine subzelluläre Lokalisation im Tonoplasten nachgewiesen werden (Wormit et al., 2006). Eine detaillierte Expressionsanalyse konnte aufzeigen, dass die Gene *TMT1* und *TMT2* durch Kälte, Trockenheit und Salzstress induziert werden (Wormit et al., 2006; Neuhaus, 2007). Zudem haben Wormit et al. (2006) herausgefunden, dass *AtTMT1* und *AtTMT2* unter Kältestress vermehrt Glucose in die Vakuole transportieren. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass *AtTMT1/2* zur molekularen Antwort von *Arabidopsis thaliana* auf osmotische Stresstimuli beiträgt (Neuhaus, 2007). Weiterhin scheint *AtTMT1* eine funktionelle Rolle bei der zellulären Kohlenstoffbalance und der Kohlenhydratverteilung in der gesamten Pflanze zu spielen (Wingenter et al., 2010; Slewinski, 2011).

1.4.3 Die Familie der Saccharosetransporter

Pflanzliche Saccharosetransporter sind integrale Membranproteine mit zwölf transmembranen Domänen und gehören zur „major facilitator superfamily“ (Kühn et al., 1999; Lalonde et al., 2004; Sivitz et al., 2007). Die Familie der Saccharosetransporter weist 62 Mitglieder auf, die in vier Untergruppen aufgeteilt sind (Abb. 1.4; Sauer, 2007). Dabei finden sich in Gruppe 1 ausschließlich Transporter einkeimblättriger Pflanzen, in Gruppe 2 zweikeimblättriger Pflanzen und in den Gruppen 3 und 4 Vertreter beider Spezies. Das *Arabidopsis*-Genom beinhaltet 9 Gene (*AtSUC1–AtSUC9*), die für potentielle Saccharosetransporter kodieren. Unter diesen wurden *AtSUC6* und *AtSUC7* als potentielle Pseudogene beschrieben, während die übrigen sieben Gene für funktionelle sekundär aktive Saccharosetransporter kodieren (Sauer und Stolz, 1994; Meyer et al., 2000; Weise et al., 2000; Sauer et al., 2004; Sauer, 2007; Sivitz et al., 2008; Srivastava et al., 2008).

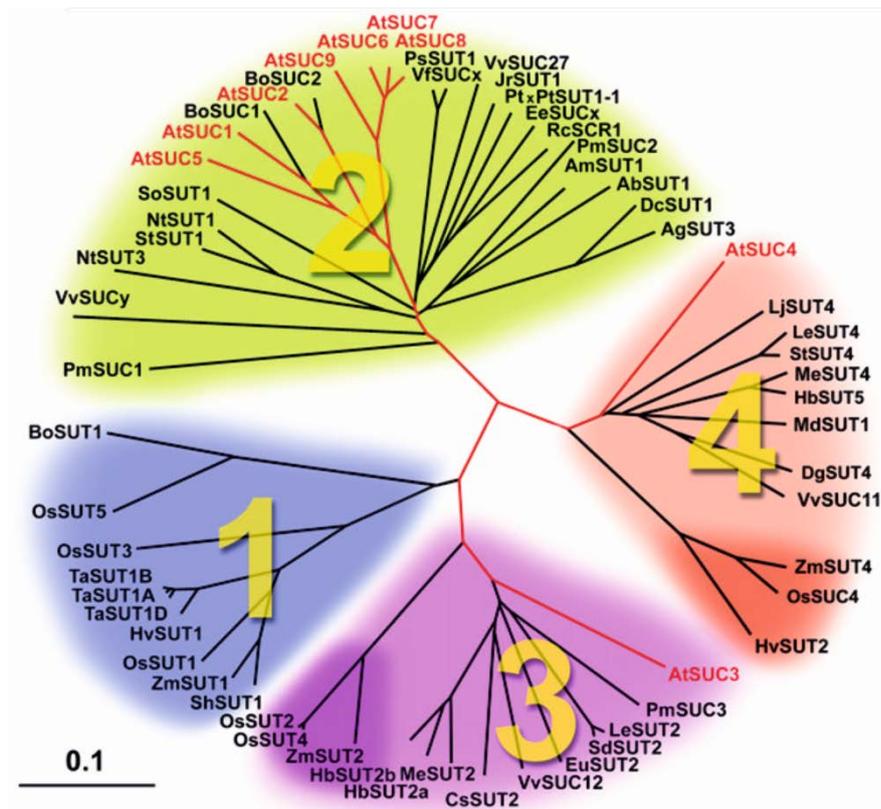


Abbildung 1.4. Phylogenetischer Stammbaum für bestätigte oder putative Saccharosetransportersequenzen (aus Sauer, 2007). Der Stammbaum zeigt 62 pflanzliche Saccharosetransportersequenzen, die in vier separierte Gruppen eingeteilt sind.

Mit Ausnahme von *AtSUC4* wurden alle Saccharosetransporter aus *Arabidopsis* als plasmamembranständige Saccharose/H⁺-Symporter beschrieben (Weise et al., 2000; Kühn, 2003; Lalonde et al., 2004; Endler et al., 2006; Sauer, 2007). In Studien von Weise und Mitarbeitern (2000) wurde *AtSUC4* zudem in der Plasmamembran von Hefezellen als Symporter identifiziert (Weise et al., 2000). Neueren Studien zeigen jedoch, dass *AtSUC4* in der Vakuolenmembran lokalisiert ist, so dass ein eindeutiger Nachweis des Transportmechanismus *in planta* noch aussteht (Endler et al., 2006). Physiologische Rollen sind bisher *AtSUC1*, *AtSUC2* und *AtSUC5* zugeordnet worden. *AtSUC1* ist am kontrollierten Aufplatzen der Staubblätter sowie an der Pollenentwicklung beteiligt und reguliert die Biosynthese von Anthocyaninen (Stadler et al., 1999; Sivit et al., 2008; Feuerstein et al., 2010; Hoth et al., 2010). *AtSUC2* vermittelt die Saccharosebeladung des Phloems (Stadler und Sauer 1996; Gottwald et al., 2000; Schneidereit et al., 2008; Srivastava et al., 2008). *AtSUC5* ist im

Endosperm lokalisiert und für die Samenentwicklung bedeutsam (Baud et al., 2005). Die physiologischen Relevanzen von *AtSUC8* und *AtSUC9*, die beide in Blüten lokalisiert sind, sind noch nicht entschlüsselt worden (Sauer et al., 2004, Sivitz et al., 2007). Weiterhin stehen die physiologischen Rollen von *AtSUC3* und *AtSUC4* zur Diskussion. Für *AtSUC3* wird eine Funktion als Saccharose-Sensor in Geleitzellen angenommen. Danach könnte *AtSUC3* nach Stimulation die Aktivitäten von *AtSUC2* und *AtSUC4* über direkte physikalische Interaktion regulieren (Schulze et al., 2003; Sauer, 2007; Schneider et al., 2011). Im Fall von *AtSUC4* ist diese Funktion aufgrund der kürzlich beschriebenen Lokalisation im Tonoplasten allerdings eher fraglich (Ender et al., 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Metabolische Verarbeitung, Speicherung und Verteilung von Zuckermolekülen innerhalb der Pflanze sind sehr gut aufeinander abgestimmt. In Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanze, dem Organ und den jeweiligen Umweltbedingungen wird dies unter anderem über eine präzise Regulation des Zuckertransports über die Vakuolenmembran erzielt. In den letzten Jahren wurden die molekularen Identitäten der ersten vakuolären Zuckertransporter aus verschiedenen Spezies geklärt. Dazu zählen der Inositoltransporter *AtINT1* (*Arabidopsis thaliana*), die Saccharose-transporter *AtSUC4*, *LjSUT4* (*Lotus Japonicus*) und *HvSUT2* (*Hordeum vulgare*) sowie die Monosaccharidtransporter *AtVGT1* und *AtTMT* (Weise et al., 2000; Endler et al., 2006; Wormit et al., 2006; Aluri und Büttner, 2007; Reinders et al., 2008; Schneider et al., 2008). Im Zuge dieser Studien wurden lediglich die Transportmechanismen von *AtINT1* und *LjSUT4* eindeutig mittels elektrophysiologischer Techniken identifiziert (Reinders et al., 2008; Schneider et al., 2008). Im Hinblick auf *AtSUC4*, *AtTMT* und *AtVGT1* konnten unter Verwendung biochemischer Methoden bislang nur Hinweise auf die Transportmechanismen erlangt werden (Weise et al., 2000; Wormit et al., 2006; Aluri und Büttner, 2007).

In der vorliegenden Dissertation sollten nun zunächst Strategien entwickelt werden, die eine direkte Erfassung der Transportaktivität vakuolärer elektrogener Zuckertransporter mittels Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten Mesophyllvakuolen aus *Arabidopsis thaliana* ermöglichen. Nach Etablierung/Optimierung der experimentellen Vorgehensweise sollten die Transportmechanismen, Transporteigenschaften, Triebkräfte und Regulationsfaktoren des vakuolären Zuckertransportes mit dem Fokus auf Glucose und Saccharose *in planta* und dessen Energetisierung untersucht und entschlüsselt werden. Um im Zuge dieser Studien auch die molekulare Natur entsprechender Glucose- und Saccharosetransporter zu identifizieren, sollten potentielle Kandidaten unter Einsatz von Mutanten und Expressionssystemen hinsichtlich ihrer Funktion näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Pflanzenanzucht

Arabidopsis thaliana Wildtyppflanzen des Ecotyps Columbia-0 sowie die verwendeten Mutanten (siehe Anhang, Kap. 7.1.1) wurden in einer Klimakammer auf Einheitserde Typ P (Patzner GmbH & Co.KG, Sinntal-Jossa Deutschland oder LATERA, Lauterbacher Kultursubstrat, Terreau Horticole, Deutschland) bei einer Belichtungsdauer von 8 h, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 80% und einer Tag-/Nachttemperatur von 21°C/16°C angezogen. Die Lichtintensität der Philips Leuchtstoffröhren betrug $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Zur Protoplastenisolation wurden 5-8 Wochen alte Pflanzen herangezogen. In einzelnen Experimenten wurden Wildtyppflanzen für drei Tage mit 200 mM Natriumchlorid (NaCl) behandelt (Kap. 3.3.5). Dafür wurden die Pflanzen drei Tage lang täglich für 30 min mit 200 mM NaCl enthaltendem Leitungswasser geflutet, d.h. die Pflanzentöpfe wurden für 30 min bis zum oberen Rand mit Flüssigkeit bedeckt. Kontrollpflanzen wurden analog mit reinem Leitungswasser behandelt.

2.1.2 Protoplasten- und Vakuolenisolation

Für Patch-Clamp-Experimente an intakten Mesophyllvakuolen aus *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst Protoplasten aus ganzen Blättern mittels enzymatischer Degradation der Zellwand isoliert. Hierfür wurden die Blätter in eine Petrischale überführt, die mit zwei Milliliter Enzymlösung gefüllt war. Der Ansatz wurde anschließend für 45 min bei Raumtemperatur und ca. 40-80 rpm inkubiert. Die Enzymlösung hatte folgende Zusammensetzung:

- 0,05% (w/v) Pektolyase (Kyowa, Osaka, Japan)
- 0,5% (w/v) Zellulase (Yakult, Tokyo, Japan)
- 0,5% (w/v) Mazerozym (Yakult, Tokyo, Japan)
- 1% (w/v) BSA (bovine serum albumine)

1 mM CaCl₂

10 mM Mes pH 5,6

$\pi=400$ mosmol kg⁻¹ (Sorbitol)

Im Anschluss wurde der Ansatz durch ein mit Waschlösung (400 mM Sorbitol, 1 mM CaCl₂) befeuchtetes Nylonnetz mit einer Maschenweite von 50 μ m unter Verwendung der Waschlösung filtriert. Durch diesen Vorgang wurde der enzymatische Abbau der Zellwände gestoppt. Darauf folgten ein Zentrifugationsschritt (60 *g*, 4°C, 7 min), Abnahme des Überstandes und Aufnahme des Protoplastenpellets in 0,5-2,0 ml frischer Waschlösung. Die Protoplastensuspension wurde auf Eis gelagert, bis ein Aliquot für die Patch-Clamp-Experimente entnommen wurde. Die Vakuolenisolation erfolgte direkt vor den Patch-Clamp-Experimenten in der Patch-Clamp-Messkammer mittels eines Lysispuffers (10 mM EGTA, 10 mM Hepes/Tris pH 7,5, $\pi=200$ mosmol kg⁻¹ mit D-Sorbitol). Aufgrund der verminderten Osmolarität des Puffers (200 mosmol kg⁻¹) im Vergleich zum Zytosol (ca. 400 mosmol kg⁻¹) kommt es zum Wassereinstrom in die Protoplasten, wodurch diese platzen und die Vakuolen freigesetzt werden. Für die anschließenden Patch-Clamp-Messungen wurde der Lysispuffer über das externe Perfusionssystem durch die entsprechenden Badlösungen (Kap. 2.3) ersetzt.

2.2 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt und ermöglichte erstmals die Auflösung von elektrischen Strömen über Membranen, die auf die Aktivität einzelner Ionenkanäle zurückgeführt werden konnten. Für diese bahnbrechenden Entdeckungen wurde ihnen 1991 der Nobelpreis für *Physiologie oder Medizin* verliehen. Die Stromfluktuationen einzelner Ionenkanäle können mittels dieser Technik in drei unterschiedlichen Messkonfigurationen detektiert werden (Abb. 2.1). In der sogenannten „cell-attached“-Konfiguration können einzelne Kanäle in einem kleinem Membranareal einer intakten Zelle untersucht werden. Dabei behält das Zellinnere seine native Zusammensetzung, wobei das Außenmedium definiert zusammengesetzt werden kann. In den beiden anderen Konfigurationen „inside-out“ und „outside-out“ werden Einzelkanalströme an isolierten Membranflecken ohne Kontakt zur Ursprungszelle untersucht, was eine gezielte Manipulation der Medien auf

beiden Seiten der Membran ermöglicht. In der „inside-out“-Konfiguration ist dabei die native Membranninnenseite, in der „outside-out“- Konfiguration die native Membranaußenseite dem Außenmedium zugewandt.

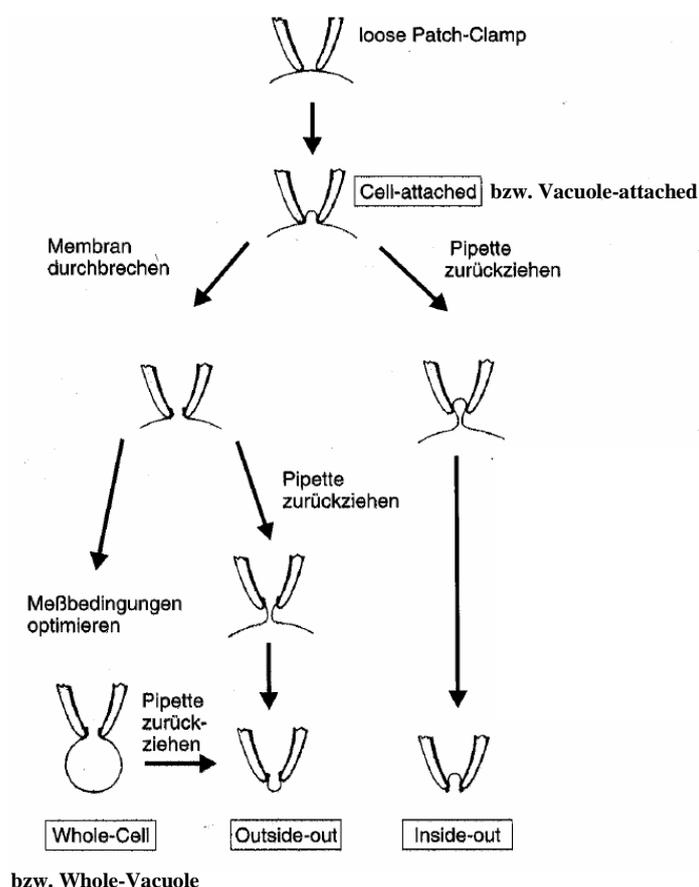


Abbildung 2.1. Skizzierung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen (modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996). Ausgehend von der „cell-attached“-Konfiguration werden „whole-cell“- und „inside-out“-Konfiguration eingestellt. Die „whole-cell“-Konfiguration bildet die Basis für die Erzeugung der „outside-out“-Konfiguration.

In einer vierten Konfiguration, dem sogenannten „whole-cell“, ist es zudem möglich, makroskopische Ströme einer ganzen Zelle zu erfassen. In dieser Konfiguration kann sowohl das Zellinnere einer intakten Zelle als auch das Außenmedium definiert eingestellt werden. Mittels dieser Konfiguration können seit einiger Zeit auch Ströme von Pumpen (Hedrich und Schroeder, 1989) und Transportern mit geringen Transportraten (De Angeli et al., 2006; Schneider et al., 2008; Schulz et al., 2011) aufgezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Ionenströme über die gesamte Vakuolenmembran aufgezeichnet. In diesem

Zusammenhang wird fortlaufend die Bezeichnung „whole-vacuole“ verwendet. Bei Verwendung dieser Konfiguration ist zu beachten, dass das Badmedium das Zytosol und das Vakuolenlumen den extrazellulären Raum widerspiegeln.

2.2.1 Patch-Clamp-Messplatz

Die Auswahl der Zielvakuolen und das Heranführen der Patchpipette an die Membran der gewählten Vakuole wurden optisch unter Verwendung eines inversen Mikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) verfolgt. Hierfür war eine Messkammer im Mikroskopisch installiert. Diese war mit einem Schlauchsystem verbunden, das über zwei Peristaltikpumpen (Pharmacia LKB-Pumpe P1, Pharmacia, Schweden) angesteuert wurde. So konnte ein kontinuierlicher Lösungsaustausch (ca. 3 ml h^{-1}) in der Messkammer gewährleistet werden, um konstante Ionenbedingungen aufrechtzuerhalten. Zur rechten Seite des Mikroskops befand sich ein mechanisch getriebener Mikromanipulator (Scientifica, Uckfield, East Sussex, UK), an dem der Vorverstärker einschließlich Patchpipette (Kap. 2.2.3) befestigt war, zur linken Seite war ein Grobmanipulator (Liugs & Neumann, Feinmechanik Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) positioniert, der zur Justierung der Applikationspipette (Kap. 2.2.5) verwendet wurde. Um die beschriebenen Komponenten von externen mechanischen und elektrischen Störungen zu schützen, wurden diese auf einem schwingungsgedämpften Tisch platziert, der wiederum von einem Faraday-Käfig umgeben war. Eine Klemmspannung wurde mit einem EPC7 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) in Verbindung mit der Software Pulse (HEKA Elektronik) generiert. Das analoge Signal wurde während der Messungen bei 30 Hz mittels eines „low-pass“ Filters (npi electronic GMBH, Tamm, Deutschland) gefiltert. Zur Konvertierung des analogen Patch-Clamp-Verstärker-Signals in ein digitales Signal war ein AD/DA-Wandler (ITC – 16, Instrutech Corp, Elmont, NY, USA) zwischen Verstärker und Computer geschaltet. Mittels der Software Pulse wurden die generierten Messdaten auf dem Computer gespeichert und in entsprechende Dateienformate zur weiteren Analyse (Kap. 2.2.7) umgewandelt.

2.2.2 Funktionsprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers

Das Prinzip der Patch-Clamp-Technik beruht auf dem Spannungsklemmenverfahren, welches in den 40er Jahren von Kenneth Cole und George Marmont entwickelt wurde. Bei diesem Verfahren wird das Membranpotential mittels zweier Elektroden und eines Rückkopplungsverstärkers auf eine bestimmte Spannung geklemmt. Patch-Clamp-Verstärker wurden als spezielle Rückkopplungsverstärker konzipiert (Abb. 2.2). Die Besonderheit liegt darin, dass das Klemmen der Membranspannung und das Einspeisen des Kompensationsstroms mit einer einzigen Elektrode bewerkstelligt werden. Der Verstärker registriert im Spannungsklemmenmodus (voltage-clamp) Abweichungen von der Kommandospannung (V_{cmd}), welche als Stromänderungen aufgezeichnet werden. Die Änderung der Spannung wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus ausgeglichen, d.h. es wird ein entgegengesetzter Strom über die Patch-Pipette injiziert, welcher in den Messungen im voltage-clamp-Modus wiedergegeben und aufgezeichnet wird. Neben Stromänderungen können mit dem Patch-Clamp-Verstärker auch Änderungen des Membranpotentials (V_m) im Stromklemmenmodus (current-clamp) gemessen werden. Hierfür erzeugt der Rückkopplungsverstärker eine Stromklemme, so dass kein Strom mehr fließen kann, wodurch Spannungsänderungen aufgelöst werden können. In Abbildung 2.2 ist eine vereinfachte schematische Darstellung des Rückkopplungsmechanismus eines Patch-Clamp-Vorverstärkers gezeigt.

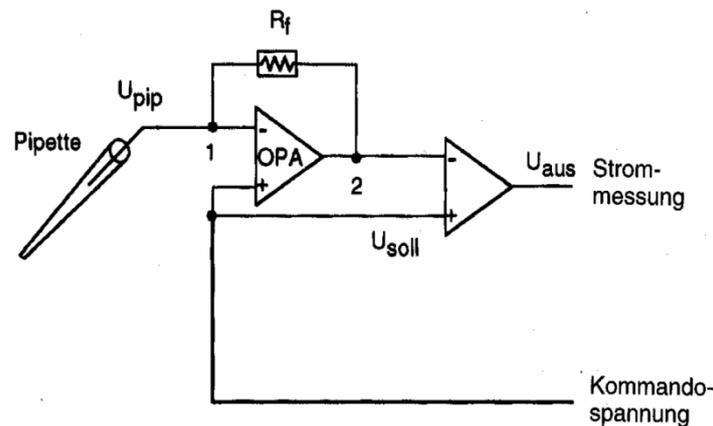


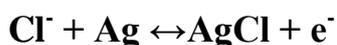
Abbildung 2.2. Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers (aus Numberger und Draguhn, 1996).

OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- bzw. Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom

Der Operationsverstärker (OPA) misst gleichzeitig das Pipettenpotential (U_{pip}), d.h. die Spannung, die an der Membran der Zelle bzw. der Vakuole anliegt, und die Kommandospannung (U_{soll}), die vom Experimentator über die Steuereinheit des Verstärkers vorgegeben wird. Weichen diese beiden Spannungen voneinander ab, entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers eine zu dieser Differenz proportionale Spannung, welche stark verstärkt ist. Der Unterschied zwischen dem Pipettenpotential und der Ausgangsspannung des Operationsverstärkers induziert einen Stromfluss durch den Rückkopplungswiderstand (R_f), an dem somit eine Spannung U_f entsteht, die proportional zum Strom ist (Ohmsches Gesetz, $U_f = R_f \cdot I$). Dieser Strom wird dann in die Pipette weitergeleitet, da er aufgrund seines hohen Eingangswiderstandes nicht zurück in den Operationsverstärker fließen kann. Der Strom fließt solange in die Pipette und ändert somit das Pipettenpotential, bis keine Differenz mehr zwischen Kommandospannung und Pipettenpotential vorliegt. Man spricht daher von einem Kompensationsstrom. Dies ist ein extrem schneller Prozess, so dass Abweichungen sofort korrigiert werden und Kommandospannung und Pipettenpotential jederzeit gleich sind. Die Ausgangsspannung (U_{aus}) wird an das entsprechende Programm befördert und dort unter Beachtung eines Kalibrierungsfaktors, der von der Größe des Rückkopplungswiderstandes abhängig ist, in den Strom, der letztendlich gemessen werden soll, umgewandelt.

2.2.3 Präparation der Patch- und der Referenzelektrode

Zu Herstellung der Patch- und Referenzelektroden wurden Silberdrähte mittels einer 0,5 M Kaliumchloridlösung und Anlegen einer Gleichspannung elektrolytisch mit einer Silberchloridschicht beschichtet.



Die Patchpipetten wurden aus Borsilikat-Hartglaskapillaren (Außendurchmesser 1,8 mm, Innendurchmesser 1,3 mm, Länge 100 mm, Klimax-51, Kimble Products, Vineland, N.Y., USA) angefertigt. Hierfür wurden die Hartglaskapillaren auf der Innenseite mit einem dünnen Silikonfilm (Sigmacote, Sigma, München, Deutschland) benetzt, welcher durch seine hydrophoben Eigenschaften die Ausbildung des Gigaseals zwischen Pipette und Membran begünstigte. Die präparierten Glaskapillaren wurden anschließend an einem vertikalen Pipettenziehgerät (Narishige PP-83, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan) in zwei Stufen mittig auseinander gezogen, wodurch zwei Glaspipetten mit definierten Spitzengrößen entstanden. Im nächsten Schritt wurden diese unter Verwendung einer Microforge (Zeiss ID03, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bis kurz vor die Spitze mit einer hydrophoben Silikonmasse (Sylgard 184 silicon elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) beschichtet sowie direkt an der Öffnung mit einem Platin-Iridium-Draht hitzepoliert. Die hydrophobe Silikonmasse diente der Verdickung der Wandstärke und somit einer Verminderung der Kapazität an der Pipettenspitze, wodurch eine potentielle Rauschquelle eliminiert wurde. Das Hitzepolieren der Pipettenspitze diente zur Optimierung der Geometrie und zur Beseitigung von scharfen Kanten, wodurch die Ausbildung des Giga-Ohm-Widerstandes begünstigt wurde. Vor den Experimenten wurden die Pipetten mit der entsprechenden Messlösung (Kap. 2.3) luftblasenfrei ausgehend von der Spitze zu 2/3 befüllt. Bei Einsatz der verwendeten Lösungen (Kap. 2.3) hatten die Pipetten einen Widerstand von 1,5–3,0 Mega-Ohm. Die Referenzelektrode befand sich in einem dünnen ($\varnothing=0,75$ mm) Polyethylenschlauch, der mit einer 3 M Kaliumchloridlösung (KCl) befüllt war. Um eine Diffusion der konzentrierten KCl-Lösung sowie zytotoxischer Silberionen in die Badlösung zu vermeiden, wurde die

Spitze des Polyethylenschlauches mit einem Agarosepfropfen (3 M KCl, 2% Agarose) verschlossen.

2.2.4 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Im Folgenden wird beschrieben, wie die „whole-vacuole“-Konfiguration experimentell unter optischer und softwareunterstützter Kontrolle erreicht wurde. Zunächst wurde eine Glasmikroelektrode mit einem Spitzendurchmesser von etwa 0,5-2 μm unter Verwendung eines Mikromanipulators vorsichtig auf die Vakuolenmembran aufgesetzt. Die notwendige Ausbildung eines hohen Abdichtwiderstandes zwischen Membran und Glasmikroelektrode im Giga-Ohm-Bereich konnte am Computer anhand des Programmes Pulse (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurde die Stromantwort auf einen kontinuierlich applizierten Testpuls aufgezeichnet, bei dem vom Haltepotential (0 mV) auf zunächst +10 mV und anschließend auf -10 mV für jeweils 20 ms instantan gesprungen wurde. Bei Anlegung eines kontrollierten Unterdruckes an der Pipette wurde der daraufhin zunehmende Widerstand zwischen Membran und Pipette anhand der abnehmenden Stromantwort gemäß dem Ohmschen Gesetz angezeigt. Sobald ein Abdichtwiderstand im Giga-Ohm-Bereich zwischen Membran und Glasmikroelektrode erreicht wurde, war der Membranfleck unter der Pipettenöffnung von der restlichen Vakuolenmembran elektrisch isoliert. Die Vakuole befand sich nun im „vacuole-attached“-Modus. Um nun von der „vacuole-attached“-Konfiguration in die „whole-vacuole“-Konfiguration zu gelangen, wurden zeitgleich ein kurzer Unterdruck und ein Strompuls von ± 600 mV für 100 μs angelegt. Dadurch wurde der Membranfleck unterhalb der Pipette ohne Verlust des Abdichtwiderstands zerstört. Da die biologische Membran die Eigenschaften eines Plattenkondensators besitzt, entstehen durch Anlegen einer Spannung (± 10 mV) Umladungsprozesse von Ladungen an der Membran, die als langsam relaxierende kapazitive Ströme wahrgenommen und bezeichnet werden. Der Übergang von der „vacuole-attached“- in die „whole-vacuole“-Konfiguration konnte folglich anhand der langsamen kapazitiven Ströme verifiziert werden, da diese im „whole-vacuole“-Modus aufgrund der größeren zugänglichen Membranfläche anstiegen. Durch Herauslösen des Membranfleckes unter der Pipettenspitze wurde ferner ein

Durchgang zwischen dem Vakuolenlumen und der Pipette erzeugt. Über diese Öffnung kommt es zu einer passiven Diffusion zwischen Vakuolenlumen und Pipettenmedium (Abb. 2.3c-e). Da das Volumen der Pipette um ein Vielfaches größer als das der Vakuole ist, wird dabei das komplette Vakuolenlumen durch das definierte Pipettenmedium ausgetauscht (Abb. 2.3e). Aufgrund dieser Äquilibrierung konnte das Vakuolenlumen in seiner Zusammensetzung über das Pipettenmedium entsprechend der experimentellen Fragestellung genau vorgegeben werden. Der Diffusionsprozess bzw. die Äquilibrierung bei Etablierung der „whole-vacuole“-Konfiguration sind in Abbildung 2.3 unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow verdeutlicht. Die Patchpipette wurde mit 100 μM Lucifer Yellow vorbeladen. Nach Einstellung der „whole-vacuole“-Konfiguration ($t = 3,55 \text{ min}$) konnten unmittelbar erste Fluoreszenzsignale im Vakuolenlumen gemessen werden. 13 min nach dem Membrandurchbruch war die vollständige Äquilibrierung abgeschlossen, was durch die Sättigung der emittierten Fluoreszenz bei $t \sim 17 \text{ min}$ verifiziert wurde (Abb. 2.3e & f).

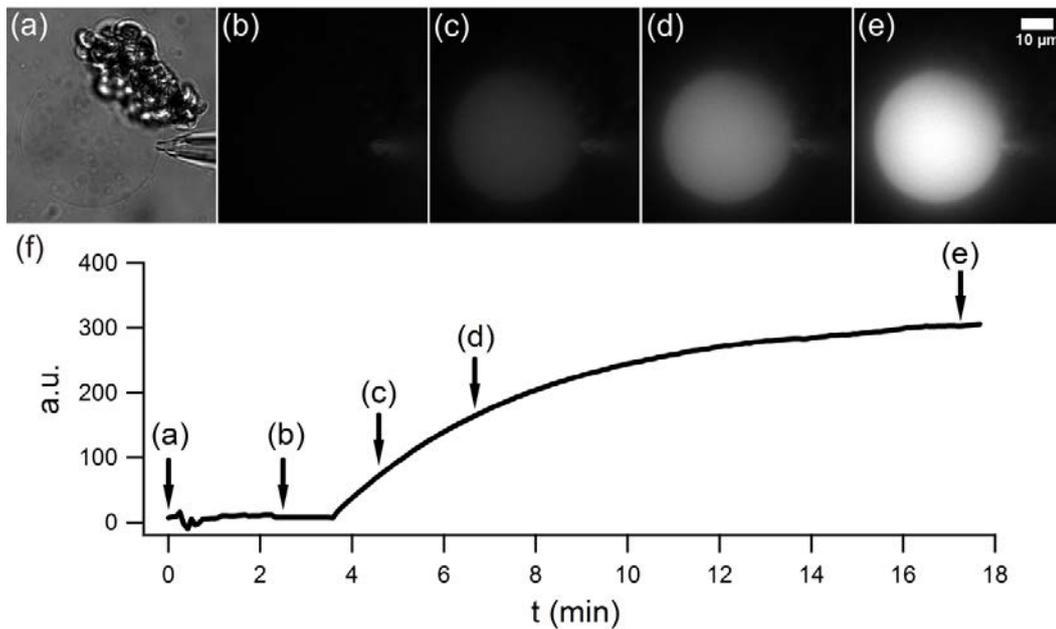


Abbildung 2.3. Äquilibrierung des Vakuolenlumens mit der Pipettenlösung nach Einstellung der „whole-vacuole“-Konfiguration.

Durchlicht (a) und Fluoreszenzaufnahmen (b-e) einer Vakuole ($C_m = 44$ pF) in der „vacuolar-attached“ (a, b)- und „whole-vacuole“-Konfiguration (c-e). Die Zeitpunkte der Aufnahmen waren $t = 0$ min (a), $t = 2,30$ min (b), $t = 4,35$ min (c), $t = 6,40$ min (d) und $t = 17,15$ min (e). Die Pipettenlösung enthielt den Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow ($100 \mu\text{M}$). Die ersten Fluoreszenzsignale konnten direkt nach Einstellung der „whole-vacuole“ Konfiguration bei $t = 3,55$ min detektiert werden. (f) Sättigungskurve der emittierten Fluoreszenz im vakuolären Lumen. Die emittierte Fluoreszenz von Lucifer Yellow erreichte ihre Sättigung ca. 13 min nach Übergang in die „whole-vacuole“-Konfiguration, was auf eine vollständige Äquilibrierung zwischen dem vakuolären Lumen und der Pipettenlösung schließen lässt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit Hilfe der Software MetaFluor (Universal Imaging) durchgeführt und analysiert. Lucifer Yellow wurde unter Verwendung des VisiChrome Polychromator-Systems (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 430 nm angeregt. Das von einem Plan-Neofluar Objektiv (40*/0.75 W, Carl Zeiss) aufgefangene Fluoreszenzsignal wurde mittels einer Kamera (CoolSNAP HQ; Roper Scientific, Ottobrunn, Deutschland) aufgezeichnet, die an einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss) montiert war. Die Emission der Fluoreszenz wurde durch einen dichroitischen Spiegel von 500 nm sowie einem Bandpass-Filter von 510-560 nm gefiltert (HQ 535/25 M; Analysentechnik, Tübingen, Deutschland). Mit der Software MetaFluor wurde alle 5 Sekunden ein Bild aufgezeichnet. Alle Bilder wurden hinsichtlich der

Hintergrundfluoreszenz, die von Referenzregionen nahe der Vakuole aufgenommen wurde, mittels der Software ImageJ (National institutes of Health) korrigiert.

2.2.5 Substrat-Applikationssystem

Zur Untersuchung von Zucker- und ATP-induzierten Strömen wurde in dieser Arbeit ein spezielles Applikationsverfahren zur schnellen und direkten Perfusion der entsprechenden Substrate angewendet. Hierfür wurden Applikationspipetten mit dem Pipettenziehgerät von Narishige (PP-83, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan) hergestellt. Diese hatten im Vergleich zu den Patch-Pipetten deutlich größere Öffnungen von ca. 10-15 μM an der Spitze, wodurch ein Lösungsausstrom durch manuelle Applikation eines Überdruckes ermöglicht wurde. Die für die Patch-Pipetten beschriebenen Beschichtungsprozeduren (Kap. 2.2.3) wurden hier nicht durchgeführt. Die experimentelle Vorgehensweise ist in Abbildung 2.4 unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow dargestellt. Auf der linken Seite der rot umrandeten Vakuole ist eine mit Lucifer Yellow (1 mM)-befüllte Glas-Applikationspipette im Durch- (a) bzw. Fluoreszenzlicht (b) vor der Applikation des Farbstoffes zu sehen. Wie unter (a) und (b) zu erkennen ist, strömten schon vor Druckapplikation geringe Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes aus der Pipette. Um einen vorzeitigen Kontakt mit den zu untersuchenden Vakuolen zu vermeiden, wurde die Applikationspipetten daher erst kurz vor der aktiven Applikation der Substrate nahe der Vakuole platziert. Sobald ein Überdruck auf die Applikationspipette manuell angelegt wurde, verteilte sich der Fluoreszenzfarbstoff gleichmäßig um die Vakuole herum (Abb. 2.4c). Dieses Applikationssystem ermöglichte somit einen schnellen lokalen Lösungsaustausch, so dass eine unmittelbare Stimulation der untersuchten Transportsysteme garantiert war. Fluoreszenzmessungen und nachträgliche Korrekturen der Bilder wurden wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

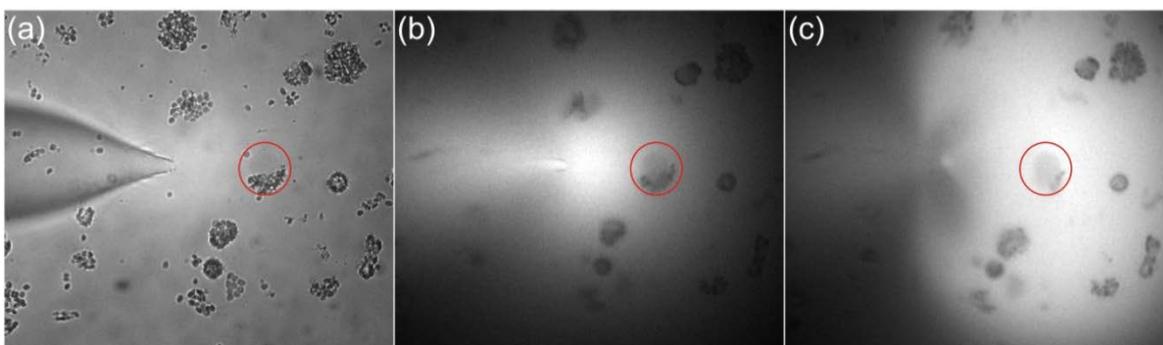


Abbildung 2.4. Gleichmäßige und schnelle Perfusion einer Vakuole mittels einer mit Lucifer Yellow beladenen Applikationspipette.

Die Bilder wurden vor (a, b) und während (c) der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow (1 mM) aufgenommen. Der Druck wurde manuell auf die Glaspipette, welche links neben der Vakuole lokalisiert ist, ausgeübt.

2.2.6 Vorzeichenkonvention

Die an einer biologischen Membran anliegende Spannung spiegelt per Konvention das elektrische Potential auf der zytosolischen Seite der Membran relativ zur extrazellulären Seite wieder. Dabei wird das extrazelluläre elektrische Potential auf den Wert Null gesetzt. In Analogie wird das Membranpotential bei Endomembranen seit 1992 ebenfalls für die zytosolische Membranseite angegeben (Bertl et al., 1992). In Bezug auf Vakuolen wird demzufolge das vakuoläre Lumen als extrazellulärer Raum definiert. Folglich wird bei Patch-Clamp-Untersuchungen an Vakuolen das Membranpotential weiterhin für das Zytosol relativ zum vakuolären Lumen angegeben. Im „whole-vacuole“-Modus konnte dieser Konvention mittels der Software Pulse über die Einstellung „inside out“ automatisch Rechnung getragen werden, so dass das Badmedium (Zytosol) als Bezugsort für das Membranpotential weiterhin definiert wurde und somit keine offline-Korrekturen/Konvertierungen der Membranpotentiale und der aufgezeichneten Ionenströme mehr nötig waren. Mit der Membranpotential-Konvention ist gleichzeitig auch die Richtung von Strömen geladener Teilchen relativ zum Zytosol definiert. So entspricht ein positiver Strom einem Ausstrom von Kationen aus dem Zytosol in die Vakuole bzw. einem Einstrom von Anionen aus dem Vakuolenlumen in das Zytosol. Bei einem negativen Strom kehren sich die Ionenflussrichtungen um.

2.2.7 Auswertung der Rohdaten

Die Patch-Clamp-Rohdaten wurden mit der Software Igor Pro 6 (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, USA) und Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) analysiert. Um Vergleiche zwischen den Messungen an einzelnen Vakuolen ziehen zu können, wurde für jede Vakuole die Stromantwort auf die Membrankapazität C_m normiert, da diese proportional zur Fläche der Vakuole ist. Mit Hilfe der spezifischen Membrankapazität von Biomembranen von $1 \mu\text{F cm}^{-2}$ kann die Oberfläche der Vakuolen genau bestimmt werden. C_m konnte nach Abgleich der kapazitiven Ströme am Patch-Clamp-Verstärker EPC7 direkt ermittelt werden.

2.3 Lösungen für Patch-Clamp-Messungen

Die pH-Werte aller Lösungen wurden mit einem digitalen pH-Meter (Digital-pH-Meter 646, Knick) eingestellt. Die Osmolalität der Lösungen wurde mit Hilfe eines Osmometers (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Vapro) bestimmt.

2.3.1 Lösungen zur Untersuchung von Zuckertransportern

Im Folgenden sind die Lösungen aufgelistet, die für die Messungen mit Wildtyppflanzen, Mutanten sowie den transient transformierten Pflanzen eingesetzt wurden. pH-Werte der Lösungen sowie Art und Konzentration der Zucker sind in den Abbildungslegenden im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt. Die Lösungen in den Applikationspipetten waren identisch zu den jeweiligen Badlösungen und enthielten zusätzlich die entsprechenden Zuckerkonzentrationen.

Mutant und Wildtyp

200 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 10 mM Mes/Tris pH 5,5 bzw.
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5
 $\pi=380 \text{ mosmol kg}^{-1}$

Transient transformierte Pflanzen

155 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 10 mM Mes/Tris pH 5,5 bzw.
 10 mM Hepes/Tris pH 7,5
 $\pi=310 \text{ mosmol kg}^{-1}$

Bei Messungen mit pH 7,5 in der Vakuole (Pipette) und pH 5,5 im Zytosol (Bad) wurde die „whole-vacuole“-Konfiguration zunächst unter symmetrischen pH-Bedingungen von pH 7,5 eingestellt, da ein inverser pH Gradient (pH_{vac} 7,5, pH_{zyt} 5,5) für die Vakuolen unverträglich war und somit die Generierung der „vacuole-attached“-Konfiguration extrem erschwerte. Vor Beginn der Stromaufzeichnungen wurde der pH der Badlösung über externe Perfusion (8 min) auf pH 5,5 geändert.

2.3.2 Lösungen zur Untersuchung der V-ATPase

Pipetten und Badlösung waren während der Messungen zur V-ATPase identisch zusammengesetzt. Die Lösungen in den Applikationspipetten waren identisch zu den jeweiligen Badlösungen mit Ausnahme von MgATP. Die eingesetzten MgATP-Konzentrationen sowie pH-Werte sind in den Abbildungslegenden aufgeführt. MgATP wurde als 0,5 M Stammlösung in 0,5 M Tris angesetzt und anschließend in der Badlösung auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

100 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 10 mM Mes/Tris, pH 5,5 bzw.
 10 mM Hepes/Tris, pH 7,5
 $\pi=400 \text{ mosmol kg}^{-1}$ mit D-sorbitol

Die „whole-vacuole“-Konfiguration wurde mit pH 7.5 in der Badlösung und pH 5,5 in der Pipettenlösung eingestellt. Vor Beginn der Stromaufzeichnungen wurde der pH der Badlösung analog zu den Ausführungen in 2.3.1 über Perfusion (8 min) auf pH 5,5 geändert.

2.4 Protoplastentransformation

2.4.1 Bakterienanzucht

Zu Vermehrung der Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden/Vektoren (siehe Anhang, Kap. 7.1.2) wurden Kulturen (100 ml) in sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt. Dem Wachstumsmedium (Lucia Broth: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 1 l vollentsalztes H₂O) wurden 50 µg/ml Ampicillin beigelegt, um eine Kontamination mit unerwünschten Bakterienstämmen zu verhindern. Die Ansätze wurden bei 37°C für ca. 16 Stunden auf einem Schüttler (37°C: New Brunswick Scientific G25 Incubator/Shaker, 28°C: New Brunswick Scientific innova 4230 Incubator/Shaker) inkubiert.

2.4.2 Isolation und Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Isolation aus *Escherichia coli* Bakterien wurde standardmäßig nach Anleitung des QIAGEN Plasmid Plus Midi Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland.) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren erfolgte mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop products, Wilmington, USA) über Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration der DNA wurde aus der OD bei 260 nm berechnet. Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und der OD_{280 nm} konnte der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden.

2.4.3 Transformationsprotokoll

Die Protoplastentransformation wurde mit *Attmt1/tmt2*- und *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten (siehe Anhang, Kap. 7.1.1) nach dem Protokoll von Yoo et al. (2007) durchgeführt. Für die Protoplastentransformation

wurden 20-30 Blätter mit einer frischen Rasierklinge in dünne Streifen geschnitten. Diese wurden dann in 20 ml gefilterte Enzymlösung (0,45 µm Einmal-Filterhalter, Minisart steril, A. Hartenstein, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung transferiert:

1,5% (w/v) Zellulase

0,4% (w/v) Mazerozym

0,4 M Mannitol

20 mM KCl

20 mM MES, pH 5,7, 10 min bei 60°C

10 mM CaCl₂

0,1% BSA (w/v)

Vor der Zugabe von CaCl₂ und BSA wurde der Ansatz für 10 min bei 55°C erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur gekühlt. Die Präparation wurde dann mit Aluminiumfolie abgedunkelt, für 10 min im Exsikkator vakuumfiltriert und darauffolgend für 3 Stunden bei Raumtemperatur zum Zellwandabbau und Freisetzung von Protoplasten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 20 ml W5-Puffer (Zusammensetzung siehe unten), der eine Zentrifugation für 2 min bei 16°C und 100 g umfasste. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1-2 ml W5-Puffer resuspendiert und der Ansatz für 30 min auf Eis gelagert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet in 1-2 ml MMG-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) resuspendiert. Für die Transformation wurden dann 200 µl Protoplastensuspension mit 200 µl PEG (Polyethylenglykol)-Lösung und 15-20 µg/µl DNA der entsprechenden Vektoren (siehe Anhang, Kap. 7.1.2) sorgfältig vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 880 µl W5-Puffer gestoppt und für 1 min bei 16°C und 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 2 ml W5-Puffer resuspendiert. Am zweiten Tag nach der Transformation wurden die Patch-Clamp-Experimente mit den transfizierten Protoplasten durchgeführt.

Enzym- und PEG-Lösung wurden vor jeder Transformation frisch hergestellt. Die PEG-Lösung wurde mindestens eine Stunde vor der Transfektion der Protoplasten angesetzt, so dass das PEG völlig gelöst wurde. Um Vakuolen aus transformierten

Protoplasten für die Patch-Clamp-Experimente zu lysieren, wurden diese direkt vor den elektrophysiologischen Messungen mittels eines mit destilliertem Wasser verdünnten W5-Puffers (200-300 mosmol kg⁻¹) aus den Protoplasten herausgelöst.

Lösungen:

W5-Puffer:

154 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
2 mM MES (pH 5,7)

MMG-Puffer:

0,4 M Mannitol
15 mM MgCl₂
4 mM MES (pH 5,7)

PEG-Lösung:

20-40% PEG 4000 (w/v)
0,2 M Mannitol
100 mM CaCl₂

2.5 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

2.5.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC)

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) ist eine nichtinvasive Technik, mit deren Hilfe eine physikalische Interaktion zwischen zwei Proteinen sowie deren Lokalisation *in vivo* nachgewiesen werden kann. BIFC basiert auf der Rekonstitution zweier YFP-Hälften - dem N-terminalen und dem C-terminalen YFP-Fragment -, die mit zwei unterschiedlichen Proteinen kovalent verknüpft wurden. Diese Komplementation der beiden YFP-Hälften findet nur statt, wenn die beiden Proteine *in vivo* interagieren. Dadurch entsteht ein fluoreszierendes Fluorophor, das die gleiche Adsorption (514 nm) und Emission (530 nm) wie ein intaktes YFP aufweist (Abb. 2.5).

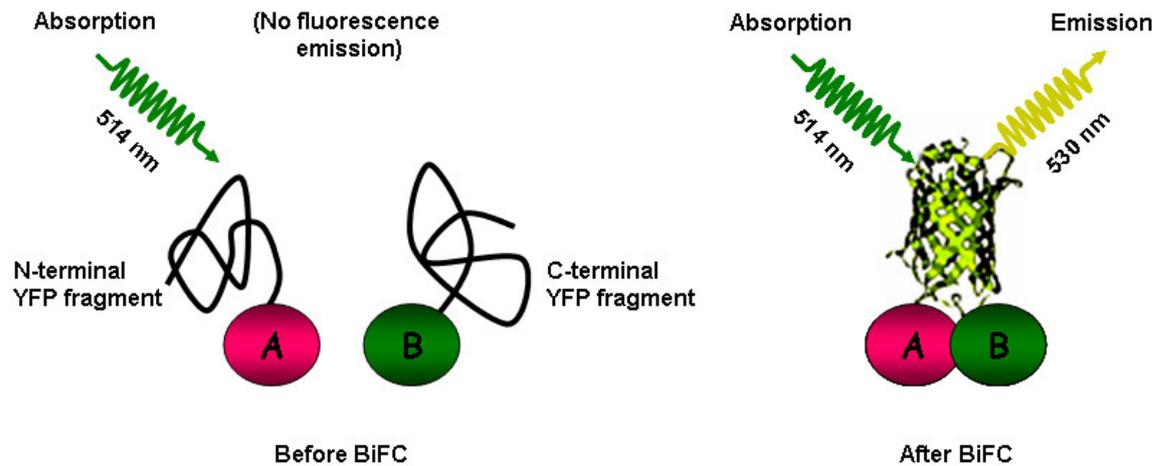


Abbildung 2.5. Funktionsprinzip der BiFC-YFP Methode (aus Bhat et al. 2006). Erläuterungen siehe Text.

Zur Dokumentation der BiFC-Fluoreszenz in Protoplasten und freigesetzten Vakuolen wurden Bilder mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS SP5; www.leica-microsystems.com, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Für Übersichtsbilder wurden ein HCX PL FLUOTAR 10*/0.30 Objektiv, für die Aufnahme einzelner Protoplasten bzw. Vakuolen ein HCX IRAPO L 25*/0.95 W Objektiv verwendet. Die Bilder wurden mittels der Software ImageJ hinsichtlich Helligkeit und Kontrast einheitlich überarbeitet.

2.5.2 Lokalisationsstudien

Zur Bestätigung der Lokalisation von *AtSUC4* in der Vakuolenmembran wurden Bilder von GFP-markierten Vakuolen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal; Carl Zeiss) aufgenommen. Dafür wurden die Vakuolen aus Protoplasten, welche *AtSUC4*-GFP transient exprimierten, mittels eines Lysispuffer (150 KCl, 1 CaCl₂, 10 mM HEPES/Tris, pH 7,5) unmittelbar vor den Aufnahmen freigesetzt. Das Mikroskop war mit einem Zeiss Plan Neofluar 20*/0,5 Objektiv ausgestattet. Die Anregungswellenlänge war ~490 nm, die Emission der Fluoreszenz wurde im Bereich von ~505-530 nm gefiltert. Die Bilder wurden mittels der Software ImageJ hinsichtlich Helligkeit und Kontrast einheitlich überarbeitet.

2.6 Genexpressionsanalysen

Zur Bestimmung der Genexpression von *TMT1/TMT2* und *VHA-a2* unter Salzstressbedingungen wurde zunächst mRNA aus den entsprechend vorbehandelten *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen (Kap. 2.1) isoliert. Anschließend wurde die mRNA mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptanzahl der jeweiligen cDNAs wurde mittels Quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die absolute Quantifizierung in Molekülen wurde relativ zu den Transkripten des Referenzgens Aktin bestimmt.

2.6.1 mRNA-Isolierung

Bei dieser Methode wurde die Eigenschaft von Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) genutzt, aufgereinigte mRNA zu binden. Zur Isolierung von mRNA aus mit NaCl behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen wurden zunächst, wie unter 2.1.2 beschrieben, Protoplasten aus 5-8 Wochen alten Pflanzen isoliert und einmal mit Waschlösung (400 mM Sorbitol, 1 mM CaCl₂) gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 150 µl Waschlösung aufgenommen und anschließend in 150 µl Lysis/Bindungs-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) homogenisiert. Daraufhin wurde die Probe mit Stickstoff bei -80°C schockgefroren, um die Zellwände aufzubrechen. Nach dem Auftauen wurden der Probe 30 µl Dynabeads zugefügt, der Ansatz vermischt und für 30 min im Überkopfschüttler (RM Multi-1, STARLAB, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten vier Waschschriffe, je zwei mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 (Zusammensetzung siehe unten). Dabei wurden die Dynabeads jeweils mittels Magneten am Boden von Eppendorf-Cups fixiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet (Dynabeads) in frischem Waschpuffer (1 oder 2) resuspendiert. Das finale Pellet wurde in 50 µl Elutionspuffer (Zusammensetzung siehe unten) aufgenommen und für 2 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Bindungspuffer hinzugegeben und die Probe für 15 min im Überkopfschüttler inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 150 µl Waschpuffer 2. Das finale Pellet wurde in 15 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 2 min bei +70°C inkubiert. Für

die darauffolgende Konvertierung in cDNA wurden 14 μ l vom Überstand abgenommen und in ein PCR-Cup überführt.

Lösungen:**Waschpuffer 1**

0,1% (w/v) LiDS

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM LiCl

1 mM EDTA

Waschpuffer 2

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM LiCl

1 mM EDTA

Bindungspuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 M LiCl

2 mM EDTA

Elutionspuffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Lysis/Bindungs-Puffer

200 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 M LiCl

20 mM EDTA

2% (w/v) LiDS

(Lithiumdodecylsulfat)

10 mM DTT (Dithiotreitol)

2.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zum Umschreiben der aufgereinigten mRNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion angewandt. Hierfür wurden die 14 μ l an isolierter mRNA aus Kap. 2.6.1 mit dem Mastermix (Zusammensetzung siehe unten) vermischt, für 2 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis heruntergekühlt. Anschließend wurden 0,8 μ l MMLV RT (Reverse Transkriptase) zugegeben und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Die erhaltene cDNA konnte dann für weitere Experimente bei -80°C gelagert werden. Die Bestimmung der

Transkriptanzahl der untersuchten Gene wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion relativ zur Transkriptmenge von Aktin bestimmt (Kap. 2.6.3).

Mastermix:

0,8 µl oligo dT Primer (100 µM)

1 µl dNTP (10 mM)

0,5 µl RNase Inhibitor

4 µl 5* RT-Puffer

2.6.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR basiert auf der herkömmlichen PCR-Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, erlaubt aber überdies eine direkt ermittelbare Quantifizierung der gewonnenen Amplifikate. Mittels Zugabe spezieller Fluoreszenzfarbstoffe (hier: SYBR-Green I, Fisher-Scientific), welche mit statistischer Wahrscheinlichkeit in dsDNA interkalieren, kann der Reaktionsverlauf jedes PCR-Zyklus' visuell in „Echtzeit“ („real time“) erfasst werden. Da die Fluoreszenzzunahme direkt proportional zur Menge der entstehenden Anzahl von Amplifikaten ist, ermöglicht sich so eine Quantifizierung des Zielgens (gene of interest, GOI) in der exponentiellen Phase (log phase) der PCR. Zur Quantifizierung existieren unterschiedliche Rechenmodelle. Die Methode der Wahl war die relative Quantifizierung anhand eines zweiten endogenen, ubiquitär und homogen exprimierten Referenzgens. Der Vorteil dieser Rechen-Methode liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsraten beider Gene, da Fehler in der cDNA Herstellung sich gleichermaßen auf die Effizienz der Amplifikation des Referenzgen und des GOI auswirken. Im Ersten Schritt wird der sogenannte „Crossing-Point“ (C_p) oder auch „Threshold Cycle“ (C_t) bestimmt, der als das Erreichen einer signifikanten Fluoreszenzmenge (Schwellenwert) jenseits der Hintergrundfluoreszenz (z.B. durch Template dsDNA) definiert ist.

Da der C_p/C_t -Wert abhängig von der Ausgangsmenge der Template-DNA (hier: cDNA) ist, werden für das Referenzgen und das GOI Verdünnungsreihen erstellt. Durch die Auftragung der ermittelten C_p/C_t -Werte der Standardreihen gegenüber der jeweiligen Konzentration ergibt sich eine lineare, antiproportionale Beziehung, die zur Bestimmung der Konzentration der unbekannt Probe durch Interpolation herangezogen wird. Die mathematische Grundlage ergibt sich aus den Formeln $Y = X(1+E)^n$ und $\log Y = \log X + n \log (1+E)$, wobei Y die hergestellte Amplifikatmenge, X die Startkopienzahl, E die PCR-Effizienz und n die Anzahl der PCR Zyklen darstellt. Die Bestimmung der jeweiligen C_p/C_t -Werte wird mittels der Formel $C_p, C_t = - (1/\log E) * \log X + (\log K/\log E)$ zu einer Geraden aufgetragen.

Nach Interpolation der Anzahl der Amplifikate des Referenzgens und des Zielgens der unbekannt Probe erfolgte die Normierung der Transkripte auf 10.000 Moleküle des Referenzgens. Zusätzlich fand eine Schmelzkurvenanalyse statt um unspezifische Amplifikate ausschließen zu können. Als Referenzgen wurde eine Kombination der zwei *Arabidopsis thaliana* Aktine 2 und 8 (Act2/8) ausgewählt und Standardreihen des Referenzgens und des Zielgens in den Konzentrationen 10 fg/ μ L, 1 fg/ μ L, 0,1 fg/ μ L und 0,01 fg/ μ L hergestellt. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese fanden wie unter den Kapiteln 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben statt. Für die qPCR wurden die cDNA Proben 1:20 mittels tRNA (1 μ g/ μ L) enthaltendem HPLC-Grade Wasser verdünnt. Primermixe und Reaktionsansätze setzten sich wie unten beschrieben zusammen und wurden mit dem qPCR-Programm (Thermocyclerprogramm, siehe unten) im Real-Time-Thermocycler Realplex-x⁴ (Eppendorf) in 96-Loch-Platten (Twin-tec, Eppendorf) amplifiziert und quantifiziert.

Primer:

AtAct2 (AT3g18780)/8 (AT1g49240)

Fwd: GGT GAT GGT GTG TCT

Rev: ACT GAG CAC AAT GTT

Fragmentlänge: 435 bp

AtVHA-a2 (AT2g21410)

Fwd: TGT TCC GAT GTA TCA GA

Rev: CAA ATG GGA ATT TTA CCT

Fragmentlänge: 247 bp

AtTMT1 (AT1g20840)

Fwd: AAA AGG ACA TAG AGA GCC

Rev: CCT CTT GTA TTC ATC GTT

Fragmentlänge: 278 bp

AtTMT2 (AT4g35300)

Fwd: CAA GAC ATG AAG ATT GGG

Rev: TCT TCT CTT TCC GTC CAT

Fragmentlänge: 271 bp

Primermix (PM):

- Primer (fwd) [10 μ M] 12 μ L
- Primer (rev) [10 μ M] 12 μ L
- H₂O (HPLC-Grade) 376 μ L

PCR-Ansatz (20 μ L):

- 10 μ L SYBR Green Enzym-Mix (Fisher-Scientific)
- 8 μ L PM
- 2 μ L Template-cDNA (1:20 Verdünnung)

Thermocyclerprogramm:

Initiale Denaturierung	95°C	15min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 40 Zyklen
Annealing	58-65°C	20 s	
Elongation	72°C	20 s	
Fluoreszenzmessung	79°C	5 s	

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle Strategie zur elektrophysiologischen Untersuchung vakuolärer Zuckertransporter und der V-ATPase in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen

In den letzten Jahren wurden in Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten pflanzlichen Vakuolen vornehmlich Ionenströme identifiziert und charakterisiert, die auf den passiven Transport von anorganischen Kationen und Anionen durch Ionenkanäle zurückzuführen sind (Hedrich et al., 1994; Kovermann et al., 2007; Beyhl et al., 2009; Dadacz et al., 2011; Meyer et al., 2011). Im Gegensatz zu Kanälen operieren Zuckertransporter und die V-ATPase mit niedrigeren Transportraten, weshalb diese elektrophysiologisch nicht auf der Ebene einzelner Transportproteine erfasst werden können (Kap. 1.2). Daher wurden die Patch-Clamp-Experimente in der vorliegenden Arbeit in der „whole-vacuole“- Konfiguration durchgeführt, um die gesamte Population der V-ATPase- bzw. der Zuckertransporterproteine einer Vakuole zu erfassen und somit detektierbare makroskopische Ströme zu erhalten. Desweiteren ist bekannt, dass protonengekoppelte Zuckertransporter und die V-ATPase sehr sensitiv auf Veränderungen in Protonenkonzentrationen reagieren, und somit die Amplitude oder im Fall der Zuckertransporter sogar die Richtung der transportvermittelten Ströme beeinflusst werden können (Carpaneto et al., 2005; Rienmüller et al., 2012). Ebenso werden pH-Veränderungen z.B. vom Chloridtransporter (CLC) oder dem Kationenaustauscher (CAX) wahrgenommen, was eine Überlagerung der Stromantworten dieser Transporter mit denen der Zuckertransporter bzw. der V-ATPase zur Folge hätte (Hirschi et al., 1996; De Angeli et al., 2006). Folglich wurden die pH-Werte während der hier durchgeführten Experimente konstant gehalten. Weiterhin wurde bei der Wahl des Osmotikums auf den Einsatz von Zuckern verzichtet, um eine Voraktivierung der zu untersuchenden Zuckertransporter vor der eigentlich stimulierenden Zuckerapplikation ausschließen zu können. Um zudem chemische Gradienten für die eingesetzten Salze, die zu Ionenflüssen führen könnten, zu vermeiden, wurden für artifizielles Zytosol und Vakuolenlumen in allen Experimenten symmetrische Bedingungen für

Salzzusammensetzung und Salzkonzentration gewählt. Zusätzlich wurde das Potential des Tonoplasten auf 0 mV geklemmt, wodurch auch elektrische Triebkräfte für Ionen eliminiert wurden. Zur Stimulation der V-ATPase und der Zuckertransporter dienten folglich ausschließlich Änderungen in den entsprechenden zytosolischen ATP- bzw. Zuckerkonzentrationen, die mittels schnellem und lokalen Lösungsaustausch erreicht wurden (Kap. 2.2.5, Abb. 2.4).

3.2 Elektrische und kinetische Eigenschaften der V-ATPase in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana*

Zur Untersuchung kinetischer und elektrischer Eigenschaften der V-ATPase wurden Patch-Clamp-Experimente in der „whole-vacuole“-Konfiguration unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH 5,5 im Zytosol (Badmedium) und im Vakuolenlumen (Pipette) durchgeführt. Nach Einstellen der „whole-vacuole“-Konfiguration wurde nach einigen Minuten ein vollständiger Lösungsaustausch zwischen Vakuolenlumen und Pipettenmedium erreicht (Kap. 2.2.4, Abb. 2.3). Im Verlauf des Lösungsaustausches wurde die Membran konstant auf 0 mV geklemmt, was sich nach Abschluss der Äquilibrierung zwischen Vakuolenlumen und Pipettenmedium in einem stabilen Stromlevel äußerte (Abb. 3.1). Eine darauffolgende ATP-Applikation mittels der Applikationspipette (Kap. 2.2.5, Abb. 2.4) führte zu einer Auslenkung des Stromlevels nach oben, also einer positiven Stromänderung ausgehend vom Stromausgangslevel (Abb. 3.1). Diese Stromänderung ist auf einen ATP-ase-vermittelten Auswärtsstrom von Protonen in die Vakuole zurückzuführen, wie Rienmüller et al. (2012) unter Verwendung eines spezifischen Inhibitors zeigen konnten. Nach Beendigung der ATP-Applikation und anschließendem Auswaschen wurde ein Rückgang der Stromantwort auf das Ausgangsniveau beobachtet (Abb. 3.1). Als Auslöser V-ATPase-vermittelter Protonenpumpströme dienten zytosolische ATP-Konzentrationen im Bereich von 0,05-10 mM ATP. Applikation von 0,05 mM ATP auf zytosolischer Seite führte zu einer positiven Stromänderung von ca. 0,6 pA/pF ausgehend vom Stromausgangslevel (Abb. 3.1a, links). Eine Erhöhung der ATP-Konzentration auf 5 mM führte zu einem Anstieg der Stromantwort auf ca. 1,4 pA/pF und deutet somit eine Abhängigkeit der V-ATPase-Aktivität von der zytosolischen ATP-Konzentration an (Abb. 3.1a, rechts). Diese Abhängigkeit wurde durch den

Einsatz weiterer ATP-Konzentrationen genauer untersucht (Abb. 3.1b). Dabei wurde eine einzelne Vakuole jeweils mit einer ATP-Konzentration stimuliert. Anzahl der Experimente für jede Konzentration war $n=3-5$.

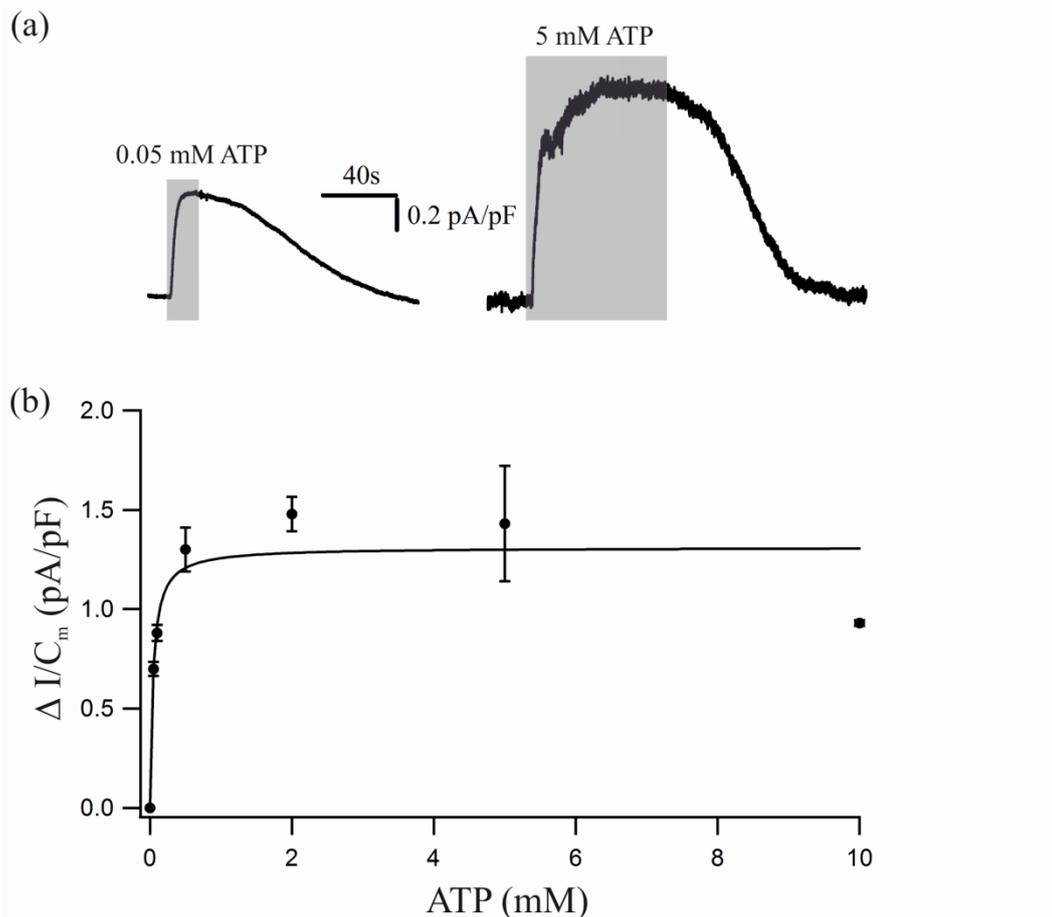


Abbildung 3.1. ATP-abhängige Aktivierung von V-ATPase-vermittelten Protonenströmen in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen: Kinetik der V-ATPase unter symmetrischem pH-Wert 5,5 im Zytosol und Vakuolenlumen. (a) Repräsentative Einzelspuren, die positive Stromänderungen ausgehend vom Stromausgangsniveau auf die Applikationen von 0,05 mM (links) und 5 mM ATP (rechts) unter symmetrischem pH 5,5 aufweisen. Die zytosolische ATP-Applikation ist durch die überlagerten grauen Balken angedeutet. (b) Die makroskopischen Protonenpumpströme – normiert auf die Membrankapazität – als Antwort auf verschiedene ATP Konzentrationen im Bereich von 0,05–10 mM ATP wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Die Kurve repräsentiert den Fit der Datenpunkte mit der Michaelis-Menten-Funktion. Die Datenpunkte geben Mittelwerte \pm SE an. Die Anzahl der Experimente war $n=3-5$.

Ein stufenweiser Anstieg der zytosolischen ATP-Konzentrationen von 0,05 mM auf 10 mM führte zu einem Anstieg der V-ATPase-vermittelten Protonenströme in Form einer Hyperbel (Abb. 3.1b). Aufgrund dessen konnte der Verlauf der Datenpunkte erfolgreich mit einer Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden. Dabei wurde eine maximale Protonentransportkapazität (v_{\max}) von 1,4 pA/pF und ein K_m -Wert von 0,04 mM ATP ermittelt.

3.3 Molekulare Mechanismen des Glucosetransportes in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana*

3.3.1 Transportmechanismus von *AtTMT1/2*

Wormit und Mitarbeiter konnten 2006 zeigen, dass die drei TMT (Tonoplast monosaccharide transporter) Proteine aus *Arabidopsis thaliana* im Tonoplasten lokalisiert sind und sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Glucoseakkumulierung in der Vakuole spielen (Wormit et al., 2006). Diese Beobachtungen führten zu der Fragestellung, ob *AtTMT1/2* den Glucosetransport in die Vakuole im Antiport mit Protonen oder im Uniport vermittelt. Da die Glucosekonzentration in der Vakuole in der Regel um ein Vielfaches höher ist als im Zytosol, wurde für *AtTMT1/2* ein sekundär aktiver Transportmechanismus für die Glucosetranslokation gegen einen Gradienten angenommen. Zur Untersuchung des Transportmechanismus der *AtTMT*-Proteine wurden zunächst Patch-Clamp-Experimente in der „whole-vacuole“-Konfiguration unter physiologischen pH-Bedingungen, d.h. pH 5,5 in der Vakuole (Pipette) und pH 7,5 im Zytosol (Bad), konzipiert (Abb. 3.2a). Unter diesen Bedingungen wurden Mesophyllvakuolen aus Wildtyppflanzen (WT), *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten vermessen (siehe Anhang, Kap. 7.1.1). Die stabilen *AtTMT*-Mutantenlinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus, Universität Kaiserslautern, bereitgestellt. Da Wormit und Mitarbeiter (2006) zeigen konnten, dass die Genexpression von *AtTMT1/2* durch Zuckerbehandlung erhöht war (Wormit et al., 2006), wurden die Analysen an *AtTMT1/2*-Vakuolen durchgeführt, die sowohl aus Glucose-vorinkubierten Blättern als auch aus unbehandelten Blättern isoliert wurden. Für die Vorinkubation wurden die Blätter auf der Unterseite mit feinem Sandpapier aufgeraut und über Nacht in

einer 100 mM Glucoselösung inkubiert. In Abbildung 3.2 (b) sind repräsentative Einzelmessungen an Vakuolen ohne Glucose-Vorinkubation gezeigt, die verdeutlichen, dass die Zugabe von 50 mM Glucose in das Zytosol (Abb. 3.2a) negative Stromänderungen ausgehend vom Strombasislevel bei allen drei Pflanzenlinien induzierte. Die Stimulation mit Glucose wurde dabei mittels der Applikationspipette (Abb. 2.4) solange aufrechterhalten, bis ein quasi-stationäres Level der maximalen Stromänderung unter hoher Zeitauflösung erreicht wurde. Bei Betrachtung der durchschnittlichen Stromdichten von Pflanzen mit und ohne Vorinkubation in 100 mM Glucose ist zu erkennen, dass innerhalb eines Pflanzentyps Stromantworten mit identischen Stromrichtungen und ähnlichen Amplituden zu beobachten waren (Tab.1). Unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen können die negativen Stromänderungen in allen Pflanzenpopulationen als glucosegetriebene Protoneneinwärtsströme in das Zytosol interpretiert werden.

Tabelle1. Durchschnittliche glucoseinduzierte Protonenströme (\pm SE) unter physiologischen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{vak}}=5,5$; $\text{pH}_{\text{zyt}}=7,5$) in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* mit (links) und ohne (rechts) Vorinkubation in 100 mM Glucose.

	Vorinkubation in 100 mM Glucose	Ohne Vorinkubation
WT	-0,41 \pm 0,26 pA/pF (n=4)	-0,33 \pm 0,12 pA/pF (n=10)
<i>AtTMT1</i>-ÜE	-0,77 \pm 0,21 pA/pF (n=6)	-0,73 \pm 0,23 pA/pF (n=6)
<i>Attmt1/tmt2</i>	-0,06 \pm 0,06 pA/pF (n=5)	-0,17 \pm 0,06 pA/pF (n=4)

Da die Stromantworten trotz der unterschiedlichen Vorbehandlungen ähnlich ausfielen (Tab.1), wurden die Messungen des jeweiligen Pflanzentyps kombiniert in einem Balkendiagramm zusammengefasst (Abb. 3.2c). Die durchschnittliche auf die Membrankapazität normierte Stromantwort der *AtTMT1*-Überexpressionsvakuolen lag bei $\Delta I/C_m = -0,75$ pA/pF und war damit ungefähr doppelt so hoch wie die der Wildtypvakuolen ($\Delta I/C_m = -0,35$ pA/pF). Die *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten wiesen im Vergleich zu Wildtypvakuolen nur ca. 30% und zu *AtTMT1*-Überexpressionsvakuolen nur ca. 14% der glucoseinduzierten Protonenströme auf (Abb. 3.2c). Die jeweiligen Differenzen zwischen den einzelnen Pflanzenlinien können auf einen *AtTMT1/2*-vermittelten Glucosetransport zurückgeführt werden.

Desweiteren lässt die Stromänderungsrichtung ins Negative bei Glucosegabe auf einen Glucose/H⁺-Antiport als Transportmechanismus von *AtTMT1/2* schließen.

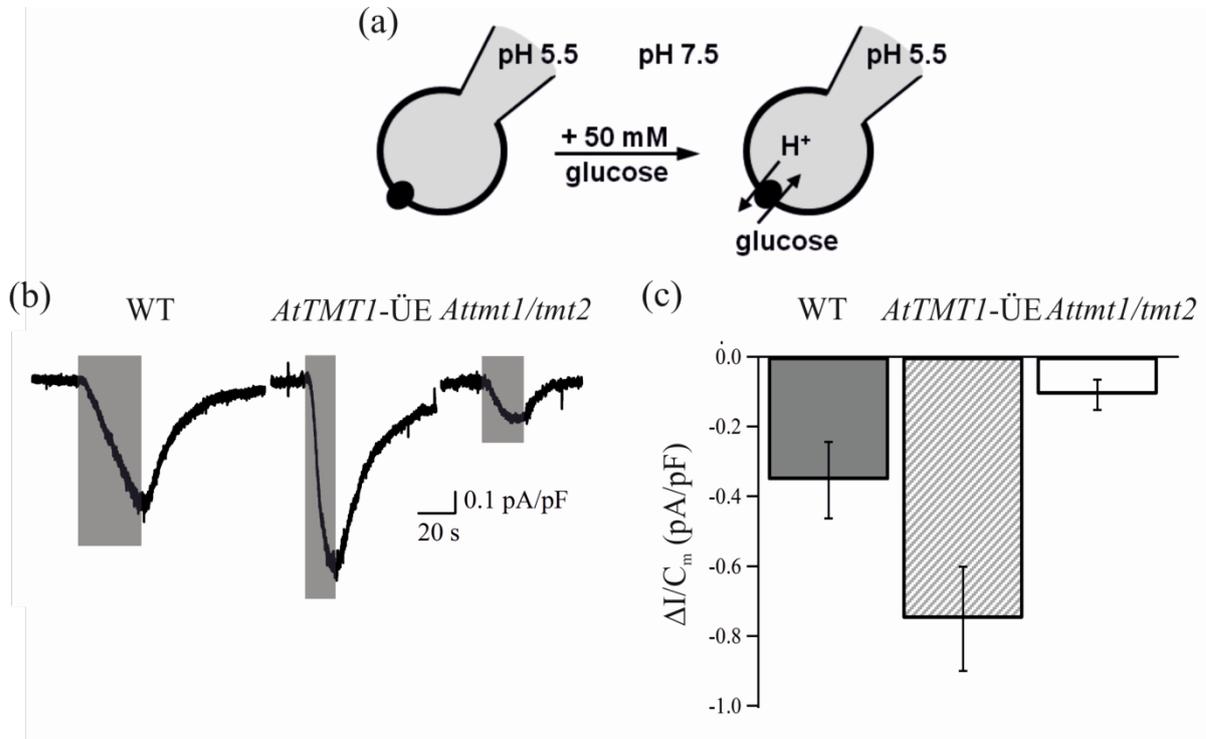


Abbildung 3.2. Messung glucoseinduzierter Protonenströme über die gesamte Membran von *Arabidopsis thaliana* Mesophyllvakuolen von Wildtyppflanzen und *AtTMT1/2*-Mutanten unter physiologischen pH-Bedingungen. (a) Das Schaubild zeigt die experimentellen Bedingungen mit pH 5,5 im Vakuolenlumen (Pipette) und pH 7,5 im Zytosol (Badlösung) in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 50 mM Glucose (Glc). (b) Repräsentative Einzelspuren glucosestimulierter Stromänderungen von Vakuolen aus Wildtyppflanzen (WT), *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten (*Attmt1/tmt2*). Die Dauer der Glucoseperfusion ist durch die überlagerten dunkelgrauen Balken gekennzeichnet. (c) Es sind die Mittelwerte (\pm SE) der glucoseinduzierten Stromänderungen einzelner Vakuolen der verschiedenen Pflanzenpopulationen unter den in (a) gezeigten Bedingungen dargestellt. Die Anzahl der Experimente war n=14 für WT (dunkelgrauer Balken), n=12 für *AtTMT1*-ÜE (gestreifter Balken) und n=9 für *Attmt1/tmt2* (weißer Balken).

3.3.2 Einfluss der protonenmotorischen Kraft auf die Aktivität von *AtTMT1*

Um den Antiportmechanismus von *AtTMT1* zu untermauern und damit vertiefte Einblicke in die Funktionsweise von *AtTMT1* zu erlangen, wurden im weiteren Verlauf Messungen mit *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen unter symmetrischen pH-Bedingungen (pH 7,5) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen lag kein Protonengradient am Tonoplasten an, so dass untersucht werden konnte, ob ein Glucosegradient den Transport als alleinige Triebkraft initiieren kann und inwieweit die Aktivität des *AtTMT1*-vermittelten Glucosetransportes in die Vakuole von der protonenmotorischen Kraft am Tonoplasten gesteuert wird (Abb. 3.3a). Wie in Abbildung 3.3 (b) und (c) anhand der repräsentativen Einzelmessungen und der durchschnittlichen Stromdichten (\pm SE) zu sehen ist, konnten auch unter symmetrischen pH-Bedingungen negative Stromänderungen nach zytosolischer Glucosestimulation (50 mM) in Relation zum Stromausgangslevel beobachtet werden. Diese Stromänderungen können analog zu den vorherigen Ausführungen als glucoseinduzierte Protonenströme in das Zytosol interpretiert werden und bekräftigen folglich den Antiportmechanismus von *AtTMT1*. Desweiteren konnte daraus gefolgert werden, dass der Glucosegradient *per se* ausreicht, um eine Aktivität von *AtTMT1* zu initialisieren. Im Vergleich zur Amplitude der glucoseinduzierten Protonenströme unter physiologischen pH-Bedingungen (pH_{vak} 5,5, pH_{zyt} 7,5), d.h. bei Anliegen eines in das Zytosol gerichteten pH-Gradienten, waren die negativen Stromänderungen in den Experimenten ohne Protonengradienten am Tonoplasten mit einem Wert von $\Delta I/C_m = -0,35 \text{ pA/pF}$ in etwa um die Hälfte reduziert (Abb. 3.3c). Demzufolge weist *AtTMT1* bei gleichzeitiger Anwesenheit eines pH- und Zucker-Gradienten eine gesteigerte Aktivität auf.

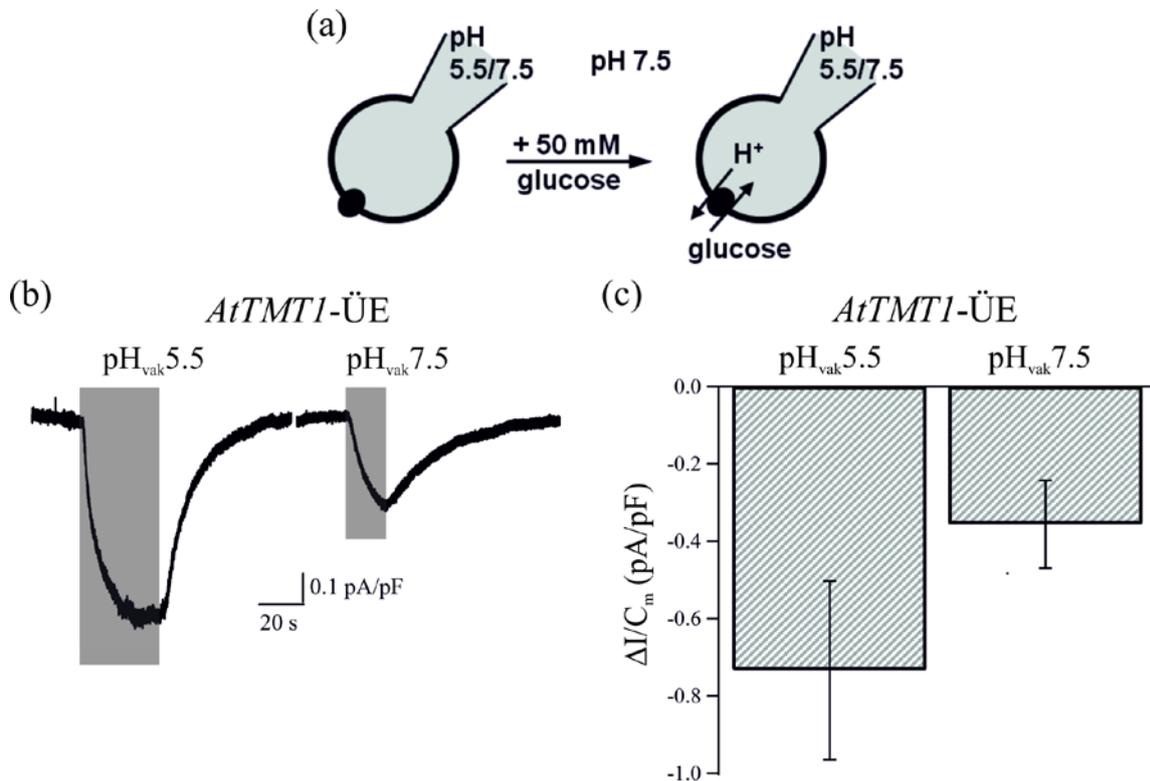


Abbildung 3.3. pH-Abhängigkeit glucoseinduzierter Protonenströme in Mesophyllvakuolen von *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen. (a) Es sind die experimentellen Bedingungen mit pH 5,5 bzw. pH 7,5 im Vakuolenlumen (Pipette) sowie pH 7,5 im Zytosol (Badlösung) in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 50 mM Glucose gezeigt. (b) Repräsentative Stromspuren, aufgenommen bei pH 5,5 (links) und pH 7,5 (rechts) im Vakuolenlumen, sind dargestellt. Die Dauer der zytosolischen Glucosebehandlung ist durch die überlagerten grauen Balken wiedergegeben. (c) Durchschnittliche Stromdichten (\pm SE), bestimmt unter asymmetrischen (links) und symmetrischen (rechts) pH-Bedingungen. Die Anzahl der Experimente war $n=6$ für pH_{vak} 5,5 bzw. $n=8$ für pH_{vak} 7,5. Alle Daten wurden ohne Vorinkubation der Blätter in 100 mM Glucose erhoben.

3.3.3 Rolle von *AtVGT1/2*

Neben dem hier identifizierten Glucose/Protonen-Antiporter *AtTMT1/2* wurde *AtVGT1* (Vacuolar glucose transporter 1) als zweiter potentieller H⁺-gekoppelter Glucosetransporter in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Aluri und Büttner, 2007). Die Autoren postulierten für *AtVGT1* dabei eine mögliche Rolle bei der Samenkeimung (Aluri und Büttner, 2007). In Kapitel 3.3.1 (Abb. 3.2c) wurde gezeigt, dass auch in Abwesenheit von funktionellen *AtTMT*-Transportern (*Attmt1/tmt2*) eine Glucoseapplikation (50 mM) noch geringfügige Protonenströme induzierte. Diese Beobachtung deutet auf die Anwesenheit und Aktivität von mindestens einem

weiteren Glucose/H⁺-Antiporter in Mesophyllvakuolen hin. Als möglicher Kandidat, der sich für diese Restaktivität verantwortlich zeigen könnte, wurde *AtVGT1/2* in Betracht gezogen. Da die durchschnittlichen glucoseinduzierten Stromänderungen in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante mit ca. $\Delta I/C_m = -0,1$ pA/pF (Abb. 3.2c) sehr gering und trotz „whole-vacuole“-Messungen sehr nahe an der Auflösungsgrenze makroskopischer Ströme waren, wurde in den folgenden Studien unter physiologischem pH-Bedingungen ($pH_{vak}=5,5$, $pH_{zyt}=7,5$) eine höhere zytosolische Glucosekonzentration zur Stimulation der Transporter eingesetzt. In der Tat induzierte eine zytosolische Applikation von 125 mM Glucose bei Vakuolen von Wildtyppflanzen mit $\Delta I/C_m = -1,8$ pA/pF eine ca. 5-fach höhere Stromänderung in negativer Richtung als eine Stimulation mit 50 mM Glucose (Abb. 3.4b & c; Abb. 3.2c). Dies deutet an, dass die Glucose/H⁺-Antiportaktivität in Wildtypvakuolen von der zytosolischen Glucosekonzentration bzw. dem Glucosegradienten beeinflusst wird. In welchem Maß diese gesteigerte Antiportaktivität durch *AtTMT1/2* in den Wildtypmesophyllzellen vermittelt wird, sollten Experimente mit der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante klären. Sowohl den Einzelmessungen als auch den durchschnittlichen Stromänderungen ($\pm SE$) (Abb. 3.4b und 3.4c) ist zu entnehmen, dass die glucoseinduzierten Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante bei ca. $\Delta I/C_m = -0,5$ pA/pF lagen. Sie waren damit im Vergleich zum Wildtyp um ca. 70% vermindert. Dieselbe Reduktion der glucosegetriebenen Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante im Vergleich zum Wildtyp war auch bei einer Stimulation mit 50 mM Glucose beobachtet worden (Abb. 3.2c). Um nun zu untersuchen, ob die Ströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante durch *AtVGT1/2*-Transporter vermittelt werden, wurden Experimente mit einer *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutante durchgeführt (siehe Anhang, Kap. 7.1.1). Die *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutante wurde freundlicherweise von PD Dr. Michael Büttner, Universität Heidelberg, bereitgestellt. Wie in den Abbildungen 3.4 (b) und 3.4 (c) zu sehen ist, erreichten die glucoseinduzierten Protonenströme in der *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutante ein der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante ähnliches Niveau. Dieses Ergebnis deutet an, dass *AtVGT1/2* in Mesophyllzellen keine Antiportfunktion zur Glucosebeladung der Vakuole ausführt, da man ansonsten eine weitere Abnahme in den Protonenströmen der Quadrupel-Verlustmutante im Vergleich zu *Attmt1/tmt2* erwartet hätte.

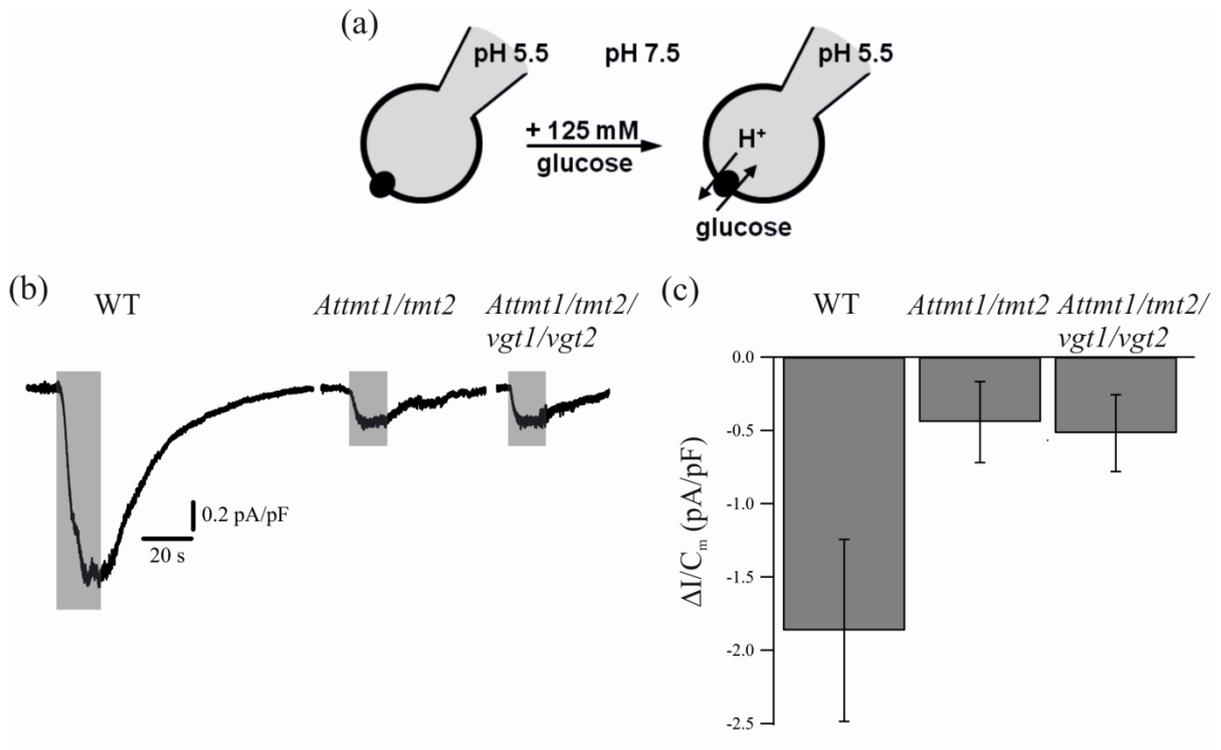


Abbildung 3.4. Der Beitrag von AtTMT1/TMT2 und AtVGT1/VGT2 am protonengekoppelten Glucosetransport in Mesophyllvakuolen. (a) Schematische Darstellung der experimentellen Bedingungen mit pH 5,5 in der Vakuole (Pipette) und pH 7,5 im Zytosol (Bad) in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 125 mM Glucose. (b) Repräsentative Einzelmessungen, durchgeführt mit Vakuolen von Wildtyppflanzen (WT), *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten und *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten. Die Applikation von 125 mM Glucose ist durch die überlagerten dunkelgrauen Balken angedeutet. (c) Die durchschnittlichen Stromdichten (\pm SE) der einzelnen Pflanzenpopulationen sind in einem Balkendiagramm gezeigt. Die Anzahl der Experimente war n=10 für WT, n=10 für *Attmt1/tmt2* und n=9 für *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*.

3.3.4 Einfluss der Glucosekonzentration auf glucoseinduzierte Protonenströme in Wildtypvakuolen

Um den Einfluss der zytosolischen Glucosekonzentration bzw. des Glucosegradienten auf die Aktivität der vakuolären Glucoseantiporter genauer zu untersuchen, wurden Wildtypvakuolen mit Konzentrationen im Bereich von 20–125 mM Glucose stimuliert und die korrespondierenden induzierten Protonenströme aufgezeichnet. Die Experimente wurden unter physiologischen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{vak}}=5,5$, $\text{pH}_{\text{zyt}}=7,5$) durchgeführt. Für einen direkten Vergleich wurde jede einzelne Vakuole mittels zweier Applikationspipetten zunächst mit 50 mM Glucose und darauffolgend mit einer weiteren Glucosekonzentration stimuliert (Abb. 3.5a). In Abbildung 3.5 (b) ist eine einzelne Messung exemplarisch aufgeführt, die aufeinanderfolgend Stromänderungen auf 50 und 60 mM Glucose zeigt. Um einen Bezug zwischen den Stromantworten auf die zwei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen herzustellen, wurden die glucoseinduzierten Stromantworten auf 50 mM Glucose in der Analyse als Referenz eingesetzt. Dafür wurden die potentiellen Abweichungen in der Stromamplitude der variablen Glucosekonzentration für jede Vakuole prozentual zur vorangegangenen Stromantwort auf 50 mM Glucose berechnet. In Abbildung 3.5 (c) ist die Abhängigkeit der glucoseinduzierten Protonenströme von den verschiedenen applizierten Konzentrationen dargestellt. Eine stufenweise Reduktion der Glucosekonzentrationen von 125 auf 20 mM resultierte in einer linearen Abnahme der glucoseinduzierten Protonenströme (Abb. 3.5c).

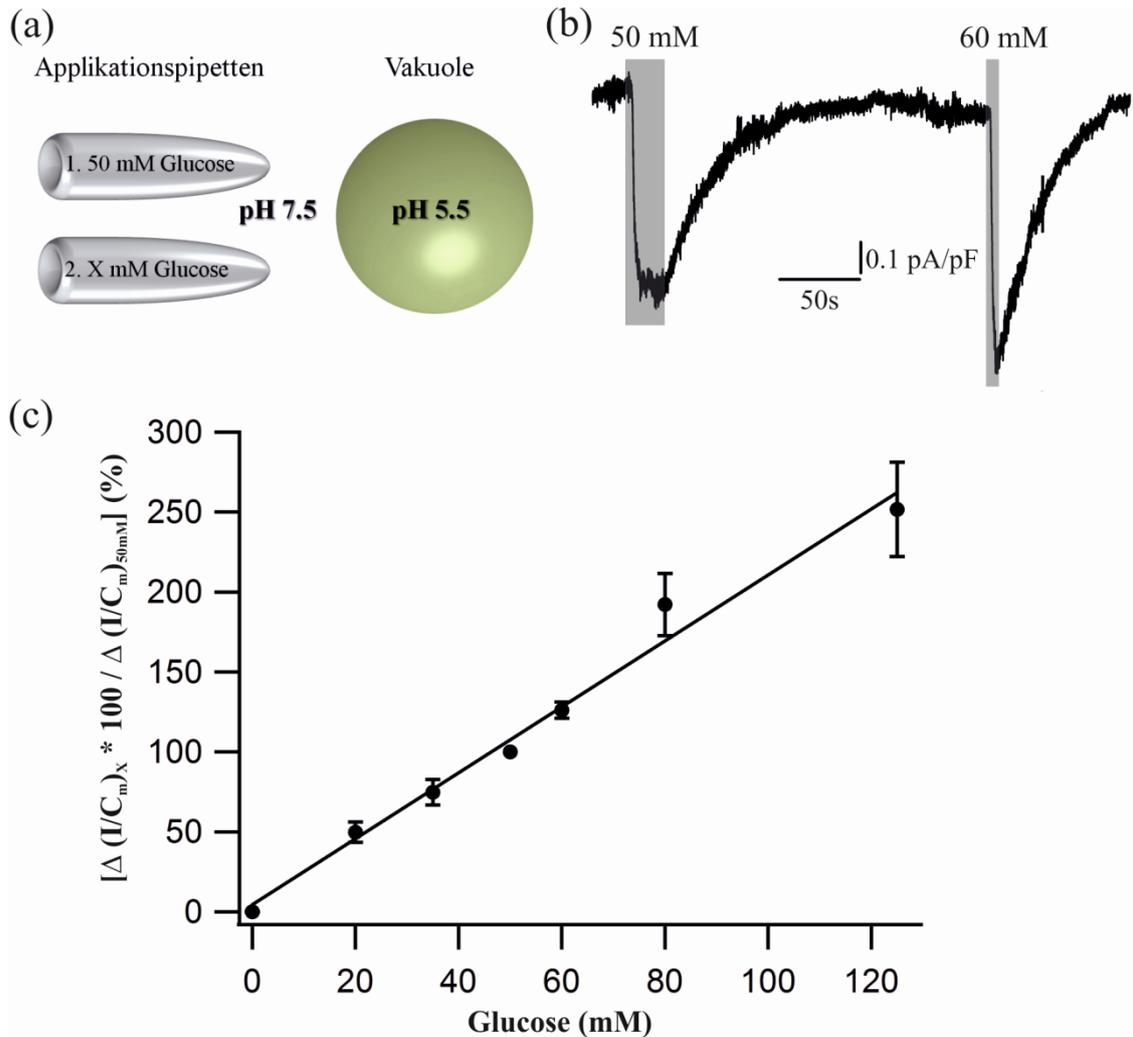


Abbildung 3.5. Abhängigkeit glucoseinduzierter Protonenströme von der zytosolischen Glucosekonzentration. (a) Das Schaubild verdeutlicht die experimentelle Vorgehensweise. Unter physiologischen pH-Bedingungen, pH_{vak} 5,5 und pH_{zyt} 7,5, wurde eine einzelne Wildtypvakuole nacheinander mit 50 mM und X mM Glucose mittels zweier Applikationspipetten stimuliert. (b) Eine exemplarische Einzelstrommessung ist zu sehen, die glucoseinduzierte Protonenströme als Antwort auf die aufeinanderfolgende Applikation von 50 und 60 mM Glucose zeigt. Die Dauer der Glucoseapplikation ist durch die überlagerten grauen Balken angedeutet. (c) Die Abweichungen in den Stromantworten von der Referenzkonzentration 50 mM wurden prozentual für jede einzelne Vakuole bestimmt und als Mittelwert aufgetragen ($\pm SE$). Die eingesetzten Glucosekonzentrationen waren 20, 35, 50, 60, 80 und 125 mM. Die Anzahl der Experimente für jede einzelne Konzentration lag bei $n=3-6$.

3.3.5 Effekt von Salzstress auf die Expression von *TMT1/TMT2* und *VHA-a2*

Wormit und Mitarbeiter haben 2006 mittels RNA-Gelelektrophorese dokumentiert, dass 7 Tage alte *Arabidopsis* Wildtypkeimlinge eine erhöhte Expression von *TMT1* und *TMT2* aufwiesen, wenn sie auf NaCl-enthaltenden (50-200 mM) Agarmedien angezogen wurden. Um diesen Effekt auf ca. 6 Wochen alte Wildtyppflanzen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Zur Anzucht der Pflanzen unter Salzstressbedingungen, wurden diese vor Beginn der Analysen drei Tage lang für je 30 min mit 200 mM NaCl behandelt (Kap. 2.1.1). Im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die ausschließlich mit Wasser behandelt wurden, wiesen salzgestresste Pflanzen eine ca. vierfach höhere Expression von *TMT1* und *TMT2* auf (Abb. 3.6 links). In Analogie zu den *TMT1/2*-Expressionsstudien wurden die Pflanzen ebenso hinsichtlich der Expression des Gens *VHA-a2* untersucht, welches für die V-ATPase-Untereinheit *VHA-a2* kodiert und essentiell für die Funktion der V-ATPase ist (Krebs et al., 2010). *VHA-a2* wies unter Salzstressbedingungen eine ca. zweifach höhere Expression im Vergleich zu den Kontrollbedingungen auf (Abb. 3.6 rechts). Bei Betrachtung der Expression der untersuchten Gene *VHA-a2* und *TMT1/2* in den Kontrollpflanzen ist zu erkennen, dass *VHA-a2* ca. um den Faktor 100 höher exprimiert war als *TMT1/2* (Abb. 3.6).

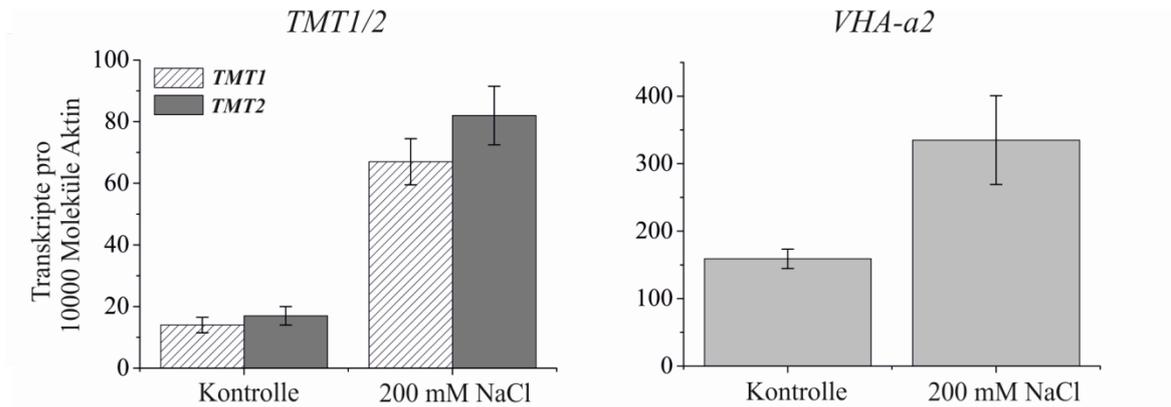


Abbildung 3.6. Expression von *TMT1/TMT2* und *VHA-a2* nach Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyppflanzen unter Salzstressbedingungen. Pflanzen wurden drei Tage lang für jeweils 30 min mit 200 mM NaCl geflutet. Kontrollpflanzen wurde analog mit reinem Wasser vorbehandelt. Die Expression der Gene *TMT1/TMT2* und *VHA-a2* wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Die jeweiligen Transkriptzahlen sind relativ zu 10000 Molekülen Aktin angegeben. Die Anzahl der Experimente war jeweils n=3.

3.3.6 Interaktionsstudien zu *AtTMT1* und *AtVIK1*

Die Aktivität von Zuckertransportern wird durch Faktoren wie Protonengradient und Zuckerkonzentration beeinflusst (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.4; Carpaneto et al., 2005; Sivitz et al., 2007). Wingenter und Mitarbeiter konnten 2011 zudem erstmals eine Proteinkinase aus der mitogenaktivierten Proteinkinasefamilie („mitogen-activated protein 3-kinase“ family), genannt *AtVIK1* (*Arabidopsis thaliana* VH1-interacting kinase), identifizieren, die die Glucoseaufnahme in Vakuolen durch Phosphorylierung von *AtTMT1* reguliert (Wingenter et al., 2011). Um zu untersuchen, ob *AtVIK1* und *AtTMT1* in lebenden Zellen physikalisch interagieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) angewandt (Kerppola, 2008; Geiger et al., 2009). Hierfür wurden *Arabidopsis*-Protoplasten der Verlustmutante *Attmt1/tmt2* transient mit den Konstrukten *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* (siehe Anhang, Kap. 7.1.2) transformiert, um eine mögliche Fusion der beiden YFP-Hälften bei auftretender physikalischer Interaktion von *AtTMT1* und *AtVIK1* zu visualisieren. Die Koexpression der beiden Konstrukte resultierte in einem deutlich sichtbaren BIFC-Signal in Protoplasten (Abb. 3.7a & c). Dieses Fluoreszenzsignal war nach der Lyse der Protoplasten und der damit verbundenen

Freisetzung der Vakuolen klar im Tonoplasten lokalisiert (Abb. 3.7b & d). Dies deutet auf eine physikalische Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* in der vakuolären Membran hin. Das Übersichtsbild zeigt zudem, dass die Interaktion mit hoher Effizienz stattfand (Abb. 3.7a & b). Zur Bestätigung der Spezifität dieser Interaktion wurden zur Kontrolle Protoplasten der Verlustmutante *Attmt1/tmt2* transient mit den Konstrukten *TMT1::YFP^{NT}* und *MEKK1::YFP^{CT}* transformiert. Bei *AtMEKK1* handelt es sich um eine alternative Kinase aus der mitogenaktivierten Proteinkinasefamilie in *Arabidopsis thaliana* (MAPK Group, 2002), die potentiell nicht mit *AtTMT1* interagiert. Die Koexpression der beiden Fusionsproteine *TMT1::YFP^{NT}* und *MEKK1::YFP^{CT}* führte zu einer schwachen BIFC-Fluoreszenz in Protoplasten (Abb. 3.7e), die in freigesetzten Vakuolen nicht zu beobachten war (Abb. 3.7f). Dies bestätigt, dass das BIFC-Signal bei der Koexpression von *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* auf eine spezifische physikalische Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* zurückzuführen ist. Alle in diesem Kapitel (3.3.6) aufgeführten Konstrukte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dietmar Geiger, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Botanik 1, zur Verfügung gestellt.

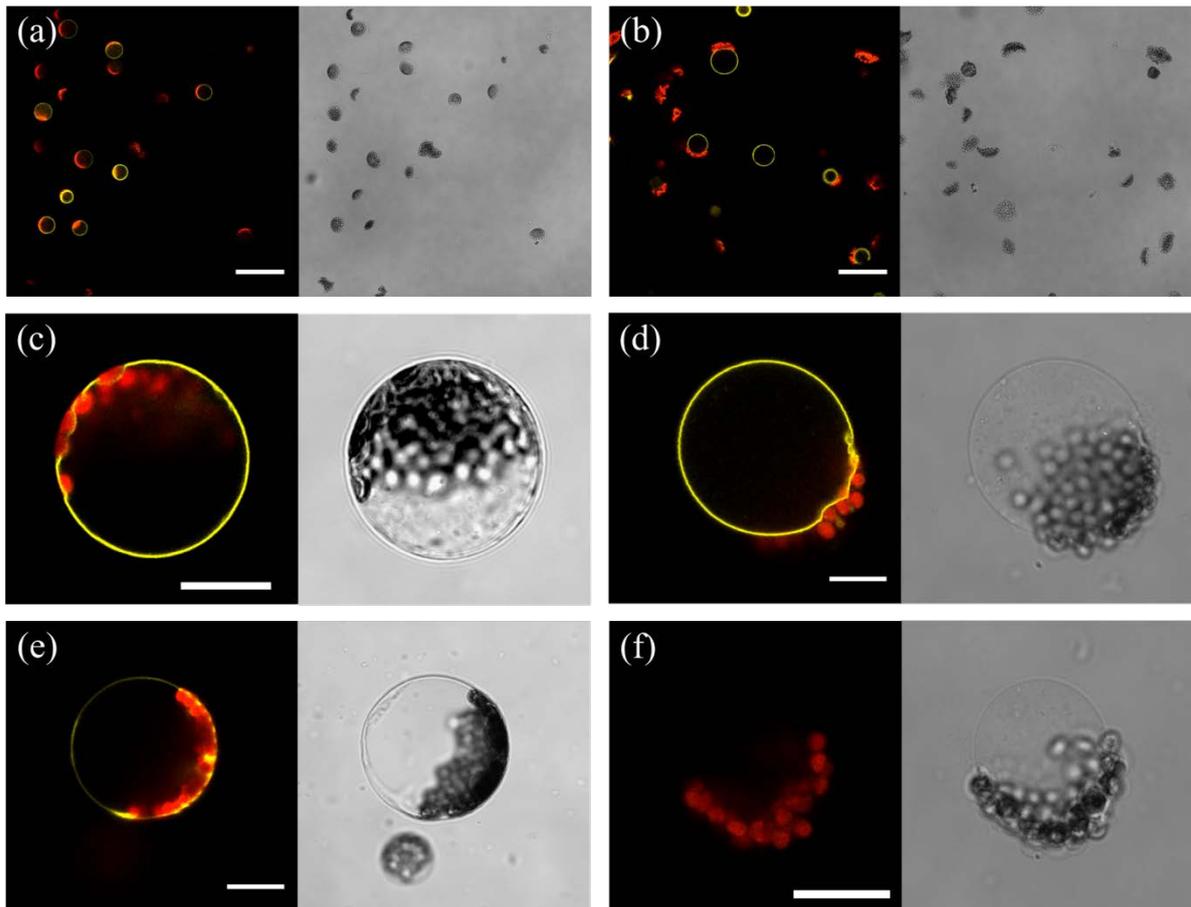


Abbildung 3.7. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1*. (a) Übersichtsbild von *Arabidopsis*-Protoplasten, die *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* koexprimierten. Links ist das Fluoreszenz-, rechts das Durchlichtbild gezeigt. (b) Übersicht von isolierten gelb fluoreszierenden Vakuolen, die *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* exprimierten (links), sowie das korrespondierende Durchlichtbild (rechts). (c) Fluoreszenz- (links) und Durchlichtbild (rechts) eines einzelnen Protoplasten, der *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* exprimiert. Invaginationen um die Chloroplasten deuten BIFC zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* in der vakuolären Membran an. (d) Isolierte gelb fluoreszierende Vakuole, die *TMT1::YFP^{NT}* und *VIK1::YFP^{CT}* exprimiert (links), sowie das korrespondierende Durchlichtbild (rechts). (e) Fluoreszenz- (links) und Durchlichtbild (rechts) eines einzelnen Protoplasten, der *TMT1::YFP^{NT}* und *MEKK1::YFP^{CT}* exprimiert. (f) Vakuolen (Fluoreszenz, links; Durchlicht, rechts), die aus einem Protoplasten, der *TMT1::YFP^{NT}* und *MEKK1::YFP^{CT}* exprimiert, isoliert wurden. Rote Fluoreszenz repräsentiert in allen Aufnahmen die Autofluoreszenz der Chloroplasten. Maßstabsbalken = 100 µM (a, b) und 20 µm (c-f).

3.3.7 Transportmechanismus von *AtERDL6*

Mittels GFP-Analysen in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* wurde kürzlich eine tonoplastidäre Lokalisation für den putativen Glucosetransporter *AtERDL6* (ERD like 6) bestimmt (Poschet et al., 2011). Weiterhin postulierten Poschet und Mitarbeiter eine Funktion von *AtERDL6* beim Glucoseexport aus der Vakuole in das Zytosol (Poschet et al., 2011). Der Transportmechanismus von *AtERDL6* wurde von den Autoren jedoch nicht aufgeklärt. Um diesen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Patch-Clamp-Experimente an zwei verschiedenen Deletionsmutanten aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Um eine Interferenz mit *AtTMT*-vermittelten Protonenströmen zu vermeiden, wurden glucoseinduzierte Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante vergleichend zur *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante aufgezeichnet (siehe Anhang, Kap. 7.1.1). Die *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante wurde freundlicherweise von PD Dr. Michael Büttner, Universität Heidelberg, bereitgestellt. Da die von Poschet et al. (2011) erhobenen Ergebnisse auf eine Exportfunktion von *AtERDL6* hinweisen (Poschet et al., 2011), sollte im Falle eines sekundär aktiven Transportmechanismus von *AtERDL6* ein H^+ -gekoppelter Symport vorliegen. Um diesen Mechanismus experimentell nachweisen zu können, und um die Auflösung der makroskopischen Ströme zu verbessern, wurden in Analogie zu den Arbeiten von Schneider und Mitarbeitern (2008) an *AtINT1* inverse pH-Gradienten ($pH_{vak}=7,5$, $pH_{zyt}=5,5$) verwendet. Bei zytosolischer Applikation von 50 mM Glucose waren somit sowohl der Glucose- als auch der Protonengradient in das Vakuolenlumen ausgerichtet (Abb. 3.8a). Dies führt dazu, dass sich die Transportrichtung von Symportern gemäß der thermodynamischen Gesetze umkehrt (Carpaneto et al., 2005). Unter diesen Versuchsbedingungen verursachte die Zugabe von 50 mM Glucose sowohl in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante als auch in der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante eine positive Stromzunahme relativ zum Stromausgangslevel (Abb. 3.8b & c). Die durchschnittliche Stromantwort lag für Vakuolen der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante bei $\Delta I/C_m = 1,62$ pA/pF und für Vakuolen der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante bei $\Delta I/C_m = 0,86$ pA/pF (Abb. 3.8c). Unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen sowie der vorliegenden Konvention für Ströme stellen die positiven Stromänderungen Protonenauswärtsströme dar. Demzufolge findet bei zytosolischer Glucosegabe ein H^+ -gekoppelter Glucosetransport in das vakuoläre Lumen statt. Interessanterweise

wurde in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante eine Verdoppelung der Stromantwort im Vergleich zur *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante beobachtet. Die niedrigeren glucoseinduzierten Protonenströme in der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante können somit auf das fehlende AtERDL6-Protein zurückgeführt werden. Folglich ist eine H⁺-gekoppelte Symportaktivität von AtERDL6 in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante anzunehmen.

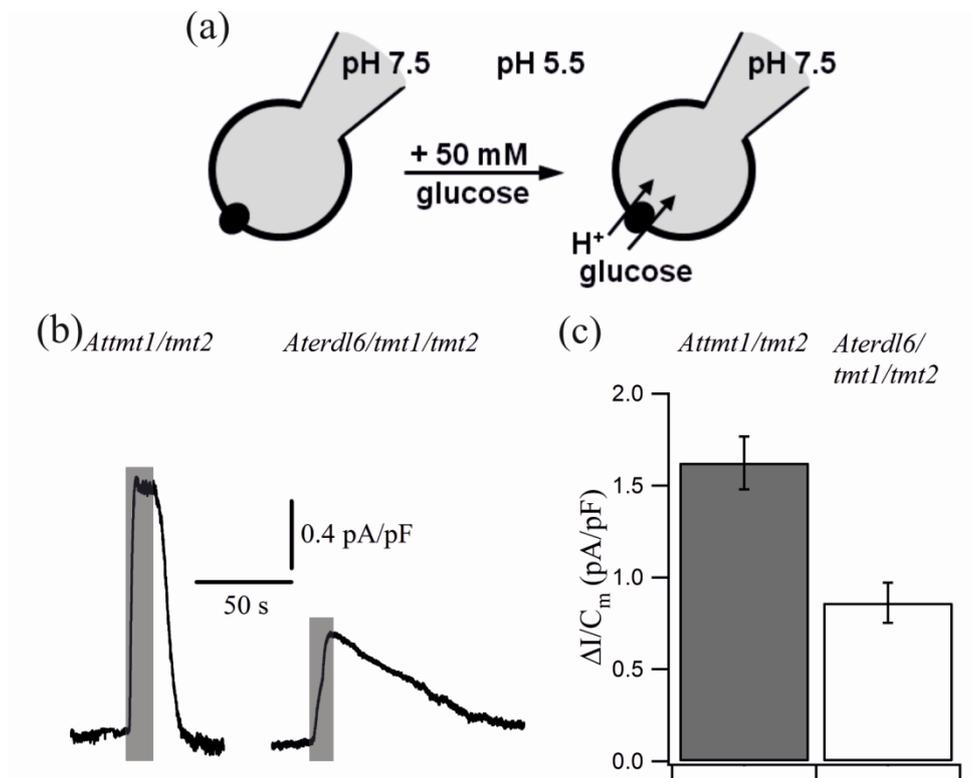


Abbildung 3.8. Glucoseinduzierte Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*- und der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante unter inversen pH-Bedingungen. (a) Das Schaubild verdeutlicht die experimentellen Bedingungen mit pH 7,5 in der Vakuole (Pipette) und pH 5,5 im Zytosol (Bad) in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 50 mM Glucose. (b) Repräsentative Einzelmessungen, die glucoseinduzierte Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*- (links) und der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante (rechts) zeigen. Die Dauer der Glucosestimulation ist durch die überlagerten grauen Balken angedeutet. c) Die Mittelwerte (\pm SE) der glucoseinduzierten Stromänderungen in beiden Deletionsmutanten sind gezeigt. Die Anzahl der Experimente war n=9 für *Attmt1/tmt2* (schwarzer Balken) und n=10 für *Aterdl6/tmt1/tmt2* (weißer Balken).

3.4 Molekulare Mechanismen des Saccharosetransportes in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana*

3.4.1 Saccharose/Protonen-Antiport in Wildtypvakuolen

Bis dato wurde noch kein Transporter in *Arabidopsis* für den Transport von Saccharose in die Vakuolen identifiziert. Als zugrundeliegende Mechanismen wurden bislang jedoch sowohl erleichterte Diffusion als auch sekundär aktiver Transport postuliert (Kaiser und Heber, 1984; Getz und Klein, 1995; Martinoia, 2000). Um zu untersuchen, ob Saccharose im Austausch gegen Protonen in Vakuolen akkumuliert, wurden in der vorliegenden Arbeit Patch-Clamp-Experimente an Wildtypvakuolen aus Mesophyllzellen unter physiologischen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{vak}}=5,5$, $\text{pH}_{\text{zyt}}=7,5$) konzipiert. In diesen Studien wurden einzelne Vakuolen mit zwei unterschiedlichen Saccharosekonzentration, 50 und 125 mM, stimuliert und die korrespondierenden Stromantworten nacheinander aufgezeichnet. Die aufeinanderfolgenden Applikationen von 50 mM und 125 mM Saccharose führten zu negativen Stromantworten relativ zum Stromausgangslevel (Abb. 3.9a). Diese Stromänderungen können als saccharoseinduzierte Protonenströme in das Zytosol interpretiert werden und lassen auf einen Antiportmechanismus für den Transport von Saccharose in die Vakuole von Mesophyllzellen schließen. In Analogie zur Abhängigkeit der Protonenströme von der Glucosekonzentration (Kapitel 3.3.4, Abb. 3.5) war auch für Saccharose bei Erhöhung der Konzentration von 50 zu 125 mM eine gesteigerte Stromantwort zu beobachten (Abb. 3.9a). Die Abweichungen in den Stromamplituden, die durch 125 mM im Vergleich zu 50 mM Saccharose induziert wurden, wurden in Analogie zu Kapitel 3.3.4 prozentual berechnet (Abb. 3.9b). Der Anstieg bei Erhöhung der Saccharosekonzentration von 50 zu 125 mM betrug 86% (Abb. 3.9b).

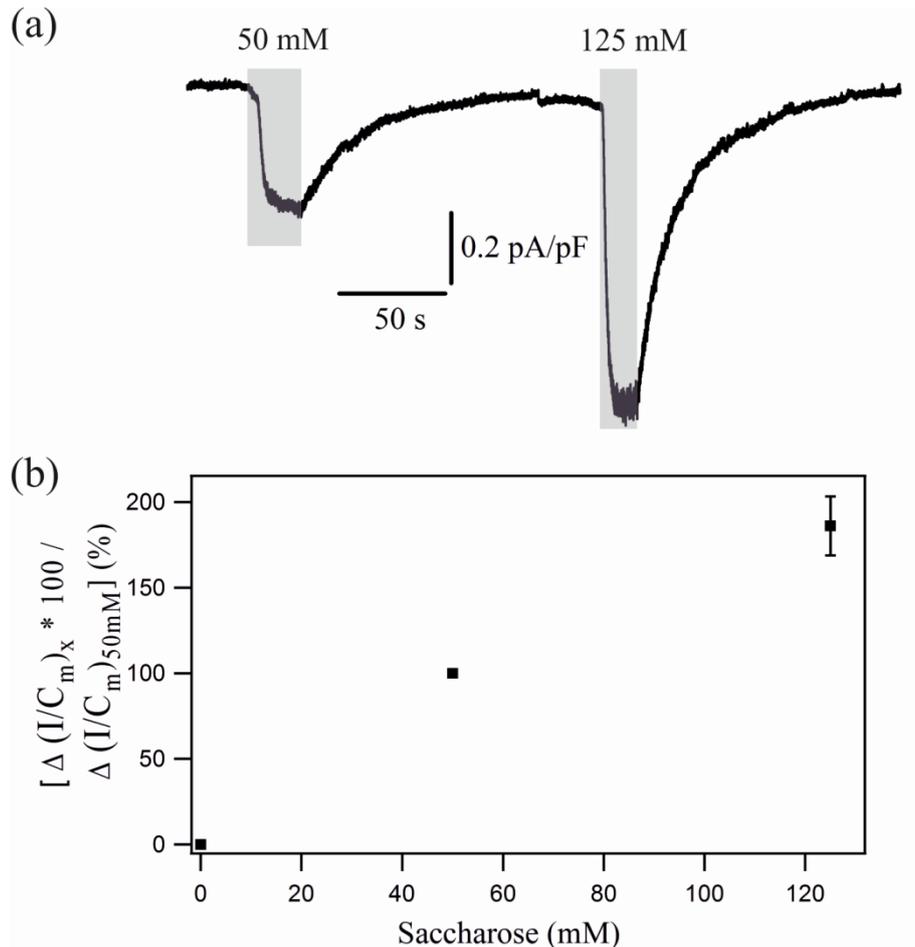


Abbildung 3.9. Saccharoseinduzierte Protonenströme in Wildtypvakuolen von *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen. (a) Die Experimente wurden unter physiologischen pH-Bedingungen, d.h. pH 7,5 im Zytosol (Bad) und pH 5,5 in der Vakuole (Pipette), durchgeführt. Die Saccharosekonzentrationen 50 und 125 mM wurden aufeinanderfolgend mittels zweier Applikationspipetten appliziert. Es ist eine repräsentative Einzelmessung wiedergegeben, die negative Stromänderungen ausgehend vom Strombasislevel mit verschiedenen Amplituden als Antwort auf die Stimulationen mit 50 bzw. 125 mM Saccharose zeigt. Die Dauer der zytosolischen Saccharoseperfusion ist durch die überlagerten grauen Balken angedeutet. (b) Die Abweichung der Stromreaktion auf Applikation von 125 mM Saccharose im Verhältnis zur Referenzkonzentration 50 mM ist prozentual aufgetragen. Die Anzahl der Experimente war n=5 (\pm SE).

Diese Beobachtungen schlagen auch für den Saccharosetransport eine Beeinflussung der Aktivität durch Erhöhung des Saccharosegradienten vor. Der Mittelwert der absoluten, auf die Membrankapazität normierten Stromantwort auf 50 mM Saccharose lag bei $\Delta I/C_m = -0,25 \pm 0,06$ pA/pF (n=5, \pm SE) und befand sich somit nahe der glucoseinduzierten Stromantwort in Wildtypvakuolen ($\Delta I/C_m = -0,35$ pA/pF, siehe Kapitel 3.3.1).

3.4.2 Rolle von *AtTMT1/2* beim Saccharosetransport

Kürzlich wurde ein plasmamembranständiger Transporter in dem pathogenen Pilz *Ustilago mardis* identifiziert, der eine moderate Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Monosaccharidtransporterfamilie aufweist und zum Saccharose-Transport fähig ist (Wahl et al., 2010). Diese Entdeckung sowie die Ähnlichkeit der in Kapitel 3.4.1 vorgestellten saccharoseinduzierten Protonenströme in Wildtypvakuolen mit den glucoseinduzierten Ströme (Kapitel 3.3.1) führten zu der Arbeitshypothese, dass *AtTMT* möglicherweise auch Saccharose transportieren kann. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Reaktionen von Mesophyllvakuolen aus Wildtyppflanzen (WT), *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten auf Glucose- und Saccharosestimulation unter physiologischen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{vak}}=5,5$, $\text{pH}_{\text{zyt}}=7,5$) aufgezeichnet. Zum direkten Vergleich der Stromantworten auf die beiden Zucker wurden einzelne Vakuolen der genannten Pflanzenlinien mittels zweier Applikationspipetten nacheinander mit 50 mM Glucose und 50 mM Saccharose stimuliert (Abb. 3.10a). Die glucoseinduzierten Stromreaktionen in Vakuolen der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten waren im Vergleich zu Wildtyppflanzen und *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen tendenziell in gleichem Maße reduziert wie in den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Experimenten (Abb. 3.10c, dunkelgraue Balken). Interessanterweise konnte für die saccharoseinduzierten Stromänderungen dieselbe Tendenz wie für Glucose bei Betrachtung der einzelnen Pflanzenpopulationen beobachtet werden (Abb. 3.10c, hellgraue Balken). Bei genauerer Analyse entsprechender exemplarischer Einzelmessungen, die mit Wildtyppflanzen, *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten durchgeführt wurden, ist zu erkennen, dass die Applikationen von 50 mM Glucose (Abb. 3.10b; dunkelgrauer Balken) und 50 mM Saccharose (Abb. 3.10b; hellgrauer Balken) ähnliche Stromamplituden in derselben Vakuole unabhängig von der jeweiligen Pflanzenlinie induzierte.

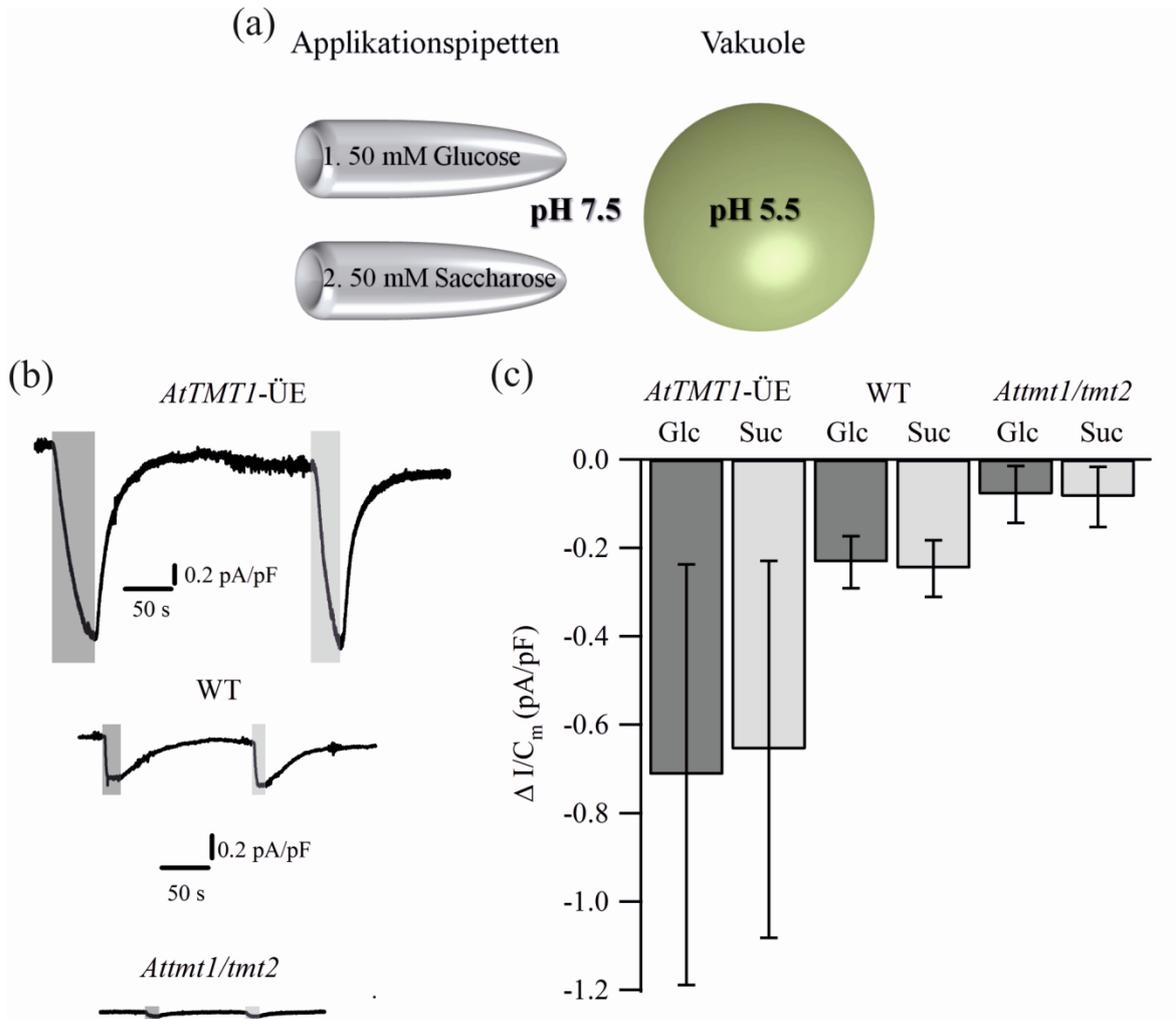


Abbildung 3.10. Charakterisierung glucose- und saccharoseinduzierter Protonenströme in Mesophyllvakuolen von Wildtyppflanzen (WT)- und *AtTMT1/2*-Mutanten. (a) Die Grafik zeigt die experimentellen Bedingungen mit pH 7,5 im Zytosol (Bad) und pH 5,5 in der Vakuole (Pipette). 50 mM Glucose und 50 mM Saccharose wurden aufeinanderfolgend mittels zwei verschiedenen Applikationspipetten auf zytosolischer Seite in Richtung der Vakuole perfundiert. (b) Es sind repräsentative Stromantworten von *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE), Wildtyppflanzen (WT) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten auf die zytosolische Applikation von 50 mM Glucose (dunkelgrauer Balken) und 50 mM Saccharose (hellgrauer Balken) gezeigt. (c) Die durchschnittlichen zuckerinduzierten Änderungen der Stromreaktionen wurden von einzelnen Vakuolen aus *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE, n=4), Wildtyppflanzen (WT, n=6) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten (n=6) bestimmt. Die korrespondierenden Mittelwerte (\pm SE) wurden in dem Balkendiagramm gegenübergestellt. Die glucose- (dunkelgraue Balken) und saccharoseinduzierten (hellgraue Balken) Stromänderungen waren innerhalb der einzelnen Populationen ähnlich.

Zur Veranschaulichung wurde für jede Vakuole die Stromantwort auf Saccharose auf die Stromantwort auf Glucose normiert, wobei die Abweichungen prozentual bestimmt wurden (Abb. 3.11). Hier wird nochmals deutlich, dass die Abweichungen zwischen glucose- und saccharoseinduzierten Strömen innerhalb der einzelnen Populationen sehr gering sind. Diese Beobachtungen zusammen mit den reduzierten saccharoseinduzierten Protonenströmen in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten deuten an, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen sowohl Glucose als auch Saccharose als Substrate für *AtTMT1* und/oder *AtTMT2* in Frage kommen. Die saccharoseinduzierten Restströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante deuten auf mindestens einen weiteren unbekanntem Saccharoseantiporter hin.

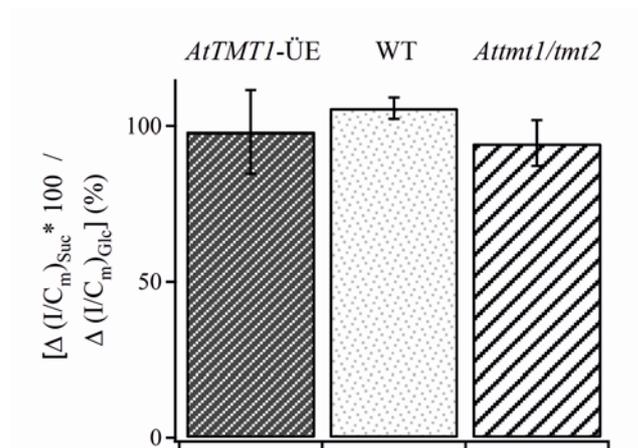


Abbildung 3.11. Vergleich saccharose- und glucoseinduzierter Protonenströme in den einzelnen Pflanzenpopulationen. Für Wildtyppflanzen (WT), *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten (*Attmt1/tmt2*) wurden die Stromreaktionen auf 50 mM Saccharose für jede einzelne Vakuole mit denen auf 50 mM Glucose verglichen und potentielle Abweichungen prozentual bestimmt (\pm SE). Die Stromantwort auf Applikation von 50 mM Glucose diente bei der Analyse als Referenz und wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die Anzahl der Experimente ist in Abbildung 3.10 aufgelistet.

3.4.3 Transportmechanismus von *AtSUC4*

Wie bereits in Kapitel 1.3 erläutert wurde, ist *AtSUC4* in Hefezellen in der Plasmamembran lokalisiert und vermittelt dort den H⁺-gekoppelten Symport von Saccharose (Weise et al., 2000). Da *AtSUC4* in *Arabidopsis* allerdings in der Vakuolenmembran lokalisiert ist (Endler et al., 2006), fehlt bisher ein eindeutiger Beweis für den molekularen Mechanismus von *AtSUC4* in seiner natürlichen Umgebung. Um den nativen Transportmechanismus von *AtSUC4* zu erfassen, wurden daher Patch-Clamp-Experimente mit *Attmt1/tmt2*- und *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten durchgeführt, die ein *AtSUC4*-GFP-Fusionsprotein transient überexprimierten (siehe Anhang, Kap. 7.1.2). Diese Verlustmutanten wurden als Transformationshintergrund gewählt, um eine Interferenz mit der Saccharose/Protonen-Antiportaktivität der *AtTMTs* (Kapitel 3.4.2, Abb. 3.10) zu vermeiden. Das *AtSUC4*-GFP-Fusionsprotein wurde von Dr. Sabine Schneider, Universität Erlangen, hergestellt und freundlicherweise für die Funktionsstudien zur Verfügung gestellt. Freigesetzte Vakuolen aus transfizierten Protoplasten der beiden Verlustmutanten wiesen 40-48 Stunden nach der Transformation eindeutig eine GFP-Fluoreszenz in der vakuolären Membran auf (Abb. 3.12). Für Kontrollmessungen wurden Protoplasten der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante mit einer löslichen Version von GFP transfiziert, welches im Zytosol detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt, GFP-Konstrukt wurde ebenfalls von Dr. Sabine Schneider, Universität Erlangen, hergestellt). Um die potentielle Symportaktivität von *AtSUC4* herauszuarbeiten, wurden in Analogie zu den Experimenten mit *AtERDL6* und *AtINT1* Patch-Clamp-Experimente unter einem inversen pH-Gradienten durchgeführt, d.h. mit pH 5,5 im Zytosol und mit pH 7,5 in der Vakuole, (Abb. 3.13a; Schneider et al., 2008). Zum besseren Vergleich der induzierten Ströme in den transienten Überexpressionslinien und den Kontrollpflanzen wurden die durchschnittlichen saccharoseinduzierten Stromänderungen, die in *AtSUC4*-überexprimierenden Vakuolen aufgezeichnet wurden, auf die der Kontrollvakuolen normalisiert. Hierfür wurden die durchschnittlichen Stromänderungen (\pm SE) in den Kontrollvakuolen auf den Wert -1 gesetzt.

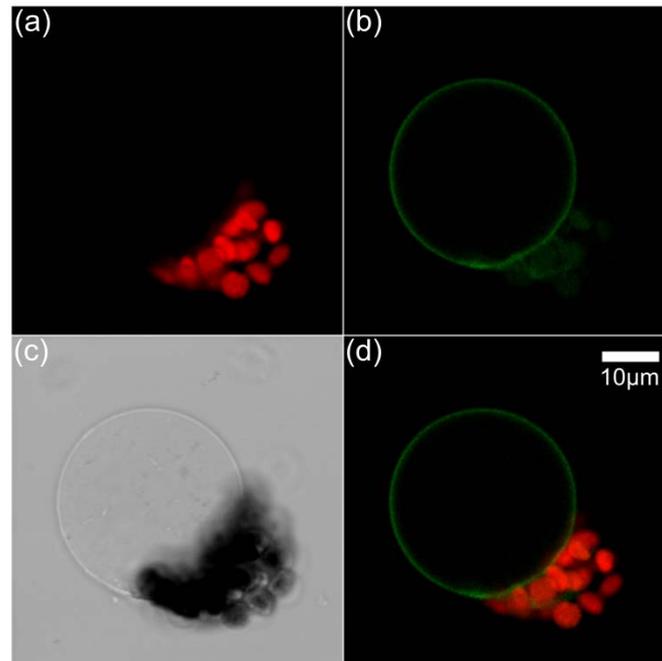


Abbildung 3.12. Subzelluläre Lokalisation des *AtSUC4*-GFP-Fusionsproteins. *AtSUC4*-GFP wurde transient in Mesophyllprotoplasten von *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten exprimiert. Die Bilder von freigesetzten Vakuolen wurden ca. 45 Stunden nach der Transformation mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen. Die in (a-d) gezeigten Bilder stammen von derselben Vakuole. (a) Autofluoreszenz der an die Vakuole anhaftenden Chloroplasten. (b) GFP-Fluoreszenz. (c) Durchlichtbild von der freigesetzten Vakuole. (d) Überlagerung der Chlorophyll- und der GFP-Fluoreszenz. Die GFP-Fluoreszenz ist eindeutig in der vakuolären Membran lokalisiert.

Eine Stimulation von *AtSUC4*-überexprimierenden Vakuolen der *Attmt1/tmt2*- bzw. *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten mit 50 mM Saccharose resultierte ausschließlich in positiven Stromänderungen relativ zum Ausgangsstromlevel (Abb. 3.13b & c, grauer Balken). Die durchschnittliche normalisierte Stromantwort (\pm SE) von sechs untersuchten Vakuolen betrug ca. 0,7 pA/pF (Abb. 3.13c). Dieses Verhalten kann als saccharosegetriebener Protonenauswärtsstrom in das Vakuolenlumen gedeutet werden und lässt daher einen Symportmechanismus für *AtSUC4* *in planta* vermuten. Diese Schlussfolgerung wird durch die saccharoseinduzierten Protoneneinwärtsströme in den Kontrollvakuolen unterstützt, die *AtSUC4* nicht überexprimierten. So induzierte die Applikation von 50 mM Saccharose in den Kontrollvakuolen eine durchschnittliche negative Stromänderung relativ zum Stromausgangsniveau von -1,3 pA/pF, was wiederum auf einen weiteren unbekanntem Saccharose/Protonen-Antiporter neben *AtTMT* hindeutet (siehe auch Kapitel 3.4.2).

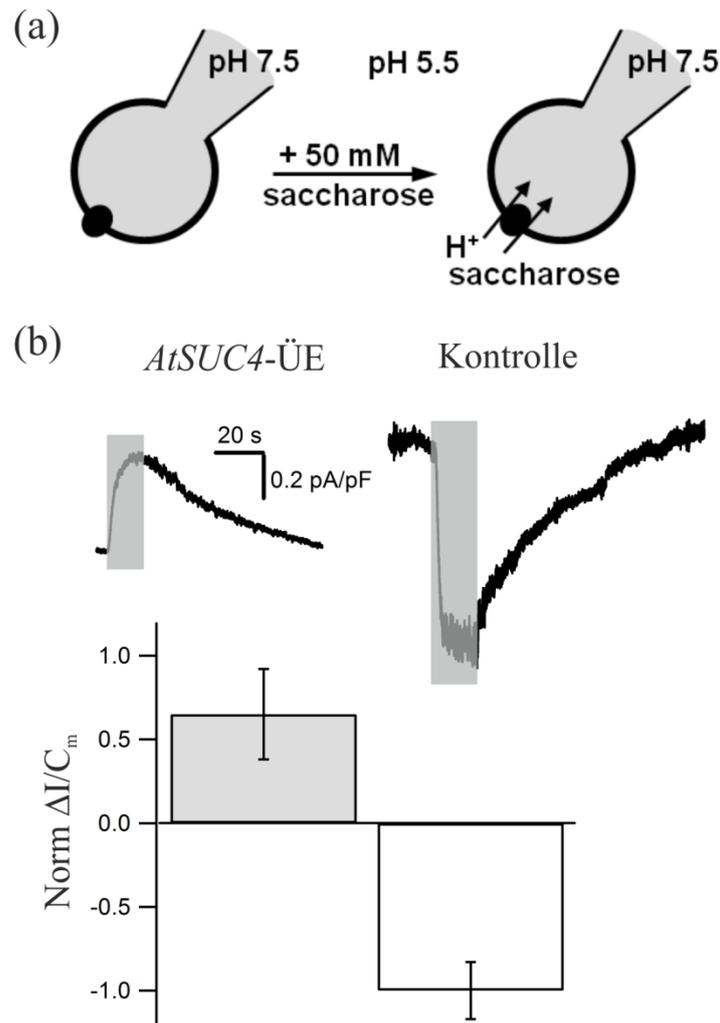


Abbildung 3.13. Funktionelle Charakterisierung des Saccharosetransportes von Vakuolen aus *Attmt/vgt*-Verlustmutanten, die *AtSUC4* überexprimieren. (a) Die Grafik zeigt die experimentellen Bedingungen mit pH 5,5 im Zytosol (Bad) und pH 7,5 im vakuolären Lumen (Pipette) in Ab- und Anwesenheit von 50 mM Saccharose. (b, oben) Es sind Stromantworten einer Vakuole aus der *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutante, die *AtSUC4* überexprimierte (*AtSUC4*-ÜE, links), und einer Vakuole aus der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante, die mit freiem GFP transformiert wurde gezeigt (Kontrolle, rechts). Die Saccharoseapplikation ist durch die überlagerten grauen Balken angedeutet. (b, unten) Die durchschnittlichen saccharoseinduzierten Stromänderungen, die in *AtSUC4*-überexprimierenden Vakuolen aufgezeichnet wurden, wurden auf die der Kontrollvakuolen normalisiert. Hierfür wurden die durchschnittlichen Stromänderungen in den Kontrollvakuolen auf -1 gesetzt. Die ermittelten normierten Stromdichten sind im Balkendiagramm als Mittelwerte (\pm SE) gezeigt. Die Anzahl der Experimente war $n=6$ für *Attmt/vgt*-Verlustmutanten ($n=3$ für *Attmt1/tmt2* und $n=3$ für *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*) und $n=4$ für die Kontrolle.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die molekularen Transportmechanismen sowie Triebkräfte und regulatorische Elemente des vakuolären Zuckertransportes *in planta* mittels elektrophysiologischer Messungen und mikroskopischer Interaktionsstudien an isolierten Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden.

4.1 *AtTMT1/2* mit zentraler Rolle bei der protonen-gekoppelten Glucoseaufnahme

Monosaccharide wie Glucose und Fructose erfüllen wichtige Aufgaben als Kohlenstoffquellen im pflanzlichen Organismus (Kap 1.3). Da Monosaccharide als reduzierende Zucker schnell Reaktionen mit Aminen eingehen und somit wichtige Proteine schädigen, werden diese sowohl temporär als auch langfristig in hohen Konzentrationen in den Vakuolen gespeichert und damit geringe Konzentrationen im Zytosol aufrechterhalten (Slewiniski, 2011). Der Transport von Monosacchariden, im Speziellen von Glucose, über die Vakuolenmembran wurde vor einigen Jahren mittels Aufnahmestudien in verschiedenen Spezies unter Verwendung von isolierten Vakuolen bzw. Vakuolenvesikeln gezeigt, ohne jedoch die daran beteiligten Transporterproteine zu kennen (Rausch, 1991). Weiterhin offenbarten Untersuchungen von Thom und Komor (1984), dass die Glucoseaufnahme in die Vakuole mit einer Depolarisation der Vakuolenmembran sowie einem Abfall des vakuolären pH-Wertes einhergeht (Thom und Komor, 1984). Diese beiden Beobachtungen deuten auf einen glucoseinduzierten Protonenfluss in das Zytosol und somit auf einen Glucose/Protonen-gekoppelten Antiporter hin (Thom und Komor, 1984). Ebenso schlagen neuere Studien von Wormit und Mitarbeitern (2006) sowie Aluri und Büttner (2007) vor, dass Teile der vakuolären Glucose-Transportkapazität von einer existierenden protonenmotorischen Kraft abhängig sind. Wormit und Mitarbeiter (2006) konnten zeigen, dass der *AtTMT1*-gekoppelte Glucose-Transport über die Vakuolenmembran durch Applikation des Protonophors $\text{NH}_4\text{-Cl}$ inhibiert wird. Da die Zugabe eines Protonophors den natürlichen in das Zytosol gerichteten Protonengradienten aufhebt, weist dieses Ergebnis auf eine protonengekoppelte

Aktivität von *AtTMT1* hin (Wormit et al., 2006). *AtVGT1*, ein weiterer Vertreter der Monosaccharidtransporter-ähnlichen Genfamilie, vermittelte eine Glucoseakkumulation in Hefevakuolen ausschließlich in Anwesenheit von ATP. Durch ATP-Applikation konnte offenbar ein Protonengradient über die Vakuolenmembran mittels der H⁺-ATPasen aufgebaut, und wahrscheinlich von *AtVGT1* als Energiequelle zum Glucosetransport in die Vakuole genutzt werden (Aluri und Büttner, 2007). Der Kenntnisstand zum vakuolären Glucosetransport zu Beginn dieser Arbeit deutete somit daraufhin, dass die Aufnahme von Glucose in Vakuolen höchstwahrscheinlich über einen protonengekoppelten Transportmechanismus erfolgt.

AtTMT war der erste potentielle vakuoläre Monosaccharidtransporter, der 2006 auf molekularer Ebene identifiziert und mittels v.a. biochemischer Analyseverfahren weiterführend charakterisiert wurde (Wormit et al., 2006). Im Zuge dessen konnten die Autoren zeigen, dass *AtTMT1/2* für die bei Kältestress vermehrte Akkumulation von Glucose sowie Fructose in den Pflanzen verantwortlich ist. Um nun die vakuoläre Anreicherung der Zucker thermodynamisch erklären zu können, wurde ein sekundär aktiver Transportmechanismus und damit eine Antiportfunktion für *AtTMT1/2* angenommen (Wormit et al., 2006). Ein Antiportmechanismus für die Aufnahme von Zuckern erschließt sich prinzipiell aufgrund des natürlichen in das Zytosol gerichteten pH-Gradienten, und Hinweise für dessen tatsächliche Existenz *in planta* lieferten - wie im vorabgegangenen Abschnitt bereits erwähnt - die biochemischen Transportstudien an isolierten pflanzlichen Vakuolen (Thom und Komor, 1984; Wormit et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden nun Patch-Clamp-Experimente konzipiert und durchgeführt, die die Anwesenheit von Glucose-Transportern in Wildtyp-Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* und deren Funktion im Glucose/Protonen-Antiportmechanismus direkt erfassen und eindeutig belegen (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2). In Abwesenheit von luminalen Zuckern löste die zytosolische Applikation von Glucose den Transport von Glucose in die Vakuole im Austausch mit Protonen aufgrund des in die Vakuole gerichteten Glucosegradienten aus. Dieser Transport wurde thermodynamisch zusätzlich über den ins Zytosol gerichteten physiologischen pH-Gradienten (pH 5,5 in der Vakuole (Pipette) und pH 7,5 im Zytosol (Bad)) angetrieben. Diese protonenmotorische Kraft sowie der vorliegende Zuckergradient konnte folglich maximal von den vorhandenen vakuolären Glucose/H⁺-Antiportern als Energiequelle für den Zuckertransport

genutzt werden. Weiterhin lieferten Patch-Clamp-Untersuchungen unter physiologischem pH-Gradienten an *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen (*AtTMT1*-ÜE) und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten den molekularen Nachweis, dass der in Wildtyppflanzen beobachtete Glucose/Protonen-Antiport – wie von Wormit et al. 2006 vermutet - tatsächlich grossteils von *AtTMT1/2*-Transportern vermittelt wird. So waren die glucoseinduzierten Protonenströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante im Vergleich zu Wildtyppflanzen und *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen stark reduziert, während die glucoseinduzierten Protonenströme in den *AtTMT1*-Überexpressionsvakuolen in etwa doppelt so hoch waren wie in Wildtypvakuolen (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2b & c). Diese zweifach erhöhte Transportaktivität in *AtTMT1*-Überexpressionsvakuolen ist im Einklang mit den Analysen von Wingenter und Mitarbeitern (2010), die eine veränderte Glucoseverteilung in *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen im Vergleich zum Wildtyp offenbarten (Wingenter et al. 2010). Danach speicherten *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen 65-80% des gesamten Glucosereservoirs der Blätter in den Vakuolen, während in Wildtyppflanzen nur etwa 40% der Glucose in den Vakuolen detektiert wurde (Wingenter et al. 2010). Die Zunahme im Glucosegehalt sowie in den Stromdichten in *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen scheinen dabei auf einer gesteigerten Dichte der *AtTMT1*-Proteine in der Vakuolenmembran zu basieren (Wingenter et al. 2010). Dagegen waren die glucoseinduzierten Ströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante im Vergleich zum Wildtyp um ca. 70% reduziert (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2), was auf eine dominante Rolle von *AtTMT1/2* bei der H⁺-gekoppelten Glucoseakkumulierung in Mesophyllvakuolen hindeutet. Diese Beobachtung bestätigen Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glucose, die zeigten, dass Vakuolen zweier unabhängiger *Attmt1*-Verlustmutanten unter Kältestress jeweils ca. 70% weniger Glucose akkumulierten als Wildtypvakuolen (Wormit et al., 2006). *AtTMT1/2*-vermittelte Glucoseakkumulierung in Vakuolen von Mesophyllzellen wurde in den Studien von Wormit und Mitarbeitern (2006) unter Kältestress gezeigt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivität von *AtTMT1/2* wurde dagegen an Pflanzen aufgezeichnet, die unter normalen Anzuchtbedingungen bei 21°C/16°C kultiviert wurden. Dies lässt daher auf eine generelle Funktion von *AtTMT1/2* bei der Akkumulierung von photosynthetisch produzierter Glucose zur temporären oder langzeitigen Speicherung in Mesophyllvakuolen schließen. *AtTMT1* scheint dabei nicht nur eine

bedeutende Rolle bei der Steuerung des Zuckerhaushaltes auf der Mesophyllzellebene, sondern für den gesamten pflanzlichen Organismus zu spielen (Wingenter et al., 2010). So fanden Wingenter und Mitarbeiter (2010) zudem heraus, dass in *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen die Zuckertransportrate im Phloem und die Expression des phloemlokalisierten Saccharosesymporters *AtSUC2*, der für die Beladung des Phloems mit Saccharose verantwortlich ist, erhöht sind. Es lag daher nahe zu postulieren, dass das schnellere Wachstum und der größere Samenertrag von *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen auf einen veränderten Zuckermetabolismus zurückzuführen sind (Wingenter et al., 2010).

4.2 pH-abhängige Aktivität von *AtTMT1* und der V-ATPase

Im Einklang mit der Antiport-Funktionsweise konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von *AtTMT1*-Überexpressionslinien ferner demonstriert werden, dass bei Wegnahme der protonengekoppelten Triebkraft (i) die Protonentransportkapazität erniedrigt ist und (ii) ein alleiniger Glucosegradient den Antiport von Protonen antreiben kann (Kap. 3.3.2, Abb. 3.3). Bis dato wurden zwei weitere molekular identifizierte vakuolärer Zuckertransporter *AtSUC4* aus *Arabidopsis* und *LjSUT4* aus *Lotus Japonicus* hinsichtlich ihrer pH-abhängigen Transportaktivität untersucht (Weise et al., 2000; Reinders et al., 2008). Die Analysen zu *LjSUT4* konnten im Oozytensystem durchgeführt werden, da *LjSUT4* wahrscheinlich aufgrund einer Mislokalisierung in der Plasmamembran von Oozyten aktiv war (Reinders et al., 2008). *LjSUT4* wurde dabei als potentieller Saccharose/Protonen-Symporter identifiziert, der wahrscheinlich Saccharose aus dem Vakuolenlumen in das Zytosol transportiert (Reinders et al., 2008). Hinsichtlich der pH-abhängigen Transportaktivität wurde für *LjSUT4* eine gesteigerte Protonentransportrate mit zunehmendem Protonengradienten beschrieben, was im Einklang mit den hier ermittelten Transportkapazitäten von *AtTMT1* steht. Bei einem intrazellulären pH-Wert der Oozyten von ca. pH 7,5 wurden dabei die höchsten saccharoseinduzierten Protonenströme für *LjSUT4* bei einem extrazellulären pH-Wert von 5,0 und die niedrigsten bei einem pH-Wert von 6,3 beobachtet (Boorer et al., 1994; Reinders et al., 2008).

Die Studien zur pH-abhängigen Aktivität von *AtSUC4* wurden in Hefezellen durchgeführt (Weise et al., 2000). In Analogie zur Plasmamembranlokalisierung von

LjSUT4 in Oozyten waren auch *AtSUC4*-Transporter aufgrund einer Mislokalisierung in der Plasmamembran von Hefezellen aktiv und wurden dort als putative Saccharose/Protonen-Symporter charakterisiert (Weise et al., 2000; Endler et al., 2006). Maximale Transportraten wurden im Zuge dieser Studien bei einem externen pH-Wert von 4-5 ermittelt (Weise et al., 2000). Im Vergleich dazu wurde bei einem externen pH-Wert von etwa 6 ein geringerer *AtSUC4*-vermittelter Saccharosetransport beobachtet (Weise et al., 2000). Da Hefezellen üblicherweise einen internen pH-Wert von ~ 5.8 aufweisen, stehen diese Ergebnisse ebenfalls im Einklang mit den in dieser Arbeit ermittelten pH-abhängigen Transportraten von *AtTMT1/2*, da für beide Transporter (i) die höchste Transportaktivität bei einer Differenz von ca. 2 pH-Einheiten beobachtet wurde und (ii) nach Wegnahme des pH-Gradienten der Zuckergradient als alleinige Triebkraft ausreichend war, um einen erniedrigten Zuckertransport zu initiieren (Conway und Downey, 1950).

Weitere Studien hinsichtlich der pH-abhängigen Transportaktivität sind zudem für einige plasmamembranständige Zuckertransporter wie *ZmSUT1*, *AtSUC1*, *StSUT1*, *AtSTP1*, *AtINT4* und *AtSUC9* durchgeführt worden (Boorer et al., 1994; Boorer et al., 1996; Zhou et al., 1997; Carpaneto et al., 2005; Sivitz et al., 2005; Schneider et al., 2006; Sivitz et al., 2007). Diese Zuckertransporter wurden nach Expression in *Xenopus* Oozyten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik als Zucker/Protonen-Symporter identifiziert und zeigten mit Ausnahme von *AtSUC9* mit zunehmenden in die Oozyten gerichteten pH-Gradienten erhöhte Aktivitäten. Üblicherweise wurden dabei die höchsten zuckerinduzierten Protonenströme bei einem externen pH-Wert von ungefähr 4,5-5,5 ermittelt, was wiederum die Notwendigkeit eines Protonengradienten als Energiequelle für eine optimale Leistungsfähigkeit protonengekoppelter Zuckertransporter untermauert. Zudem wurden unter anderem bei den Untersuchungen von *AtSTP1*, *AtSUC1* und *AtINT4* auch noch zuckerinduzierte Protonenströme bei nahezu symmetrischen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{Oozyte}}=7.5$, $\text{pH}_{\text{extern}}=7,5-8$) beobachtet. Diese Ergebnisse stützen zusätzlich die für *AtSUC4* und *AtTMT1/2* erfolgten Beobachtungen (Kap. 3.3.2, Abb. 3.3; Weise et al., 2000), dass ein Zuckergradient alleine den Sym- oder Antiport von Protonen in Abwesenheit eines Protonengradienten – wenn auch weniger effizient – antreiben kann.

Diese Erkenntnisse zur pH-abhängigen Transportaktivität von sekundär aktiven Zuckertransportern schlagen eine sensible pH-regulierte Funktionalität von H⁺-gekoppelten Zuckertransportern unabhängig von ihrer Lokalisation vor, wobei ein thermodynamisch günstiger pH-Gradient essentiell für eine optimale Leistung der protonengekoppelten Zuckertransporter zu sein scheint. Der über den Tonoplasten anliegende pH-Gradient wird durch die V-PP_iase und die V-ATPase generiert und aufrechterhalten. Mittels Patch-Clamp-Studien wurde gezeigt, dass die V-ATPase deutlich höhere Pumpströme als die V-PP_iase sowohl in Vakuolen von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) als auch in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* aufzeigt und somit hauptverantwortlich für die Etablierung des pH-Gradienten zu sein scheint (Hedrich und Schroeder, 1989; Krebs et al., 2010). Da die Aktivität von sekundär aktiven Transportern in der Vakuolenmembran mit der Translokation von Protonen in das Zytosol einhergeht, ist anzunehmen, dass die V-ATPase die veränderten zytosolischen und luminalen Protonenkonzentrationen wahrnimmt und entsprechend reagiert, um einen thermodynamisch günstigen pH-Gradienten aufrechtzuerhalten. Infolgedessen sollte die Aktivität der V-ATPase in Analogie zu den Zuckertransportern pH-reguliert sein. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktionsweise der V-ATPase unter symmetrischen pH-Bedingungen mit $\text{pH}_{\text{zyt}} 5,5$ und $\text{pH}_{\text{vak}} 5,5$ mittels Patch-Clamp-Analysen untersucht. Die dabei erzielten Resultate zusammen mit den umfassenden Daten von Florian Rienmüller (Universität Würzburg) stützen nun die pH-abhängige Funktion der V-ATPase. Dabei wird offenbar über den zytosolischen pH-Wert kontrolliert, welchen Effekt vakuoläre pH-Veränderungen letztendlich auf die V-ATPase-Funktion haben (Rienmüller et al., 2012). Zudem scheinen Veränderungen im pH-Wert auf beiden Seiten der Vakuolenmembran von der ATPase zur jeweils anderen Seite transferiert zu werden. Diese Ergebnisse (Rienmüller et al., 2012) demonstrieren, dass die V-ATPase (i) Änderungen in den Protonenkonzentrationen auf luminaler, aber vor allem auf zytosolischer Seite registrieren, die z.B. durch die Aktivität von H⁺-gekoppelten Zuckertransportern herbeigeführt werden, und (ii) ihre Aktivität entsprechend anpassen, um einen Protonengradienten für eine optimale Funktion sekundär aktiver Transporter bereitstellen zu können.

4.3 Anwesenheit weiterer Glucose/Protonen-Antiporter

In den Experimenten unter physiologischem pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{zyt}} 7,5/\text{pH}_{\text{vak}} 5,5$) zeigten Vakuolen der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante geringe glucoseinduzierte Restströme, die auf die Aktivität wenigstens eines weiteren Glucose/Protonen-Antiporters hinweisen (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2c). Diese Ansicht wird von den Beobachtungen von Wormit und Mitarbeitern (2006) gestützt. Die Autoren demonstrierten, dass die Glucoseaufnahme in Vakuolen der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante höher war als in mit Phlorizin behandelten Wildtypvakuolen. Phlorizin, ist ein bekannter Inhibitor von vielen Monosaccharidtransportern (Ehrenkranz et al., 2005; Wormit et al., 2006), und sollte somit auch *AtTMT1/2* an der Glucosetranslokation in die Vakuole hindern. Eine verminderte Glucoseaufnahme in den Inhibitor-behandelten Wildtypvakuolen im Vergleich zu den unbehandelten *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten deutet folglich auf wenigstens einen weiteren vakuolären Glucoseantiporter hin. Neben *AtTMT1/2* wurde bisher *AtVGT1* als vakuolärer Monosaccharidtransporter auf molekularer Ebene identifiziert (Aluri und Büttner, 2007). Mittels Aufnahmestudien mit radioaktivmarkierter Glucose und Fructose in Hefezellvakuolen wurde *AtVGT1* als potentieller protonengekoppelter Glucose- sowie Fructosetransporter beschrieben, der für die Beladung von Vakuolen mit diesen beiden Monosacchariden verantwortlich sein kann (Aluri und Büttner, 2007). Da die entsprechenden Aufnahmestudien an isolierten Hefevakuolen durchgeführt worden sind, fehlt allerdings noch ein eindeutiger Beweis des Transportmodus von *AtVGT1* *in planta*. Aluri und Büttner (2007) konnten zudem zeigen, dass *AtVGT1* in *Arabidopsis*-Vakuolen lokalisiert ist und in allen oberirdischen Geweben, mit höchster Expression in Blüten und Pollen, vorkommt. Nach diesen Beobachtungen wurden *AtVGT1*-Transporter demzufolge für die gemessenen glucoseinduzierten Protonen-Transportaktivitäten in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante in der vorliegenden Arbeit in Betracht gezogen (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2). Diese Annahme wurde jedoch mittels Patch-Clamp-Ergebnissen widerlegt, die von Vakuolen einer Vierfachdeletionsmutante *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2* erzielt wurden (Kap. 3.3.3, Abb. 3.4). So konnte bei einem Vergleich der glucoseinduzierten Ströme in den beiden Verlustmutanten *Attmt1/tmt2* und *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2* kein Unterschied in den glucoseinduzierten Stromdichten ermittelt werden, obwohl zur

Stimulation von Protonenströmen eine höhere zytosolische Glucosekonzentration (125 mM) eingesetzt wurde, um potentielle Unterschiede zwischen den beiden Verlustmutanten besser auflösen zu können. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass (i) die H⁺-gekoppelte Aktivität der AtVGTs in Mesophyllvakuolen zu gering ist, um sie mittels Patch-Clamp-Analysen detektieren zu können, und (ii) AtVGT1 und/oder AtVGT2 damit keine wesentliche Antiportfunktion zur vakuolären Glucosebeladung in diesem Gewebe ausüben. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass die AtVGT1-Verlustmutanten vor allem Beeinträchtigungen in Entwicklungsprozessen aufwiesen (Aluri und Büttner, 2007). So zeigten die Verlustmutanten eine verzögerte Blütenausbildung und partielle Fehlfunktionen bei der Samenkeimung (Aluri und Büttner, 2007). Beide physiologischen Phänomene/Beeinträchtigungen sprechen dafür, dass AtVGT1 in Blättern nur eine untergeordnete Rolle zukommt. Dies ist ferner im Einklang mit Expressionsanalysen, die lediglich eine geringe Expression von AtVGT1 in Blättern aufdeckten (Aluri und Büttner, 2007). Zusammenfassend schlagen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Resultate folglich vor, dass wenigstens ein weiterer Glucose/Protonen-Antiporter in Mesophyllvakuolen aktiv ist, dessen molekulare Identität es allerdings noch gilt zu identifizieren.

4.4 Vakuoläre Zuckertransporter mit geringer Affinität

Etwa fünffach höhere Protonenstromdichten in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante wurden bei einer zytosolischen Glucosekonzentration von 125 mM im Vergleich zu 50 mM Glucose aufgezeichnet. Dies lässt vermuten, dass die Transportaktivität dieser/dieses unbekanntem Transporter(s) durch die zytosolische Glucosekonzentration bzw. den Glucosegradienten beeinflusst wird. Bei Wildtypvakuolen wurden gleichermaßen erhöhte Stromantworten auf eine Stimulation mit 125 mM Glucose gegenüber 50 mM Glucose registriert. Somit waren die Stromantworten in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante im Vergleich zum Wildtyp unter Verwendung beider stimulierenden zytosolischen Glucosekonzentration um ca. 70% reduziert (Kap. 3.3.1 & 3.3.3, Abb. 3.2 & 3.4). AtTMT1/2 kann somit eindeutig als hauptverantwortlicher Glucose/Protonen-Antiporter in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis thaliana* angesehen werden. Zudem scheint der Glucosegradient als

regulatorisches Element der Transportaktivität vakuolärer Glucoseantiporter zu fungieren. Eine genauere Untersuchung der Abhängigkeit der vakuolären Glucosetransporter-Aktivität vom Glucosegradienten offenbarte eine lineare Abnahme der induzierten Protonenströme mit stufenweiser Reduktion der zytosolischen Glucosekonzentrationen (125-20 mM) bei Abwesenheit von luminaler Glucose (Kap. 3.3.4, Abb. 3.5c). Dieses lineare Verhalten der Protonenströme in diesem Konzentrationsbereich deutet darauf hin, dass vakuoläre Glucosetransporter in *Arabidopsis* Mesophyllzellen, einschließlich *AtTMT1/2*, eine geringe Affinität und hohe Transportkapazität für Glucose aufweisen. Da in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung der Transportaktivität auftrat und somit keine Michaelis-Menten-Kinetik vorlag, konnten der K_m -Wert und die maximale Transportkapazität (v_{max}) nicht bestimmt werden. Ein solches Verhalten wurde für vakuoläre protonengekoppelte Zuckertransporter, die auf molekularer Ebene identifiziert wurden, bisher nicht beschrieben. Vielmehr zeigten diese in der Regel ein sättigendes Verhalten, das mit einer Michaelis-Menten-Kinetik und den damit abgeleiteten K_m -Werte beschrieben werden konnte (Weise et al., 2000; Sauer, 2007; Aluri und Büttner, 2007; Büttner, 2007; Reinders et al., 2008). So wurde für *LjSUT4* bei einem externen pH-Wert von 5,0 ein K_m -Wert von 12,9 mM Saccharose, für *AtSUT4* bei einem externen pH-Wert von 5,5 ein K_m -Wert von 11,6 mM Saccharose, für *StSUT4* bei einem externen pH-Wert von 4 ein K_m -Wert von 6 mM Saccharose und für *AtVGT1* ein K_m -Wert von 3,7 mM Glucose bestimmt (Weise et al., 2000; Aluri und Büttner, 2007; Reinders et al., 2008). Folglich besitzen *LjSUT4*, *AtSUT4*, *StSUT4* und *AtVGT1* in Analogie zu *AtTMT1/2* ebenfalls geringe Affinitäten für Saccharose bzw. Glucose (Weise et al., 2000; Aluri und Büttner, 2007; Reinders et al., 2008). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine geringe Affinität für diese Zucker eine allgemeine Eigenschaft vakuolärer Zuckertransporter darstellt.

4.5 *AtVIK1*-abhängiger *AtTMT1*-vermittelter Glucose-transport

Bis dato wurde für einige molekular identifizierte plasmamembranständige Pumpen, Transporter und Kanäle eine Regulation der Aktivität über den Phosphorylierungs/Dephosphorylierungszustand gezeigt. Dazu zählen unter anderem der Kalium-

kanal AKT1 (Geiger et al., 2009), der Anionenkanal SLAC1 (Geiger et al., 2009, 2011), der Natriumtransporter SOS1 (Quintero et al., 2011) und die „P-type“ H⁺-ATPase (Fuglsang et al., 2007). Darüber hinaus wurden solche posttranslationale Modifikationen als Regulationsmechanismus auch für plasmamembranständige Saccharosetransporter aus der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) beschrieben (Roblin et al., 1998; Williams et al., 2000). Die drei vakuolären *AtTMT*-Proteine enthalten viele putative Phosphorylierungsstellen, die in dem typischen großen hydrophilen Loop der *AtTMTs* lokalisiert sind (Abb. 4.1; Wormit et al., 2006; Wingenter et al., 2011; Schulze et al., 2011). Bis vor kurzem waren jedoch keine Proteinkinasen bekannt, die physikalisch oder funktionell mit bestimmten vakuolären Transportproteinen interagieren (Wingenter et al., 2011). Einen ersten Hinweis auf eine mögliche *in vivo* Interaktion von *AtTMT1* mit der mitogenaktivierten Proteinkinase *AtVIK1* lieferte eine proteomische Analyse von Whiteman et al. (2008), die *AtVIK1* in der Tonoplastenfraktion von *Arabidopsis* Blättern identifizierte (Whiteman et al., 2008). Wingenter und Mitarbeiter (2011) konnten nun erstmals die Proteinkinase *AtVIK1* als potentiellen *AtTMT1*-Bindungspartner identifizieren. Hinweise hierfür lieferten die Beobachtungen, dass *AtTMT1* und *AtVIK1* in Blättern stark exprimiert und durch externe Zucker sowie abiotische Stressfaktoren hochreguliert werden (Wormit et al., 2006; Wingenter et al., 2011).

Eine physikalische Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* in der Vakuolenmembran konnte nun in der vorliegenden Arbeit mittels der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC) verifiziert werden. Dies gelang durch die Koexpression von Split-YFP-markierten *AtTMT1* und *AtVIK1*, welche in einem BIFC-Signal resultierte, das eindeutig der Vakuolenmembran zu zuordnen war (Kap. 3.3.6, Abb. 3.7b & d). Zudem wurde die Spezifität dieser Interaktion unter Verwendung einer weiteren Kinase aus der mitogenaktivierten Proteinkinasefamilie *AtMEKK1* bestätigt. Die Koexpression von Split-YFP-markierten *AtTMT1* und *AtMEKK1* führte zu einer schwachen BIFC-Fluoreszenz in Protoplasten, die jedoch nicht in freigesetzten Vakuolen zu detektieren war (Kap. 3.3.6, Abb. 3.7e & f). Bei der beobachteten BIFC-Fluoreszenz in Protoplasten handelte es sich daher um eine schwache physikalische unspezifische Interaktion, die auf die Überexpression und der daraus entstandenen extrem hohen Dichte der rekombinanten Proteine zurückzuführen war.

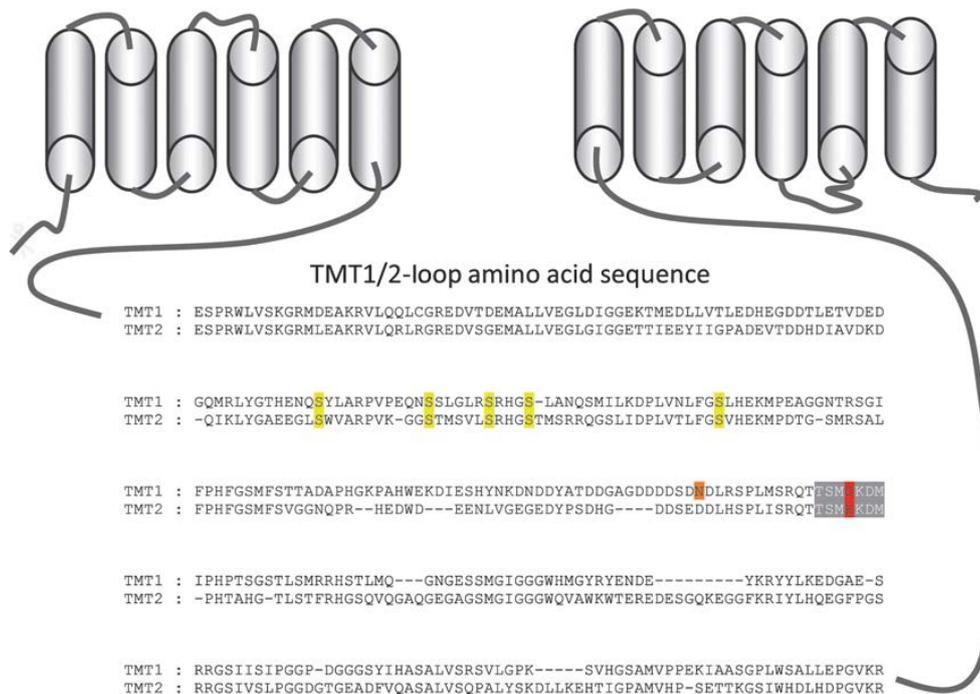


Abbildung 4.1. Schematisches Topologie-Modell von TMT1/2-Transportern (aus Schulze et al., 2011). Die Aminosäuresequenz zwischen den transmembranen Domänen 6 und 7 von *AtTMT1/2* ist dargestellt. Phosphorylierungsstellen, die von Endler und Mitarbeitern (2009) in dem Loop des TMT1/2-Homologs *HvSTP1* identifiziert wurden, sind gelb markiert. Phosphorylierungsstellen, die von Schulze und Mitarbeitern (2011) entdeckt wurden, sind rot gekennzeichnet. Das entsprechende Peptid wird in grau angezeigt. Eine weitere Phosphorylierungsstelle (orange) in *AtTMT1* wurde von Whiteman et al. (2008b) identifiziert.

Bei Zerstörung der Plasmamembran konnten die MEKK1-Kinasen aufgrund der geringen Affinität zu *AtTMT1* in die Lösung übergehen, was mit einer Dissoziation der YFP-Fragmente einher ging und die Abwesenheit eines spezifischen BIFC-Signals erklärte. Diese Beobachtungen bekräftigen die spezifische physikalische Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* im Tonoplasten von lebenden Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana*. Mittels eines Phosphorylierungsassay mit dem rekombinanten *AtTMT1*-Loop und *AtVIK1* erbrachten Wingenter und Mitarbeiter (2011) zudem den Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1*. Dabei konnten die Autoren aufzeigen, dass *AtTMT1* als Substrat für *AtVIK1* fungiert und ein Austausch negativ geladener Aminosäuren (Aspartat) durch neutrale Aminosäuren (Asparagin) in der Mitte des hydrophilen Loops von *AtTMT1* zu verminderter physikalischer und funktioneller Interaktion führt (Abb. 4.1; Wingenter et al., 2011). Weiterhin konnten Wingenter et al. (2011) über Aufnahmestudien mit

radioaktiv markierter Glucose nachweisen, dass *AtVIK1* die Glucoseaufnahme in isolierte Vakuolen stimuliert, was auf eine positive Regulation der *AtTMT1*-Aktivität durch *AtVIK1* schließen lässt. Detaillierte Analysen der physiologischen Eigenschaften der *vik*-Verlustmutanten offenbarten zudem, dass *AtVIK1*, ähnlich zu *AtTMT1/2*, eine wichtige Rolle in der intrazellulären Zuckerverteilung und Homöostase spielt (Wingenter et al., 2011). Dies wird durch Beobachtungen gestützt, dass *vik*-Verlustmutanten in Analogie zu *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten (i) in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen sowie unter Kältestress eine verminderte Glucoseakkumulation in Blattvakuolen aufweisen und (ii) in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen ein reduziertes Wachstum zeigen (Wingenter et al., 2011).

4.6 Beteiligung des Glucose/Protonen-Symporter *AtERDL6* am Glucoseexport aus der Vakuole

Die Gruppe der *AtERD6*-ähnlichen Gene, die 48-95% Ähnlichkeit untereinander aufweisen, ist innerhalb der Monosaccharidtransporter-ähnlichen Familie bisher am wenigsten untersucht (Büttner, 2007). Die *AtERD6*-ähnlichen Gene weisen eine hohe Homologie zu putativen Zuckertransportern aus *Beta vulgaris* und interessanterweise ebenso eine erwähnenswerte Homologie zur tierischen GLUT (Glucose transporter)-Familie auf (Büttner, 2007). Da die tierischen Glucosetransporter als Uniporter fungieren, könnten die Mitglieder der *AtERD6*-ähnlichen Familie somit ebenfalls eine erleichterte Diffusion von Zuckern vermitteln (Büttner, 2007). Bisher wurde die große Mehrheit der Mono- sowie Dissaccharidtransporter, die auf molekularer Ebene identifiziert und funktionell untersucht wurden, jedoch als H⁺-gekoppelte Sym- oder Antiporter unabhängig von ihrer Lokalisation beschrieben (Kühn et al., 1999; Büttner und Sauer, 2000; Büttner, 2007; Sauer, 2007; Slewinski, 2011). Vor kurzem wurde allerdings ein Mitglied aus der SWEET-Familie *AtSWEET1* – v.a. aufgrund einer pH-unabhängigen Aktivität- als Uniporter für Glucose identifiziert (Chen et al., 2010). Darüber hinaus wurde mit *AtESL1* (ERD six-like 1) ein erster Kandidat aus der *AtERD6*-like Familie als potentieller vakuolärer Uniporter für Monosaccharide identifiziert (Yamada et al., 2010). Für den funktionellen Nachweis stellten Yamada und Mitarbeitern (2010) eine transgene BY-2-Tabakzelllinie her, in der *AtESL1* nach

gezielten Mutationen in einem N-terminalen Motiv in der Plasmamembran vorlag. Unter Verwendung dieser Zellen führten die Autoren anschließend Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glucose durch. Im Rahmen dessen wurde keine veränderte Transportaktivität des mutierten *AtESL1* bei Wegnahme des Protonengradienten mit Hilfe des Protonophores CCCP festgestellt (Yamada et al., 2010). Aufgrund des gezielt veränderten Targetings von *AtESL1* sowie der heterologen Expression in BY-2 Zellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der natürliche Transportmechanismus sowie die Spezifität des Transporters verändert wurden. Folglich muss ein Beweis für die Transportform von *AtESL1* in seiner natürlichen Umgebung, der pflanzlichen Vakuole, noch erbracht werden.

Neben *AtESL1* wurde kürzlich mit *AtERDL6* ein weiteres Mitglied der *AtERD6*-ähnlichen Familie als tonoplastidärer Transporter identifiziert. Studien zur Verteilung von Glucose in Blättern von Wildtyppflanzen, zweier *AtERDL6*-Verlustmutanten und einer *AtERDL6*-Überexpressionslinie deuteten bei *AtERDL6* auf eine Exportfunktion von Glucose aus der Vakuole hin (Poschet et al., 2011). Dabei zeigten beide *AtERDL6*-Verlustmutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen erhöhte Glucosekonzentrationen in den Vakuolen, während die *AtERDL6*-Überexpressionslinie verminderte Glucosekonzentrationen in den Vakuolen aufwies (Poschet et al., 2011). Ein direkter Nachweis für den Transportmechanismus von *AtERDL6* konnte von Poschet und Mitarbeitern (2011) jedoch nicht erbracht werden. Diese Lücke konnte nun in der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, indem Patch-Clamp-Experimente in der „whole-vacuole“-Konfiguration an isolierten *Arabidopsis* Mesophyllvakuolen aus *Attmt1/tmt2*- und *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutanten durchgeführt wurden. Die *Attmt1/tmt2*-Mutanten wurden als Kontrollen bzw. als Hintergrund für die Deletion von *AtERDL6* verwendet, um bei der Untersuchung glucoseinduzierter Ströme eine Interferenz mit dem dominanten Glucose/Protonen-Antiporter *AtTMT1/2* zu vermeiden (Kap. 4.1). Da *AtERDL6* als Exporter beschrieben wurde und im Falle einer H⁺-gekoppelten Aktivität damit als Symporter fungieren sollte, wurden die Experimente in Analogie zu Schneider et al. (2008) unter inversen pH-Gradienten durchgeführt (Kap. 3.3.7, Abb. 3.8a). Dies hatte den Vorteil, dass experimentell sowohl der Glucosegradient als auch der pH-Gradient in die Vakuole gerichtet waren, und dadurch die natürliche Transportrichtung des potentiellen Symporters gemäß der thermodynamischen Gesetze umgekehrt wurde (Carpaneto et al., 2005; Schneider

et al., 2008; Schulz et al., 2011). Im Einklang mit einer Glucose/Protonen-Symportaktivität zeigten beide Verlustmutanten glucosestimulierte Protonenströme in das Vakuolenlumen (Kap. 3.3.7, Abb. 3.8b & c). Interessanterweise waren die in der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante induzierten Protonenströme im Vergleich zu der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante um ca. 50% reduziert, was auf die fehlende Aktivität des ERD16-Proteins in der Dreifachmutante zurückgeführt werden kann. Demzufolge legt dieses Ergebnis nahe, dass *AtERD16* als H⁺-gekoppelter Glucosesymporter arbeitet und unter physiologischen pH-Bedingungen den Export von Glucose aus der Vakuole vermittelt. Dies steht vollkommen im Einklang mit den bereits angesprochenen Ergebnissen von Pochet und Mitarbeitern (2011) hinsichtlich der veränderten Glucoseverteilung in Wildtyppflanzen im Vergleich zu *AtERD16*-Verlustmutanten und *AtERD16*-Überexpressionspflanzen und der davon abgeleiteten Exportfunktion von *AtERD16* (Poschet et al., 2011).

Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte sekundär aktive Transportmechanismus von *AtERD16* steht im Gegensatz zum potentiellen Uniportmechanismus von *ESL1* sowie zu früheren Vermutungen, dass Mitglieder der ERD6-ähnlichen Familie aufgrund ihrer moderaten Homologie zu den tierischen GLUT-Transportern als Uniporter operieren könnten (Büttner, 2007; Yamada et al., 2011). Unter der Annahme, dass der von Yamada und Mitarbeitern (2010) ermittelte Uniportmechanismus von *AtESL1* zutreffend ist, könnte somit davon ausgegangen werden, dass die Mitglieder der ERD6-ähnlichen Familie durchaus verschiedene Transportmechanismen – wie Uniport, Symport und möglicherweise auch Antiport - aufweisen können. In diesem Zusammenhang könnte daher spekuliert werden, ob die beobachteten Restaktivitäten in den *Attmt1/tmt2*- bzw. *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten möglicherweise von einem Glucose/Protonen-Antiporter vermittelt werden, der der ERD6-ähnlichen Familie angehören könnte (Kap. 3.3.1 & 3.3.3, Abb. 3.2 & 3.4). Die in der *Aterdl6/tmt1/tmt2*-Verlustmutante auftretenden glucoseinduzierten Protonenströme in das Vakuolenlumen deuten ferner an, dass noch wenigstens ein weiterer Glucose/Protonen-Symporter im Tonoplasten lokalisiert ist, der für den Export von Glucose in das Zytosol verantwortlich ist (Kap. 3.3.7, Abb. 3.8c). Mögliche Kandidaten könnten auch in diesem Fall aus der ERD6-ähnlichen Familie stammen.

4.7 Konzentrationsabhängige vakuoläre Saccharose/Protonen-Antiportaktivität

Saccharose ist die Haupttransportform von Kohlenstoff in vielen Pflanzenspezies und wird sowohl in Source- als auch in Sink-Geweben in hohen Konzentrationen in Vakuolen gespeichert (Echeverria et al., 1997; Reinders et al., 2008). Dies eröffnet die Frage nach putativen Saccharosetransportern, die für die Beladung der Vakuolen mit Saccharose verantwortlich sind. Seit längerem wurde für die Saccharoseaufnahme in Vakuolen ein sekundär aktiver Transportmechanismus vorgeschlagen (Getz und Klein, 1995). In der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmalig mittels Patch-Clamp-Untersuchungen, die Anwesenheit und Funktion einer Saccharose/Protonen-Antiportaktivität in isolierten Mesophyllvakuolen aus *Arabidopsis thaliana* direkt experimentell nachzuweisen (Kap. 3.4.1, Abb. 3.9). Die Antiportfunktion konnte dabei aufgrund saccharosestimulierter Protonenströme in das Zytosol erfasst werden. Dies ist übereinstimmend mit Experimenten von Diana Beyhl (Universität Würzburg), in denen Wildtypvakuolen unter physiologischen pH-Bedingungen ebenfalls in das Zytosol gerichtete Protonenströme als Antwort auf die Applikation von Saccharose aufwiesen (Schulz et al., 2011). Interessanterweise induzierte Saccharose sogar unter einem inversen pH-Gradienten, also einer Bedingung, die eine Saccharose/Protonen-Symportaktivität thermodynamisch begünstigt (siehe Ausführungen zu *AtERD16*, Kap. 4.6), immer noch Protonenströme in das Zytosol. Dies deutet auf eine sehr dominante H⁺-gekoppelte Saccharose-Antiportaktivität hin, die eine potentiell schwache Saccharose/Protonen-Symporteraktivität überlagert (Schneider et al., 2008; Schulz et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnten ähnlich zum Verhalten von glucoseinduzierten Strömen in Wildtypvakuolen (Kap. 3.3.4, Abb. 3.5c) zudem erhöhte Stromantworten auf die Applikation von 125 mM Saccharose im Vergleich zur Applikation von 50 mM Saccharose beobachtet werden (Kap. 3.4.1, Abb. 3.9a & b). Dies deutet an, dass in Analogie zu den Glucose/Protonen-Antiportern, einschließlich *AtTMT1/2*, auch die Aktivität des/der unbekanntenen Saccharose/Protonen-Antiporter durch den Saccharosegradienten beeinflusst wird.

4.8 *AtTMT1/2*-vermittelter Transport von Saccharose

Die Identifizierung der molekularen Natur des Saccharose/Protonen-Antiporters in *A. thaliana* Mesophyllvakuolen gelang in der vorliegenden Arbeit zum einen aufgrund der Beobachtung, dass die absoluten durchschnittlichen Stromantworten von Wildtypvakuolen auf die Stimulation mit 50 mM Saccharose ($\Delta I/C_m = -0,25$ pA/pF) und 50 mM Glucose ($\Delta I/C_m = -0,35$ pA/pA) sehr nahe beieinander lagen. Zum anderen wurde vor kurzem ein plasmamembranständiger Transporter in dem pathogenen Pilz *Ustilago maydis* entdeckt, der sowohl eine moderate Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Monosaccharidtransporterfamilie aufweist als auch die Fähigkeit zum Saccharose-transport besitzt (Wahl et al., 2010). Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass (i) möglicherweise ein einziger Transporter mit der Fähigkeit ausgestattet ist, sowohl Glucose als auch Saccharose zu transportieren, und (ii) *AtTMT1/2* aufgrund seiner dominanten Glucose/Protonen-Antiporterfunktion in Mesophyllvakuolen diese Doppelfunktion ausübt. Die daraufhin hier durchgeführten funktionellen Patch-Clamp-Untersuchungen an Wildtyppflanzen, *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen und *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten konnten schließlich diese Annahme bestätigen. So riefen erstens beide Zucker ins Zytosol gerichtete Protonenströme mit ähnlichen Amplituden in Wildtypvakuolen hervor. Zweitens wiesen die glucose- und saccharoseinduzierten Ströme eine nahezu identische Reduktion der Stromantworten in Vakuolen der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten im Vergleich zu Wildtyp- und *AtTMT1*-Überexpressionspflanzen auf (Kap. 3.4.2, Abb. 3.10 c.). Hervorzuheben ist dabei, dass die sukzessive Applikation von Glucose und Saccharose in einer Vakuole immer Stromantworten mit ähnlichen Amplituden hervorrief, unabhängig von der untersuchten Pflanzenpopulation (Kap. 3.4.2, Abb. 3.10b & Abb. 3.11.). Diese Resultate belegen, dass unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen sowohl Glucose als auch Saccharose als Substrate für *AtTMT1* und/oder *AtTMT2* für einen H⁺-gekoppelten Antiport über die vakuoläre Membran von *Arabidopsis* Mesophyllzellen in Frage kommen. Weiterhin deuten die saccharoseinduzierten Restströme in der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutante auf die Anwesenheit von mindestens einen weiteren H⁺-gekoppelten Saccharoseantiporter hin. Es darf spekuliert werden, inwieweit die unter Kapitel 4.5 beschriebene Proteinkinase *AtVIK1* oder andere unbekannte Regulationsfaktoren die Präferenz/Affinität von *AtTMT1/2* für Glucose

oder Saccharose in bestimmten Entwicklungsstadien oder unter wechselnden Umwelteinflüssen gezielt ansteuern können. Unter diesem Aspekt kann diskutiert werden, ob der große hydrophile Loop zwischen den Membrandomänen 6 und 7 von *AtTMT1/2* (Abb. 4.1) als charakteristische Funktionseinheit fungiert, die *AtTMT1/2* befähigt, sowohl Monosaccharide als auch Disaccharide zu transportieren. Es ist zumindest auffällig, dass *AtTMT1/2* mit diesem außergewöhnlich großen zytosolischen Loop als bisher einziger Zuckertransporter diese Fähigkeit aufweist. Zudem wurde ja bereits aufgrund der physikalisch und funktionellen Interaktion mit *AtVIK1* gezeigt, dass der Loop als regulatorische Funktionseinheit von *AtTMT1/2* fungiert (Kap. 4.5; Wingenter et al., 2011). Bei der Auswahl der Zucker könnten dabei Phosphorylierung und Dephosphorylierung der putativen Phosphorylierungsstellen eine regulatorische Rolle zukommen (Kap. 4.5, Abb. 4.1).

4.9 Funktion von *AtSUC4* als Saccharose/Protonen-Symporter *in planta*

Bis auf *AtSUC4* sind die funktionellen Mitglieder der Saccharosetransporterfamilie in *Arabidopsis* als plasmamembranständige H^+ -gekoppelte Saccharose-Symporter beschrieben (Kap. 1.4.3; Sauer et al., 2007). Ausschließlich *AtSUC4* konnte in der Vakuolenmembran lokalisiert werden (Endler et al., 2006). Eine tonoplastidäre Lokalisation von SUC4-Transportern wurde darüber hinaus auch in anderen Pflanzenfamilien, den Kreuzblütengewächsen, Hülsenfrüchtlern und Süßgräsern nachgewiesen (Endler et al., 2006). Wenn *AtSUC4* aus *Arabidopsis*, *StSUT4* aus der Kartoffel, *HvSUT4* aus Gerste und *LjSUT4* aus *Lotus Japonicus* nun in Hefezellen (Weise et al., 2000; Weschke et al., 2000) und Froschoozyten (*Xenopus laevis*; Reinders et al., 2008) vermessen wurden, dann wurde – in Analogie zu den plasmamembranständigen Mitgliedern der Saccharosetransporterfamilie – ein Saccharose-Transport im Symport mit Protonen ermittelt. Diese Beobachtungen konnten allerdings nur gemacht werden, weil die SUC4-Transporter aufgrund einer Mislokalisierung nicht in der Vakuolenmembran, sondern in der Plasmamembran vorlagen. Die Ergebnisse ließen ferner vermuten, dass ein Saccharose/Protonen-Symportmechanismus eine universelle Eigenschaft der bisher bekannten Saccharosetransporter darstellt. Zu Beginn dieser Arbeit fehlte allerdings ein eindeutiger Beweis,

dass SUC4-Transporter auch in ihrer natürlichen Umgebung, der vakuolären Membran, als Symporter operieren. Zudem konnte bis dato in Wildtypvakuolen von *Arabidopsis* weder unter physiologischen noch unter inversen pH-Gradienten eine potentielle Saccharose/Protonen-Symportaktivität von *AtSUC4* aufgelöst werden (Kap. 3.4.1, Abb. 3.9; Kap. 4.7; Schulz et al., 2011). In Patch-Clamp-Experimenten mit einer *AtSUC4*-Verlustmutante *Atsuc4.1* konnten ebenso keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden und somit keine Aussagen über den Transportmechanismus von *AtSUC4* *in planta* getroffen werden (Schneider et al., 2011). Dies konnte zum einen auf die schwache Expression von *AtSUC4* in Source-Blättern von *Arabidopsis* und zum anderen auf die dominante Saccharose/Protonen-Antiportaktivität von *AtTMT1/2* zurückgeführt werden (Weise et al., 2000; Schneider et al., 2011; Schulz et al., 2011). Um nun die schwache Expression in Source-Blättern zu umgehen, führten Schneider und Mitarbeiter (2011) Patch-Clamp-Experimente mit Vakuolen aus stabilen *AtSUC4*-Überexpressionslinien im Wildtyp-Hintergrund durch (Schneider et al. 2011). In diesen Studien zeigten zumindest schon 63% der getesteten Vakuolen unter inversen pH-Bedingungen eine SUC4-vermittelte Saccharose/Protonen-Symportaktivität (Schneider et al., 2011). In den restlichen 37% der untersuchten Vakuolen wurde immer noch eine dominante Antiportaktivität ermittelt, die wohl hauptsächlich *AtTMT1/2* zuzuordnen ist (Kap. 3.4.2, Abb. 3.10; Kap. 4.8; Schneider et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden nun *Attmt1/tmt2*- und *Attmt1/tm2/vgt1/vgt2*-Verlustmutanten nach transienter Überexpression von *AtSUC4* erfolgreich genutzt, um *AtSUC4* eindeutig als Saccharose/Protonen-Symporter *in planta* zu identifizieren. Die Auflösung des Transportmodus von *AtSUC4* war realisierbar, da durch den Einsatz der *Attmt1/tmt2*-Verlustmutanten die interferierende Saccharose/Protonen-Antiportaktivität, die größtenteils auf *AtTMT1/2* zurückzuführen war, stark vermindert war. In Analogie zur experimentellen Strategie bei der Charakterisierung von *AtERD16* unterstützte zudem der Einsatz eines inversen pH-Gradienten die Auflösung der saccharoseinduzierten Protonenströme in das Vakuolenlumen, die mit einer Symportaktivität von *AtSUC4* einhergingen (Kap. 3.4.3, Abb. 3.13 b). Verifiziert wurde dieses Resultat zusätzlich durch den Einsatz von Kontrollvakuolen, die *AtSUC4* nicht überexprimierten. Interessanterweise zeigten die Kontrollen negative Stromänderungen, die die in Kapitel 4.8 aufgestellte Hypothese bestätigen, dass

neben *AtTMT1/2* wenigstens ein weiterer Saccharose/Protonen-Antiporter in Mesophyllvakuolen aktiv ist (Kap. 3.4.3, Abb. 3.13b; Kap. 4.8). Der Symportmechanismus von *AtSUC4* schlägt unter Berücksichtigung der physiologischen pH-Bedingungen eine Saccharoseentlassung aus der Vakuole in das Zytosol vor. Ferner wird diese Exportfunktion von *AtSUC4* in *planta* durch weitere phänotypische Charakteristika der stabilen *AtSUC4*-Überexpressionslinie gestützt (Schneider et al., 2011). So wiesen Keimlinge aus *AtSUC4*-Überexpressionspflanzen einen um 30% verminderten Saccharosegehalt im Vergleich zum Wildtyp und der *Atsuc4.1*-Verlustmutante auf (Schneider et al., 2011). Da *AtSUC4* in Blättern nicht exprimiert wird (Schneider et al., 2011), stellt sich die Frage nach möglichen Kandidaten, die den Export von Saccharose aus Mesophyllvakuolen in Blättern vermitteln. Möglicherweise existieren in der ERD6-ähnlichen Familie Transporter, die Glucose und Saccharose - in Analogie zu *AtTMT1/2* - oder nur Saccharose transportieren. Zudem wurden kürzlich zwei plasmamembranständige Uniporter, *AtSWEET11* und *12*, identifiziert, die eine erleichterte Diffusion von Saccharose vermitteln. Somit könnten möglicherweise weitere Kandidaten aus der SWEET-Familie für Im- und Export von Saccharose in und aus der Vakuole verantwortlich sein. Erleichterte Diffusion von Saccharose über die Vakuolenmembran wurde bereits biochemisch unter Verwendung von isolierten Gerstenvakuolen demonstriert und ist bei einem in das Zytosol gerichteten Saccharosegradienten thermodynamisch günstig (Kaiser und Heber, 1984).

4.10 Anzahl und Umsatzrate von vakuolären Zuckersymportern und der V-ATPase

Die Applikation von Saccharose bzw. Glucose in Gegenwart eines geeigneten pH-Gradienten induziert Protonenströme, die durch die gegebene Transporterpopulation vermittelt werden (Kap. 3.3.1, Abb. 3.2; Kap. 3.4.3, Abb. 3.13; Carpaneto et al., 2005; Reinders et al., 2008). Um Aussagen über die Anzahl und der Umsatzrate der Transporter in einem Expressionssystem zu machen, ist eine aktuelle Studie über *ZmSUT1* hilfreich (Carpaneto et al., 2010). Diese Arbeit hat hierfür „pre-steady-state“-Ströme herangezogen. Diese Ströme basieren auf der Bewegung von Protonen, die in Abwesenheit von Saccharose zwischen der äußeren und inneren Seite der

Transmembrandomänen des Zucker/Protonen-Transporters stattfindet (Carpaneto et al., 2010). Als Antwort auf externe Saccharosestimulation können Protonen die Membran passieren und wandeln folglich „pre-steady-state“ Ströme in Transportströme um. Basierend auf Parametern für die „pre-steady-state Ströme“ wurde ein Umsatz von 500 Saccharosemolekülen pro Sekunde für *ZmSUT1* aus *Zea mays* berechnet (Carpaneto et al., 2010). Wird eine ähnliche Umsatzrate für *AtSUC4* und eine Saccharose/Protonen-Stöchiometrie von 1:1 angenommen, dann würde ein saccharoseinduzierter Protonenstrom von 40 pA in einer Vakuole mit einer Kapazität von 50 pF die Aktivität von 500.000 SUC4-Transportproteinen erfordern (Carpaneto et al., 2005). Um eine SUC4-vermittelte Translokation von Protonen in das Zytosol auszugleichen, wären folglich 2.500.000 Protonenpumpen mit einem Umsatz von rund 100 Protonen pro Sekunde erforderlich.

4.11 Koordination von vakuolären Transportprozessen unter verschiedenen Umwelteinflüssen

Vakuoläre H⁺-gekoppelte Zuckerantiporter und -symporter bedienen sich der derselben Energiequelle, dem Protonengradienten am Tonoplasten, um Zucker in entgegengesetzte Richtungen zu transportieren. Zudem existieren in der Vakuolenmembran noch weitere sekundär aktive Transporter wie z.B. der Natrium/H⁺-Antiporter *AtNHX1* oder der Nitrat/H⁺-Antiporter *AtCLCa*, die ebenfalls den Protonengradienten als Motor nutzen (Hirschi et al., 1996; De Angeli et al., 2006). Um die Energie, die von den vakuolären Protonenpumpen bereitgestellt wird, sinnvoll nutzen zu können, muss die Aktivität von Sym- und Antiportern präzise reguliert werden, d.h. während die Antiporter aktiv sind, sollten die Symporter abgeschaltet sein und umgekehrt. Zudem muss auch das Zusammenspiel der Antiporter bzw. Symporter untereinander koordiniert werden. Daraus schließt sich, dass Anzahl und/oder Aktivität der Sym- und Antiporter an zelluläre Gegebenheiten und Umwelteinflüsse in verschiedenen Entwicklungsstadien angepasst sein müssen. Diese Hypothese bestätigen neuere Erkenntnisse zu dem Glucoseantiporter *AtTMT1/2* und dem Glucosesymporter *AtERD16*. So zeigen diese Studien, dass *AtTMT1/2* unter Kältestress (9°C) zur Protektion der Pflanze mehr Glucose in der Vakuole akkumuliert, wohingegen *AtERD16* während Temperaturanstiege sowie unter

Hitzestress (32°C) vermehrt Glucose in das Zytosol zurücktransportiert (Wormit et al., 2006; Poschet et al., 2011). Unter Berücksichtigung, dass diese beiden Transporter in denselben Geweben und Zellen exprimiert sind, verdeutlichen diese Beobachtungen, dass der Protonengradient unter verschiedenen Gegebenheiten sinnvoll zum Transport genutzt wird und eine sensible Regulierung der Zuckertransporter vorhanden sein muss (Wormit et al., 2006; Poschet et al., 2011). Da diese beiden Transporter eine antagonistische Aufgabenteilung vorweisen, scheint eine Koppelung beider an den Protonengradienten und somit an die Aktivität der Protonenpumpen sinnvoll.

Weiterhin ermittelten Wormit et al. (2006) eine gesteigerte Expression von *TMT1* und *TMT2* unter Salzstressbedingungen in sieben Tage alten, auf Agarplatten angezogenen Keimlingen. In der vorliegenden Arbeit konnten zudem ca. vierfach erhöhte Transkriptzahlen für *TMT1* und *TMT2* in sechs Wochen alten Wildtyppflanzen ermittelt werden, die bei 22°C auf Erde im Kurztag unter Salzstressbedingungen angezogen wurden (Kap. 3.3.5, Abb. 3.6). In Analogie zeigte auch die V-ATPase-Untereinheit *VHA-a2* eine deutlich erhöhte Expression unter Salzstress (Kap. 3.3.5, Abb. 3.6). Die Korrelation der Expressionslevel von *TMT1/2* und *VHA-a2* deutet an, dass *AtTMT* unter Salzstressbedingungen vermehrt Glucose in die Vakuole transportiert und der erhöhte Energieverbrauch durch eine gesteigerte Aktivität der V-ATPase ausgeglichen wird. Diese Annahme wird zunächst auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Proteinkinase *AtVIK1*, die *AtTMT1* stimuliert, ebenfalls unter Salzstress hochreguliert wird (Wingenter et al., 2011). Es ist allerdings zu hinterfragen, inwieweit eine gesteigerte Glucose-/Saccharoseakkumulierung unter Salzstress tatsächlich Sinn macht. So ist bekannt, dass der Na^+/H^+ -Antiporter *AtNHX1* unter diesen Umständen vermehrt Natrium in die Vakuole abtransportiert und somit einen Beitrag zur Akkumulation von osmotisch aktiven Teilchen in der Vakuole leistet (Martinoia et al., 2007). Um ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Zytosol und Vakuolenlumen zu gewährleisten, wäre unter diesen Umweltbedingungen daher eher zu erwarten, dass organische Osmolyte wie Zucker durch anorganische Natriumsalze im Vakuolenlumen ersetzt werden. Folglich sollte die *AtTMT1/2*-vermittelte Zuckerakkumulierung unterdrückt und von der protonenmotorischen Kraft entkoppelt werden, während Zuckerentlassung aus der Vakuole und protonenabhängige *AtNHX1*-vermittelte Natriumaufnahme in die Vakuole gefördert

werden sollten. Bei der Diskussion dieser Argumentationskette müssen mehrere Aspekte in Betracht gezogen werden. Ein gesteigerter Transkriptgehalt kann/muss aber nicht zwangsläufig auch eine erhöhte Proteindichte widerspiegeln. D.h. ohne entsprechende Proteinanalysen, die leider im Falle von *AtTMT1/2* und *AtVIK1* nicht vorhanden sind (Wormit et al., 2006; Wingenter et al., 2010; Wingenter et al., 2011), kann von der Transkriptmenge nicht immer direkt auf die Transportfunktion geschlossen werden. Sollten *AtTMT1/2* und *AtVIK1* auf Proteinebene als Folge der erhöhten Transkriptmengen unter Salzstressbedingungen jedoch tatsächlich erhöht vorliegen, kann spekuliert werden, ob sich die Transportrichtung von *AtTMT1/2* eventuell umdreht, so dass Glucose und/oder Saccharose im Antiport aus der Vakuole gegen einen Protonengradienten heraustransportiert werden. Der Transport wäre thermodynamisch denkbar, da die hohen vakuolären Glucose- und Saccharosekonzentrationen in Ausnahmesituationen wie Salzstress einen Antiport gegen einen Protonengradienten antreiben könnten (Reinders et al., 2008; Slewinski, 2011). Dabei könnte zusätzlich *AtVIK1* als stimulierendes Element eine entscheidende positive Regulationsfunktion einnehmen. Tatsächlich wurde ein saccharoseinduzierter Protonenfluss gegen einen Protonengradienten für den plasmamembranständigen Saccharosetransporter *ZmSUT1* beobachtet. Dafür wurden Patch-Clamp Experimenten in der „inside-out“-Konfiguration mit 0,5 mM Saccharose und pH 5,6 in der Patchpipette (extrazellulärer Raum) sowie 50 mM Saccharose und pH 7,5 in der Badlösung (Zytosol) durchgeführt. Die zytosolische Appliation von 50 mM Saccharose induzierte unter diesen experimentellen Bedingungen Protonenströme in Richtung der Patchpipette (extrazellulär) (Carpaneto et al., 2005). Eine stufenweise Erhöhung der zytosolischen Saccharosekonzentration bis zu 500 mM resultierte zudem in größer werdenden Protonenströmen. Diese Beobachtung verdeutlicht somit den Einfluss des Zuckergradienten als Triebkraft auf die Transportaktivität von *ZmSUT1* (Carpaneto et al., 2005). Ein saccharosegetriebener Protonenfluss gegen einen Protonengradienten konnte von Diana Beyhl (Universität Würzburg) zudem für den Saccharose/Protonen-Antiport in *Arabidopsis thaliana* Wildtypvakuolen beobachtet werden (Schulz et al., 2011). Dabei induzierte eine zytosolische Applikation von 50 mM Saccharose unter inversen pH-Bedingungen ($\text{pH}_{\text{vak}} 7,5$, $\text{pH}_{\text{zyt}} 5,5$) Protonenströme in das Zytosol, also folglich in Richtung der höheren Protonendichte (Schulz et al., 2011). Diese Beobachtungen stützen also die Hypothese, dass

AtTMT1/2 aus thermodynamischer Sicht als perfekt funktionierende Maschine den Export von Glucose/Saccharose in Richtung der höheren Protonenkonzentration aus der Vakuole bewerkstelligen könnte. Zudem würde ein *AtTMT1/2*-vermittelter Zuckerexport aus der Vakuole im Antiportmechanismus unter Salzstressbedingungen eine Anreicherung von Protonen im Vakuolenlumen liefern, die gleichzeitig wieder zur Energetisierung des $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporters *AtNHX1* beitragen würde, was einen zusätzlichen thermodynamischen Vorteil bringen würde. Hier scheint ein komplexes zelluläres Kommunikationsnetzwerk zu existieren, dessen Erforschung eine der spannenden Fragen der Pflanzenforschung der nächsten Jahre darstellt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zum Zuckertransport über die Vakuolenmembran von *Arabidopsis thaliana* sowie dessen Energetisierung durch die V-ATPase erlangt werden. Hierfür wurden Patch-Clamp-Experimente konzipiert, die eine direkte Erfassung der Transportmechanismen, Transporteigenschaften sowie Triebkräfte des vakuolären Zuckertransportes ermöglichten. Zusätzlich wurden Lokalisations- und Interaktionsstudien zu ausgewählten Transportern mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie durchgeführt. Im Einzelnen wurden folgende Aspekte hinsichtlich des pflanzlichen Zuckertransports und dessen Energetisierung bearbeitet.

Mittels der Patch-Clamp-Technik konnten vakuoläre glucose- und saccharose-induzierte Protonen-Transportkapazitäten in Mesophyllvakuolen von Wildtyp-pflanzen aufgelöst werden, die eindeutig einen Antiportmechanismus für beide Zucker zur Beladung der Vakuole vorschlagen. Dabei zeigten die Glucose- und Saccharoseantiporter eine geringe Affinität und hohe Transportkapazität für den jeweiligen Zucker. Auf molekularer Ebene konnte die protonengekoppelte Glucose- und Saccharoseaufnahme in die Vakuolen maßgeblich dem putativen Monosaccharidtransporter *AtTMT1/2* zugeordnet werden, der folglich als erster Glucose-Saccharose/Protonen-Antiporter identifiziert wurde. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden der Zucker- und der pH-Gradient als Triebkräfte der Zuckertransportaktivität herausgearbeitet. In diesem Zusammenhang konnte ferner ein Beitrag zur quantitativen Charakterisierung der V-ATPase geleistet werden, welche den Einfluss der V-ATPase aufgrund ihrer pH-abhängigen H⁺-Pumpaktivität auf die pH-Homöostase belegt. Demzufolge scheint die V-ATPase als pH-regulierter Energielieferant für die Zuckertransporter zu fungieren. Darüber hinaus wurde die mitogenaktivierte Proteinkinase *AtVIK1* als potentieller Regulationsfaktor von *AtTMT1* identifiziert. Dies gelang durch den Nachweis einer spezifischen physikalischen Interaktion zwischen *AtTMT1* und *AtVIK1* mittels der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation. Neben der *AtTMT1/2*-vermittelten Aufnahme der beiden Zucker Glucose und Saccharose wurde ebenso die Zuckerentlassung aus der Vakuole näher charakterisiert. Mit Hilfe vergleichender Patch-Clamp-Analysen von verschiedenen Zuckertransporter-Verlustmutanten konnte *AtERD16* als Glucose/Protonen-Symporter identifiziert werden, der sich für den Glucoseexport aus der Vakuole

verantwortlich zeigt. In Bezug auf den Saccharosetransport aus der Vakuole konnte erstmals die Saccharose/Protonen-Symportfunktion von *AtSUC4 in planta* nach dessen transienter Überexpression in Zuckertransporter-Verlustmutanten eindeutig aufgelöst und nachgewiesen werden. Desweiteren offenbarten die hier erlangten Ergebnisse bezüglich der Glucose/Saccharose-Beladung und -Entladung von Mesophyllvakuolen, dass weitere protonengekoppelte Zuckertransporter, neben *AtTMT1/2* and *AtERD16*, in diesem Zelltyp existieren, deren molekulare Natur es jedoch noch gilt herauszufinden.

6. Summary

This work provides new insights into the sugar transport across the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana* and its energization by the V-ATPase. For this, patch-clamp experiments were specifically designed enabling low-resolution current recordings for the direct detection and characterization of the transport mechanisms, transport properties and driving forces of the vacuolar sugar transport. In addition, localization and interaction studies on selected transporters have been performed by using the confocal laser scanning microscopy. In particular, following aspects of plant sugar transport and its energization were studied.

In patch-clamp experiments on mesophyll vacuoles of wild type plants, prominent glucose- and sucrose-induced proton transport capacities were resolved, which could be clearly related to an antiport mechanism used for loading the vacuole with both sugars. Thereby, the vacuolar glucose and sucrose antiporter showed a low-affinity and a high transport-capacity for the respective sugar. On the molecular level, the proton-coupled uptake of both sugars, glucose and sucrose, into the vacuole could be mainly associated with the putative monosaccharide transporter *AtTMT1/2*, which was consequently identified as the first glucose-sucrose/proton-antiporter. In the course of these studies, the sugar- and the pH-gradient were revealed as driving forces of the sugar transport activity. In this context, a contribution was made to a quantitative characterization of the V-ATPase that proved the influence of the V-ATPase on the pH homeostasis based on the pH dependency of the H⁺-pump activity. Hence, the V-ATPase seems to function as a pH-regulated energy source for the sugar transporters. Moreover, a specific physical interaction between *AtTMT1* and the mitogen-activated protein kinase *AtVIK1* was detected via bimolecular fluorescence complementation assays identifying *AtVIK1* as a potential regulatory factor of *AtTMT1*. Beside the *AtTMT1/2*-mediated glucose and sucrose uptake into the vacuole, the sugar release from the vacuole was also characterized. By means of comparative patch-clamp studies on mutants lacking different sugar transporters, *AtERD16* was identified as glucose/proton symporter and appears to be responsible for glucose export from the vacuole. Concerning the export of sucrose out of the vacuole, for the first time direct evidence for the sucrose/proton symport function of *AtSUC4* *in planta* was provided after its transient overexpression in certain sugar-transporter knockout lines. Furthermore, the studies on wild type and sugar-transporter

knockout lines regarding vacuolar glucose/sucrose loading and unloading also revealed that in addition to *AtTMT1/2* and *AtERD16* further proton-coupled sugar transporters - of yet unknown molecular identity - must be present in mesophyll cells.

7. Anhang

7.1 *Arabidopsis thaliana* Mutanten und Vektoren

7.1.1 Mutanten

Die *AtTMT1*-Überexpressionslinie und die *Attmt1/tmt2*- Verlustmutante wurden freundlicherweise von Prof. Ekkehard Neuhaus, Universität Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt. Die *Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2*- Verlustmutante sowie die *Attmt1/tmt2/erdl6*-Verlustmutante haben wir dankenswerterweise von Dr. Michael Büttner, Universität Heidelberg, erhalten. Alle Mutanten wurden im Ecotyp Columbia-0 Hintergrund hergestellt.

Linie	Referenz
<i>AtTMT1</i> -Überexpressionslinie	Wingenter et al., 2010
<i>Attmt1/tmt2</i> -Verlustmutante	Wormit et al., 2006
<i>Attmt1/tmt2/vgt1/vgt2</i> -Verlustmutante	Schulz et al., 2011
<i>Aterdl6/tmt1/tmt</i> -Verlustmutante	Wormit et al., 2010, Pochet et al., 2011

7.1.2 Vektoren

***TMT1::YFP^{NT}*, *VIK1::YFP^{CT}* und *MEKK1::YFP^{CT}*:**

Als Klonierungsmethode wurde die USER™ Methode (New England Biolabs) nach Nour-Eldin et al. (2006) angewandt. Für die Interaktionsstudien zu *AtTMT1*, *AtVIK1* und *AtMEKK1* wurden von Dietmar Geiger (Universität Würzburg) freundlicherweise folgende BIFC-Vektoren auf Basis des pSAT2191 Vektors hergestellt:

pSAT2191 #18 N-terminale Hälfte des YFP downstream der USER-Kassette

pSAT2191 #20 C-terminale Hälfte des YFP downstream der USER-Kassette

Die Vektoren enthielten doppelte 35S Promotoren und 35S Terminatoren für eine effiziente Transkription und Expression, sowie ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion der transformierten *Escherichia coli* Bakterien. *AtTMT1* wurde in den Vektor pSAT2191 #20, *AtVIK1* und *AtMEKK1* wurden in den Vektor pSAT2191 #18 kloniert. Die YFP-Hälften wurden mit den C-terminalen Enden von *AtTMT1*, *AtVIK1* und *AtMEKK1* fusioniert.

***AtSUC4*-GFP:**

Das *AtSUC4*-GFP Fusionsprotein wurde von Dr. Sabine Schneider, Universität Erlangen, konstruiert. Das Herstellungsverfahren ist in Schneider et al. (2011) und Schulz et al. (2011) detailliert beschrieben. Das GFP wurde am C-terminalen Ende von *AtSUC4* angehängt.

7.2 Literaturverzeichnis

- Allen, G.J., Sanders, D., 1996. Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *The Plant journal* 10, 1055–69.
- Aluri, S., Büttner, M., 2007. Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2537–42.
- Baud, S., Wuillème, S., Lemoine, R., Kronenberger, J., Caboche, M., Lepiniec, L., Rochat, C., 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *The Plant journal* 43, 824–36.
- Bechtold, U., Rabbani, N., Mullineaux, P.M., Thornalley, P.J., 2009. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in *Arabidopsis* leaves. *The Plant journal* 59, 661–71.
- Bertl, A., Andersont, J.A., Slayman, C.L., Gabert, R.F., 1995. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of Kat1, an inward-rectifying K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogeneous yeast channels and carriers. *Plant biology* 92, 2701–2705.
- Beyhl, D., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Farmer, E.E., Fromm, J., Marten, I., Hedrich, R., 2009. The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *The Plant journal* 58, 715–23.
- Bhat, R. A., Lahaye, T., Panstruga, R., 2006. The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant methods* 2, 12.
- Boorer, K.J., Loo, D.D., Frommer, W.B., Wright, E.M., 1996. Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose cotransporter StSUT1. *The Journal of biological chemistry* 271, 25139–44.
- Boorer, K.J., Loo, D.D., Wright, E.M., 1994. Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus oocytes*. *The Journal of biological chemistry* 269, 20417–24.
- Braun, D.M., 2012. SWEET! The pathway is complete. *Science* 335, 173–174.
- Bush, D.R., 1990. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant physiology* 93, 1590–6.
- Büttner, M., 2007. The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS letters* 581, 2318–24.

- Büttner, M., 2010. The Arabidopsis sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant biology* 12 Suppl 1, 35–41.
- Büttner, M., Sauer, N., 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et biophysica acta* 1465, 263–74.
- Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., Hedrich, R., 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *The Journal of biological chemistry* 280, 21437–43.
- Carpaneto, A., Koepsell, H., Bamberg, E., Hedrich, R., Geiger, D., 2010. Sucrose- and H-dependent charge movements associated with the gating of sucrose transporter ZmSUT1. *PloS one* 5, 10.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., Raikhel, N.V., 2004. The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant cell* 16, 3285–3303.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B., 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–32.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., Frommer, W.B., 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–11.
- Cho, M.-H., Lim, H., Shin, D.H., Jeon, J.-S., Bhoo, S.H., Park, Y.-I., Hahn, T.-R., 2010. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in Arabidopsis thaliana. *The New phytologist* 6, 101–112.
- Conway, E.J., Downey, M., 1950. pH values of the yeast cell. *The Biochemical journal* 47, 355–60.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., López-Sanjurjo, E.J., Reski, R., Kuchitsu, K., Müller, T.D., Becker, D., Schönknecht, G., Hedrich, R., 2011. A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. *The Plant cell* 23, 2696–707.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., Barbier-Brygoo, H., 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442, 939–42.
- Echeverria, E., Gonzalez, P.C., Brune, A., 1997. Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells. *Physiologia Plantarum* 101, 291–300.

- Ehrenkranz, J.R.L., Lewis, N.G., Kahn, C.R., Roth, J., 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews* 21, 31–8.
- Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M. A., Traub, M., Martinoia, E., Neuhaus, H.E., 2003. The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11122–6.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E., Schmidt, U.G., 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis mesophyll* cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant physiology* 141, 196–207.
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., 2001. Developmental transition between sucrose uptake and sucrose efflux systems in the vacuole of red beet hypocotyl cells. *Hort Science* 36, 1300–1301.
- Feuerstein, A., Niedermeier, M., Bauer, K., Engelmann, S., Hoth, S., Stadler, R., Sauer, N., 2010. Expression of the *AtSUC1* gene in the female gametophyte, and ecotype-specific expression differences in male reproductive organs. *Plant biology* 12 Suppl 1, 105–14.
- Frigerio, L., Hinz, G., Robinson, D.G., 2008. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 1564–70.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T. A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K. A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., Zhu, J.-K., 2007. *Arabidopsis* protein kinase *PKS5* inhibits the plasma membrane H^+ -ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *The Plant cell* 19, 1617–34.
- Geiger, D., 2011. Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Molecular plant* 4, 395–406.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K. A. S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T., Hedrich, R., 2011. Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel *SLAH3* and the receptor *RCAR1*. *Science signaling* 4, ra32.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A. S., Romeis, T., Hedrich, R., 2009. 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* 106, 21425–30.
- Geisler, M., Axelsen, K.B., Harper, J.F., Palmgren, M.G., 2000. Molecular aspects of higher plant P-type $Ca(2+)$ -ATPases. *Biochimica et biophysica acta* 1465, 52–78.

- Getz, H.P., Klein, M., 1995. Characteristics of sucrose transport and sucrose-induced H⁺-transport on the tonoplast of red beet (*Beta vulgaris* L.) Storage Tissue. *Plant physiology* 107, 459–467.
- Gottwald, J.R., Krysan, P.J., Young, J.C., Evert, R.F., Sussman, M.R., 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13979–84.
- Hedrich, R., Flügge, U.I., Fernandez, J.M., 1986. Patch-clamp studies of ion transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Letters* 204.
- Hedrich, R., Marten, I., 2011. TPC1-SV channels gain shape. *Molecular plant* 4, 428–41.
- Hedrich, R., Marten, I., Lohse, G., Dietrich, P., Winter, H., Lohaus, G., Heldt, H.-W., 1994. Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. *The Plant Journal* 6, 741–748.
- Hedrich R., Neher E., 1987. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 329, 833–836.
- Hedrich, R., Schroeder, J.I., 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 539–569.
- Hirschi, K.D., Zhen, R., Cunningham, K.W., Rea, P.A., Fink, G.R., 1996. CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Plant biology* 93, 8782–8786.
- Hoth, S., Niedermeier, M., Feuerstein, A., Hornig, J., Sauer, N., 2010. An ABA-responsive element in the *AtSUC1* promoter is involved in the regulation of *AtSUC1* expression. *Planta* 232, 911–23.
- Ivashikina, N., Hedrich, R., 2005. K⁺ currents through SV-type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels. *The Plant journal* 41, 606–14.
- Jauh, G., Phillips, T., Rogers, J., 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *The Plant cell* 11, 1867–82.
- Kaiser, G., Heber, U., 1984. Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* 161, 562–568.
- Kerppola, T.K., 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BIFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37, 465–487.
- Klepek, Y., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-arsivaud, L., 2005. *Arabidopsis* polyol transporter5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant cell* 17, 204–218.

- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 47, 509–540.
- Kovermann, P., Meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., Martinoia, E., 2007. The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. The Plant journal 52, 1169–80.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R., Schumacher, K., 2010. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 3251–6.
- Kunz, H.H., Häusler, R.E., Fettke, J., Herbst, K., Niewiadomski, P., Gierth, M., Bell, K., Steup, M., Flügge, U.-I., Schneider, A., 2010. The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana mutants impaired in starch biosynthesis. Plant biology 12 Suppl 1, 115–28.
- Kühn, C., 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. Plant Biology 5, 215–232.
- Kühn, C., Barker, L., Bürkle, L., Frommer, W.B., 1999. Update on sucrose transport in higher plants. Journal of Experimental Botany 50, 935–953.
- Lalonde, S., Wipf, D., Frommer, W.B., 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. Annual review of plant biology 55, 341–72.
- Lu, Y.P., Li, Z.S., Drozdowicz, Y.M., Hortensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P. A., 1998. AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. The Plant cell 10, 267–82.
- MAPK-Group, 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends in Plant Science 7, 301–308.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N., 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. Archives of biochemistry and biophysics 471, 146–58.
- Martinoia, E., Kaiser G., Schramm, M.J., Heber, U., 1987. Sugar transport across the plasmalemma and the tonoplast of barley mesophyll protoplasts. Evidence for different transport systems. Journal of Plant Physiology 131, 467–478
- Martinoia, E., Maeshima, M., Neuhaus, H.E., 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. Journal of experimental botany 58, 83–102.

- Martinoia, E., Massonneau, A., Frangne, N., 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant & cell physiology* 41, 1175–86.
- Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A., Nagy, R., 2012. Vacuolar Transporters in Their Physiological Context. *Annual review of plant biology* 63:27.1–27.31.
- Marty, F., 1999. Plant vacuoles. *The Plant cell* 11, 587–599.
- Meyer, S., Melzer, M., Truernit, E., Hümmer, C., Besenbeck, R., Stadler, R., Sauer, N., 2000. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant journal* 24, 869–82.
- Meyer, S., Scholz-Starke, J., De Angeli, A., Kovermann, P., Burla, B., Gambale, F., Martinoia, E., 2011. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant journal* 67, 247–57.
- Neuhaus, H.E., 2007. Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS letters* 581, 2223–6.
- Nour-Eldin, H.H., Hansen, B.G., Nørholm, M.H.H., Jensen, J.K., Halkier, B. A., 2006. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic acids research* 34, e122.
- Numberger, M., Draguhn A., 1996. Patch-Clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford
- Poschet, G., Hannich, B., Büttner, M., 2010. Identification and characterization of AtSTP14, a novel galactose transporter from Arabidopsis. *Plant & cell physiology* 51, 1571–80.
- Poschet, G., Hannich, B., Raab, S., Jungkunz, I., Klemens, P. A. W., Krueger, S., Neuhaus, E., Büttner, M., 2011. A novel arabidopsis vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects composition of seed storage compounds. *Plant physiology* 157, 1664–76.
- Quintero, F.J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.-Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.-J., Zhu, J.-K., Pardo, J.M., 2011. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2611–6.
- Rausch, T., 1991. The hexose transporters at the plasma membrane and the tonoplast of higher plants. *Physiologia Plantarum* 82, 134–142.
- Reinders, A., Panshyshyn, J. A., Ward, J.M., 2005. Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *The Journal of biological chemistry* 280, 1594–602.

- Reinders, A., Sivitz, A.B., Starker, C.G., Gantt, J.S., Ward, J.M., 2008. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant molecular biology* 68, 289–99.
- Rienmüller, F., Dreyer, I., Schönknecht, G., Schulz, A., Schumacher, K., Nagy, R., Martinoia, E., Marten, I., Hedrich, R., 2012. Luminal and cytosolic pH feedback on proton pump activity and ATP affinity of V-type ATPase from *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* 287, 8986–93.
- Roblin, G., Sakr, S., Bonmort, J., Delrot, S., 1998. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS letters* 424, 165–8.
- Sauer, N., 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* 581, 2309–17.
- Sauer, N., Ludwig, A., Knoblauch, A., Rothe, P., Gahrtz, M., Klebl, F., 2004. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *The Plant journal* 40, 120–30.
- Sauer, N., Stolz, J., 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* 6, 67–77.
- Schneider, S., Beyhl, D., Hedrich, R., Sauer, N., 2008. Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol. *The Plant cell* 20, 1073–87.
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., Schmitt, B., Batz, S., Wolf, S., Hedrich, R., Sauer, N., 2011. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant biology* 14, 325–36.
- Schneider, S., Schneidereit, A., Konrad, K.R., Hajirezaei, M., Gramann, M., Hedrich, R., Sauer, N., *Pflanzenphysiologie*, M., 2006. *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high-affinity H⁺-symport of myoinositol across the plasma membrane. *Plant physiology* 141, 565–577.
- Schneider, S., Schneidereit, A., Udvardi, P., Hammes, U., Gramann, M., Dietrich, P., Sauer, N., 2007. *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER2 mediates H⁺-symport of different inositol epimers and derivatives across the plasma membrane. *Plant physiology* 145, 1395–407.
- Schneidereit, A., Imlau, A., Sauer, N., 2008. Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the *Arabidopsis thaliana* SUCROSE TRANSPORTER 2 gene. *Planta* 228, 651–62.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N., Hedrich, R., 2011. Proton-driven sucrose symport and

- antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant journal* 68, 129–136.
- Schulze, W.X., Reinders, A., Ward, J., Lalonde, S., Frommer, W.B., 2003. Interactions between co-expressed Arabidopsis sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC biochemistry* 4, 3.
- Schulze, W.X., Schneider, T., Starck, S., Martinoia, E., Trentmann, O., 2011. Cold acclimation induces changes in Arabidopsis tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *The Plant journal* 69, 529–41.
- Servaites, J.C., 2002. Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *Journal of Experimental Botany* 53, 1581–1591.
- Sivitz, A.B., Reinders, A., Johnson, M.E., Krentz, A.D., Grof, C.P.L., Perroux, J.M., Ward, J.M., 2007. Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant physiology* 143, 188–98.
- Sivitz, A.B., Reinders, A., Ward, J.M., 2005. Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant & cell physiology* 46, 1666–73.
- Sivitz, A.B., Reinders, A., Ward, J.M., 2008. Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant physiology* 147, 92–100.
- Slewinski, T.L., 2011. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Molecular plant* 4, 641–62.
- Srivastava, A.C., Ganesan, S., Ismail, I.O., Ayre, B.G., 2008. Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant physiology* 148, 200–11.
- Stadler, R., Sauer, N., 1996. The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* 109, 299–306.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., Sauer, N., 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. *The Plant journal* 19, 269–78.
- Taiz, L., 1992. The plant vacuole. *The Journal of experimental biology* 172, 113–122.
- Thom, M., Komor, E., 1984. H⁺-sugar antiport as the mechanism of sugar uptake by sugarcane vacuoles. *FEBS letters* 173, 1–4.

- Van Bel, a. J.E., 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* 26, 125–149.
- Voelker, C., Gomez-Porras, J.L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., Dreyer, I., 2010. Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants - a puzzle still to be solved. *Plant biology* 12 Suppl 1, 56–63.
- Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J., Sauer, N., 2010. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS biology* 8, 11.
- Ward, J.M., Schroeder, J.I., 1994. Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *The Plant cell* 6, 669–683.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., Hebbeker, U., Flügge, U.I., 2000. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant cell* 12, 787–802.
- Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B., Ward, J.M., 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant cell* 12, 1345–55.
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H., Wobus, U., 2000. Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant journal* 21, 455–67.
- Whiteman, S.-A., Serazetdinova, L., Jones, A.M.E., Sanders, D., Rathjen, J., Peck, S.C., Maathuis, F.J.M., 2008. Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 8, 3536–47.
- Williams, L.E., Lemoine, R., Sauer, N., 2000. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science* 5, 283–90.
- Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I.I., Heyer, A.G., Marten, I., Hedrich, R., Neuhaus, H.E., 2010. Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 154, 665–77.
- Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I.I., Heyer, A.G., Reinders, J., Schulz, A., Geiger, D., Hedrich, R., Neuhaus, H.E., 2011. A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant journal* 68, 890–900.
- Wink, M., 1993. The plant vacuole: a multifunctional compartment. *Journal of experimental botany* 44, 231–246.

- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E., Neuhaus, H.E., 2006. Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant cell* 18, 3476–90.
- Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2010. Functional analysis of an Arabidopsis thaliana abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *The Journal of biological chemistry* 285, 1138–46.
- Yamauchi, Y., Ejiri, Y., Tanaka, K., 2002. Glycation by ascorbic acid causes loss of activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its increased susceptibility to proteases. *Plant & cell physiology* 43, 1334–41.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Sheen, J., 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols* 2, 1565–72.
- Zhou, J.-J., Theodoulou, F., Sauer, N., Sanders, D., Miller, A.J., 1997. A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an Arabidopsis H⁺/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Membrane Biol.* 159, 113–125.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Symplastischer und apoplastischer Transportweg von Saccharose von Source zu Sink, sowie Speicherung von Saccharose, Glucose und Fructose in den Vakuolen von Sink-Gewebe.....	8
Abbildung 1.2. Phylogenetischer Stammbaum der SWEET-Genfamilie verschiedener Spezies.....	10
Abbildung 1.3. Phylogenetischer Stammbaum der Monosaccharidtransporter - ähnlichen Genfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i> mit den Atg-Nummern der Gene.....	12
Abbildung 1.4. Phylogenetischer Stammbaum für bestätigte oder putative Saccharose-transportersequenzen.....	14
Abbildung 2.1. Skizzierung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen.....	19
Abbildung 2.2. Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers.....	22
Abbildung 2.3. Äquilibrierung des Vakuolenlumens mit der Pipettenlösung nach Einstellung der „whole-vacuole“-Konfiguration.....	26
Abbildung 2.4. Gleichmäßige und schnelle Perfusion einer Vakuole mittels einer mit Lucifer Yellow beladenen Applikationspipette.....	28
Abbildung 2.5. Funktionsprinzip der BIFC-YFP Methode.....	34
Abbildung 3.1. ATP-abhängige Aktivierung von V-ATPase-vermittelten Protonenströmen in Mesophyllvakuolen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyppflanzen: Kinetik der V-ATPase unter symmetrischem pH-Wert 5,5 im Zytosol und Vakuolenlumen.....	42
Abbildung 3.2. Messung glucoseinduzierter Protonenströme über die gesamte Membran von <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllvakuolen von Wildtyppflanzen und <i>AtTMT1/2</i> -Mutanten unter physiologischen pH-Bedingungen.....	45
Abbildung 3.3. pH-Abhängigkeit glucoseinduzierter Protonenströme in Mesophyllvakuolen von <i>AtTMT1</i> -Überexpressionspflanzen.....	47
Abbildung 3.4. Der Beitrag von <i>AtTMT1/TMT2</i> und <i>AtVGT1/VGT2</i> am protonengekoppelten Glucosetransport in Mesophyllvakuolen.....	49
Abbildung 3.5. Abhängigkeit glucoseinduzierter Protonenströme von der zytosolischen Glucosekonzentration.....	51

Abbildung 3.6. Expression von <i>TMT1/TMT2</i> und <i>VHA-a2</i> nach Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyppflanzen unter Salzstressbedingunge.....	53
Abbildung 3.7. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) zwischen <i>AtTMT1</i> und <i>AtVIK1</i>	55
Abbildung 3.8. Glucoseinduzierte Protonenströme in der <i>Attmt1/tmt2</i> - und der <i>Aterdl6/tmt1/tmt2</i> -Verlustmutante unter inversen pH-Bedingungen.....	57
Abbildung 3.9. Saccharoseinduzierte Protonenströme in Wildtypvakuolen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Mesophyllzellen.....	59
Abbildung 3.10. Charakterisierung glucose- und saccharoseinduzierter Protonenströme in Mesophyllvakuolen von Wildtyppflanzen (WT)- und <i>AtTMT1/2</i> -Mutanten.....	61
Abbildung 3.11. Vergleich saccharose- und glucoseinduzierter Protonenströme in den einzelnen Pflanzenpopulationen.....	62
Abbildung 3.12. Subzelluläre Lokalisation des <i>AtSUC4</i> -GFP-Fusionsproteins.....	64
Abbildung 3.13. Funktionelle Charakterisierung des Saccharosetransportes von Vakuolen aus <i>Attmt/vgt</i> -Verlustmutanten, die <i>AtSUC4</i> überexprimieren.....	65
Abbildung 4.1. Schematisches Topologie-Modell von <i>TMT1/2</i> -Transportern.....	76

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Silber
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BIFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CCCP	Carbonylcyanid-Dichlor-Phenylhydrazon
Cl ⁻	Chlorid-Ion
C _m	Membrankapazität
d.h.	das heißt
e ⁻	Elektron
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ⁺	Proton
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
I	Strom
K ⁺	Kalium-Ion
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minuten
mm	Millimeter
mosm	Milliosmol
mV	Millivolt
nm	Nanometer
P (P _i)	Phosphat
pA	Pikoampere
pF	Pikofarad
PP _i	Pyrophosphat
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
t	Zeit
Tab	Tabelle
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
vak	vakuolär
v.a.	vor allem
V _m	Membranpotential
w/v	weight/volume
WT	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (engl. Yellow fluorescing protein)
z.B.	zum Beispiel
zyt	zytosolisch
π	Osmotischer Druck
%	Prozent

7.5 Publikationen

- Rienmüller, F., Dreyer, I., Schönknecht, G., **Schulz, A.**, Schumacher, K., Nagy, R., Martinoia, E., Marten, I., Hedrich, R., 2012. Luminal and cytosolic pH feedback on proton pump activity and ATP affinity of V-type ATPase from Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 287, 8986–93.
- Schneider, S., Hulpke, S., **Schulz, A.**, Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., Schmitt, B., Batz, S., Wolf, S., Hedrich, R., Sauer, N., 2011. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant biology* 14, 325–36.
- Schulz, A.**, Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N., Hedrich, R., 2011. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant journal* 68, 129–136.
- Shirakashi, R., Reuss, R., **Schulz, A.**, Sukhorukov, V.L., Zimmermann, U., 2009. Evaluation of FEM electric field analysis using the electric properties of giant unilamellar vesicles (GUV) and Jurkat cells measured by electrorotation spectroscopy: Introduction of cryo- and lyoprotectants by electrofusion of GUVs and living cells. *Heat Transfer-Asian Research* 38, 168–182.
- Shirakashi, R., Reuss, R., **Schulz, A.**, Sukhorukov, V.L., Zimmermann, U., 2011. Effects of a pulse electric field on electrofusion of giant unilamellar vesicle (GUV) – Jurkat cell (Measurement of fusion ratio and electric field analysis of pulsed GUV – Jurkat cell. *Transactions of the japan society of mechanical engineers, Series B* 77, 777, 1269-1278
- Wingenter, K., **Schulz, A.**, Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I.I., Heyer, A.G., Marten, I., Hedrich, R., Neuhaus, H.E., 2010. Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant physiology* 154, 665–77.
- Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I.I., Heyer, A.G., Reinders, J., **Schulz, A.**, Geiger, D., Hedrich, R., Neuhaus, H.E., 2011. A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant journal* 68, 890–900.

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Christopher Schulz

Geburtsdatum: 17.07.1981

Geburtsort: Würzburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1988-1990 Grundschule Lengfeld, Würzburg

1990-1992 Grundschule Hausen bei Würzburg

1992-2001 Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg

29.06.2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife.

Hochschulausbildung:

10/2002–02/2008 Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Vertiefung der Fächer Biotechnologie, Neurobiologie und Bioinformatik; Abschluss: sehr gut

06/2007–02/2008 Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Zimmermann mit dem Thema: „ Elektrische und osmotische Induktion der Kryotoleranz in Zellen durch Elektrofusion mit trehalosehaltigen Riesenliposomen“ am **Lehrstuhl für Biotechnologie** an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

05/2008 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation; seitdem wissenschaftlicher Mitarbeiter am **Lehrstuhl für Molekulare**

Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Hedrich

Posterpräsentation:

Schulz A., Marten I., Sauer N., Neuhaus E., Hedrich R. (2011)

„Molecular mechanism of electrogenic sugar transport in mesophyll cell vacuoles of
Arabidopsis thaliana“

Botanikertagung Berlin 2011

Vorträge:

1. International Retreat GK 1342 (2009, Pommersfelden)
2. Joint Symposium SFB with GK 1342 (2010, Pommersfelden)
3. Internationales Meeting im Rahmen der Forschergruppe FOR 1061
(2010, Kaiserslautern)

7.7 Danksagung

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Rainer Hedrich, dass er mir ermöglicht hat, meine Dissertation unter seiner Anleitung und unter den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen anfertigen zu können. Weiterhin bedanke ich mich für das interessante und spannende Thema, die Diskussionen und die Förderung meiner beruflichen Laufbahn.

Im Besonderen danke ich Prof. Dr. Irene Marten für die ausgezeichnete Betreuung, für ihre Geduld bei den unzähligen Diskussionen, für die vielen inspirierenden Ratschläge, für die Freiräume, die ein gezieltes selbständiges Arbeiten ermöglichten, und für die stete Unterstützung meiner Arbeit.

Hern Prof. Dr. Hermann Koepsell möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich danke Prof. Dr. Dietmar Geiger für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Meinen Eltern danke ich für die langjährige Unterstützung, die mein Studium und somit das Anfertigen meiner Dissertation erst ermöglichte.

Ich danke den Mitgliedern der Forschergruppe FOR 1061 für den inspirierenden wissenschaftlichen Austausch sowie die Bereitstellung von Pflanzenmaterial.

Einen großen Dank möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Miteinander aussprechen. Im Besonderen danke ich Joachim Rothenhöfer und seinen Gärtnern für die Anzucht der Pflanzen, der gesamten Werkstattcrew für die Herstellung und Reparatur diverser Apparaturen, Matthias Dziony und Karin Roth für die Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten und Dr. Christian Wiese für die sachkundige Beratung in Computerfragen.

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden weder weitere akademische Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Würzburg,

.....

Alexander Schulz