

**Vergleichende  
elektrophysiologische Untersuchungen  
zweier Saccharose/H<sup>+</sup>-Symporter,  
ZmSUT1 (*Zea mays*) und  
UmSrt1 (*Ustilago maydis*)**



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

Vorgelegt von

**Anke Wittek**

aus Wesel

Würzburg 2013

Eingereicht am: 25.11.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Koepsell

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Aufbau und Funktion der Leitbündel .....	1
1.1.1	Das Phloem .....	2
1.2	Langstreckentransport im Phloem.....	3
1.2.1	SUC als Haupttransportzucker im Phloem.....	4
1.2.2	SUC im Pflanzenstoffwechsel.....	5
1.2.3	Weitere Metabolite im Transportstrom des Phloems.....	8
1.3	Beladung des Phloems .....	9
1.3.1	Symplastische Phloembeladung .....	10
1.3.2	Apoplastische Phloembeladung .....	11
1.4	Entladung des Phloems .....	14
1.5	Transporter der MFS Familie.....	16
1.6	Pflanzliche SUC-Transporter .....	18
1.6.1	Einteilung pflanzlicher SUC-Transporter.....	19
1.7	ZmSUT1 .....	22
1.8	SUC-Transporter anderer Organismen .....	25
1.8.1	UmSRT1.....	26
1.9	Zielsetzung.....	32
2	Material und Methoden .....	34
2.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i> Bakterien .....	34
2.1.1	Anzucht der Bakterien .....	34
2.1.2	Herstellung von Bakterienstocklösungen .....	34
2.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien .....	35
2.1.4	Bakterien-Transformation und Selektion .....	35
2.1.5	Isolation der Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Bakterien .....	36
2.2	DNA-Techniken.....	36
2.2.1	Oligonucleotide.....	36
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	37
2.2.3	IVT-PCR.....	37
2.2.4	USER-Klonierungsverfahren.....	38

2.2.5	Aufreinigung einer PCR-Reaktion .....	41
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	41
2.2.7	DNA-Elution aus einem Agarose-Gel .....	42
2.2.8	Sequenzierung .....	43
2.3	RNA -Techniken .....	43
2.3.1	<i>In vitro</i> -Transkription (IVT).....	43
2.3.2	Analyse von RNA im Agarosegel .....	44
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren .....	45
2.4	Arbeiten mit Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	45
2.4.1	Operative Entnahme der Oozyten.....	46
2.4.2	Injektion von RNA in die Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	47
2.5	Elektrophysiologische Messungen .....	47
2.5.1	Konvention .....	47
2.5.2	Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik.....	47
2.5.3	Mess-Elektroden und Pipetten .....	50
2.5.4	Datenerfassung und Spannungspuls-Protokolle .....	50
2.5.5	Kapazitätsmessungen (Schmitt & Koepsell 2002) .....	52
2.5.6	Enzymaffinität - Ermittlung des $K_m$ -Wertes .....	54
2.5.7	Bestimmung des elektrochemischen Potentials.....	55
2.6	Computerprogramme .....	56
2.7	Messlösungen und Puffer .....	57
3	Ergebnisse .....	61
3.1	Vergleichende Analysen von ZmSUT1 und UmSrt1 .....	62
3.1.1	Funktionelle Expression von ZmSUT1 und UmSrt1 in <i>Xenopus</i> Oozyten ....	64
3.1.2	Ermittlung der Substratabhängigkeit.....	67
3.1.3	Ermittlung der Substratspezifität.....	79
3.2	Identifizierung der ZmSUT1-Substratbindestelle.....	82
3.2.1	Kapazitätsänderungen ( $\Delta C_m$ ) von ZmSUT1 WT.....	87
3.2.2	Transporteigenschaften der generierten Mutanten .....	91
3.3	Posttranslationale Regulationsmechanismen.....	99
3.3.1	Einfluss von Sucralose auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1.....	99
3.3.2	Einfluss von Redox-Reagenzien auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1 .....	102

4	Diskussion .....	105
4.1	Vergleichende Analysen von ZmSUT1 und UmSrt1 .....	105
4.1.1	Untersuchungen zur Substratabhängigkeit .....	108
4.1.2	Untersuchungen zur Substratspezifität .....	112
4.2	Posttranslationale Modifikationen von SUC-Transportern .....	114
4.2.1	Einfluss von Redox-Reagenzien auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1 .....	114
4.2.2	Einfluss von Sucralose auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1 .....	116
4.3	Identifizierung der ZmSUT1-Substratbindestelle .....	118
5	Zusammenfassung .....	124
6	Summary .....	127
7	Anhang .....	130
7.1	Literaturliste .....	130
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	148
7.3	Tabellenverzeichnis .....	149
7.4	Abkürzungsverzeichnis .....	150
7.5	Danksagung .....	154
8	Eidesstattliche Erklärung .....	155



## **1 Einleitung**

Untersuchungen von Lunn et al. zu Folge liegt die Vermutung nahe, dass die Fähigkeit Saccharose (SUC) zu synthetisieren auf die Cyano- und Proteobakterien zurückgeht, die seit mehr als 3,5 Milliarden Jahren die Gewässer der Erde besiedeln (Lunn, 2002). Diese Organismen verwenden SUC zum einen zur Stabilisierung des osmotischen Drucks und zum anderen als Kohlenhydratspeicherstoff. Laut der Endosymbionten-Theorie, waren die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien die Vorläufer der Chloroplasten grüner Pflanzen. Für diese Annahme spricht der übereinstimmende Aufbau von DNA und Ribosomen heutiger Plastiden und Mitochondrien, der denen der Cyanobakterien entspricht. Deshalb geht man davon aus, dass schon die ersten pflanzlichen Zellen in der Lage waren SUC zu synthetisieren (Salerno & Curatti, 2003). Diese ersten pflanzlichen Organismen begannen vor etwa 700 Millionen Jahren die Kontinente zu besiedeln (Heckman et al., 2001). Bis heute besteht die Grundlage ihrer phototrophen Überlebensstrategie darin, Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) aus der Luft zu fixieren und daraus organisches Material zu synthetisieren. Für diese Assimilationsprozesse benötigen sie neben  $\text{CO}_2$  anorganischen Mineralien, Lichtenergie sowie eine ausreichende Versorgung mit Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

### **1.1 Aufbau und Funktion der Leitbündel**

Im Laufe der Evolution hat sich die Bildung vaskulärer Gewebe, auf Grund zunehmender Komplexität und Größe der Organismen, als notwendig herausgestellt. Ein Stoffaustausch von Zelle zu Zelle reichte nicht mehr aus, um eine rasche  $\text{H}_2\text{O}$ - und Nährstoffversorgung der gesamten Pflanze sicher zu stellen. Neben der Versorgung mit  $\text{H}_2\text{O}$  über das Wurzelsystem, haben landlebende Pflanzen ein Gefäßsystem zur Umverteilung der photosynthetisch hergestellten Kohlenstoffverbindungen entwickelt.

Bei Angiospermen, die von der Wurzel bis zur Spitze mehr als 100 Meter messen können, haben sich zwei Ferntransportbahnen entwickelt - das Xylem und das Phloem. Diese Transportbahnen bilden zusammen die Leitbündel und gewährleisten einen effektiven Austausch von Absorptions- und Assimilationsprodukten über große Distanzen zwischen Wurzeln und Sprossspitze. Das Xylem versorgt die Pflanzen mit Wasser und Nährsalzen aus dem Boden. Es besteht aus Zellen, die in ihrem ausgereiften Zustand dicke Verstärkungen ihrer Sekundärwände aufweisen. Vollständig ausdifferenzierte Xylemgefäße haben im Laufe ihrer Entwicklung ihr Protoplasma verloren - sie sind also tot, wenn sie ihre Funktion als Versorgungsleitung für H<sub>2</sub>O und Mineralien aufnehmen. Die Wasserpotenzialdifferenz ( $\Delta\psi_{\text{Atmosphäre-Wurzel}}$ ), die im Boden-Pflanze-Luft-Kontinuum herrscht, generiert einen Transpirationssog, der den Massenstrom von H<sub>2</sub>O mit gelösten Nährsalzen von den Wurzeln bis in den Spross antreibt. Die Xylemgefäße sind von Xylemparenchymzellen umgeben, die für die Be- und Entladung der Gefäße sorgen.

### 1.1.1 Das Phloem

Das Leitgewebe ist in den Blättern höherer Pflanzen meist mit dem bloßen Auge als „Adernetz“ erkennbar. Im Gegensatz zu den toten Xylemgefäßen, besteht das Phloem aus lebenden Zellen. Die Leitbahnen des Phloems bestehen aus in Längsrichtung aneinandergrenzenden, langgestreckten Zellen - den Siebröhrenelementen. Ihre axialen Zellwände sind von zahlreichen Poren durchsetzt, durch die ein direkter zytoplasmatischer Durchgang von Zelle zu Zelle in Längsrichtung ermöglicht wird. Durch diese Siebplatten zieht sich das Zytoplasma und bildet ein Kontinuum, das den Langstreckentransport von Photoassimilaten ermöglicht.

In der Phloementwicklung entsteht - durch inäquale Teilung einer Phloem-Mutterzelle - ein longitudinal gestrecktes Siebröhrenelement und eine Geleitzelle. Die Einheit aus Siebelementen und assoziierten Geleitzellen nennt man Siebelement-Geleitzell-Komplex (SE/CC Komplex, *sieve element/companion cell complex*) (van Bel, 2003b). In reifen, funktionsfähigen Siebröhrengliedern sind keine zytoplasmatischen Organellen mehr vorhanden. Die kernlosen Siebröhrenglieder werden allerdings von einer (bis mehreren)

Geleitzelle(n) flankiert. Diese supplementieren den Stoffwechsel der Siebröhrenglieder, indem sie die Assimilate in die Siebröhren transportieren und sie von dort wieder entnehmen.

Man unterscheidet drei Typen von Geleitzellen: die gewöhnlichen Geleitzellen, die Transfer- und die Intermediärzellen. An den radiären Zellwänden sind die Geleitzellen mit den Siebelementen über Poren-Plasmodesmen-Einheiten (PPU`s, *pore-plasmodesm unit*) verbunden (Knoblauch, 1998). Plasmodesmen sind dünne zytosolische Stränge, die von Plasmamembran umgeben sind und eine Verbindung durch die Zellwand hindurch in die Nachbarzelle ermöglichen. Durch die PPU`s hindurch zieht sich das Endoplasmatische Retikulum. Viele der Siebröhren-Proteine werden in den Geleitzellen synthetisiert und bis zu einer Größe von 100 kDa über die PPU`s in die Siebröhren transportiert (van Bel, 2003b). Geleitzellen stellen also im SE/CC-Komplex die Versorgung der Siebelemente mit Transkripten, Proteinen und Energie (ATP) sicher (Lucas et al., 1996). Um diese Versorgung, bei der es sich meist um Stoffwechselenergie verbrauchende aktive Transportprozesse handelt sicherstellen zu können, sind die drüsenartigen Geleitzellen mit einem Kern, sehr dichtem Zytoplasma und zahlreichen Mitochondrien sehr reichhaltig ausgestattet (Sjolund, 1997).

### **1.2 Langstreckentransport im Phloem**

Pflanzliche Organe, die einen Überschuss an Photoassimilaten produzieren, werden *Source*-Organe genannt. Die Photoassimilate werden in diesen Zellen direkt metabolisiert oder in Form von Transportzuckern für die Versorgung von Meristemen, Wurzeln, Knollen, Blüten oder Samen zur Verfügung gestellt. Diese heterotrophen Organe, die nicht photosynthetisch aktiv sind und somit Nettoimporteure von Kohlenstoffverbindungen darstellen, werden als *Sink*-Organe bezeichnet. Sie benötigen Kohlenhydrate zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels, oder dienen als Speicherorgane und werden deshalb über das Phloem mit Kohlenhydraten versorgt. Die treibende Kraft für den Massenstrom im Phloem ist ein osmotischer Druckgradient, der aufgrund höherer Osmolyt-Konzentrationen in *Source*-Gewebe im Vergleich zu *Sink*-Gewebe entsteht (Münch, 1930). Die herrschende osmotische Potenzialdifferenz durch die

Beladung des Phloem im *Source*- und der Entnahme der Osmolyte im *Sink*-Organ hat einen „Druckstrom“ zur Folge. Dabei werden Transportgeschwindigkeiten von bis zu 100 cm/Std. erreicht (Fisher, 1990). Der Transport im Phloem ist nicht auf eine basipetale Transportrichtung beschränkt, sondern läuft bidirektional immer vom Ort der Synthese zum Ort des Verbrauchs ab. Somit kann die Transportrichtung dieses osmotisch generierten Massenstroms auch im Laufe der verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze, oder an verschiedene Jahreszeiten angepasst, variieren (Wright et al., 2003). In der Wachstums- und Blütezeit sind es die Spitzenmeristeme, in der Adoleszenz die Früchte und Samen oder die unterirdischen Speicherorgane der Pflanzen, die zeitweise am stärksten mit Nährstoffen versorgt werden müssen.

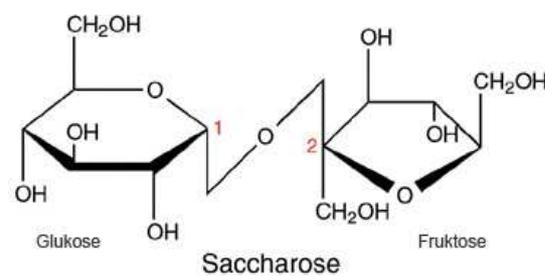
### 1.2.1 SUC als Haupttransportzucker im Phloem

In allen Pflanzen stellt das Disaccharid SUC eine Form von Transportzucker dar. In vielen Pflanzenarten, wie beispielsweise Mais (*Zea mays*), Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*), wird Zucker ausschließlich in Form von SUC über große Distanzen transportiert (Fondy & Geiger, 1977). Die SUC-Konzentration im Phloem dieser Pflanzen kann mehr als ein Mol/L betragen (Lohaus et al., 2000). Neben SUC werden in Rosengewächsen (*Rosaceae*) und dem Breitblättrigen Wegerich (*Plantago major*) auch Zuckeralkohole wie z. B. Sorbitol und Inositol transportiert (Webb & Burley, 1962; Lohaus & Fischer, 2004; Reidel et al., 2009). Für die Pflanzenfamilien der Hahnenfuß- (*Ranunculaceae*) und Mohngewächse (*Papaveraceae*) wurde die Translokation der Kohlenhydrate im Phloemsaft in Form von Hexosen mit einem Anteil von bis zu 80 Prozent beobachtet (van Bel & Hess, 2008). Für die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) ist bekannt, dass SUC den primären Transportzucker repräsentiert, jedoch auch das Trisaccharid Raffinose transportiert wird (Haritatos et al., 2000a). Bei Kürbisgewächsen (*Cucurbitaceae*) stellen dagegen Raffinose und Stachyose (Raffinose-Familie-Oligosaccharide, RFO's) die wichtigsten Transportzucker dar (Kandler, 1982; Sauer, 2007; Keller, 1996). Der Vorteil der reduzierten Zucker, z. B. SUC, den RFO's und den Zuckeralkoholen ist in ihrer schwachen chemischen Reaktivität zu sehen.

Darüber hinaus beeinflussen sie den Metabolismus der Pflanze nicht, da sie kein Bestandteil des primären Stoffwechsels sind. Sie bestehen zudem durch eine hohe Löslichkeit, wobei die Viskosität des Phloensafts weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Somit ist ein Transport in hohen Konzentrationen möglich, ohne die Phloemzellen zu schädigen.

## 1.2.2 SUC im Pflanzenstoffwechsel

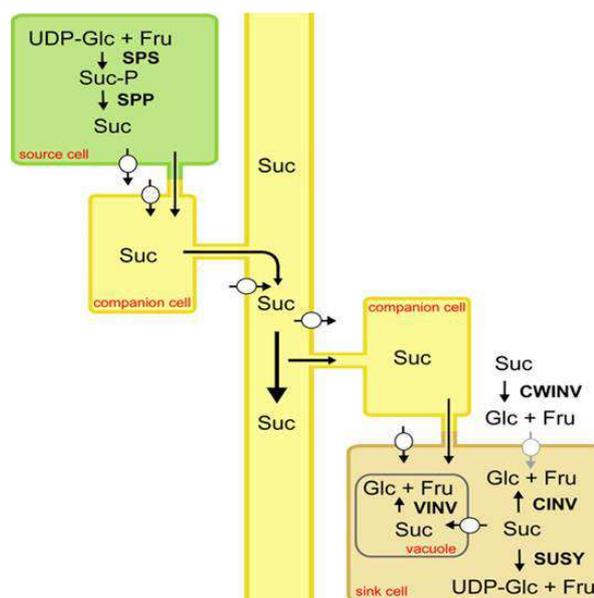
Ein SUC-Molekül (Abbildung 1.1) kann aus verschiedenen Grundbausteinen und in unterschiedlichen Geweben synthetisiert werden. Sie wird jedoch stets im Zytosol der Zellen und mit Hilfe von Enzymen gebildet. Im photosynthetisch aktiven Blattgrün (*Source*-Gewebe) vermittelt die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) die Umwandlung von UDP-Glucose und Fructose-6-phosphat in Saccharose-6-phosphat. Dieser Reaktion schließt sich die Umwandlung von Saccharose-6-phosphat zu SUC durch das Enzym Saccharose-Phosphatase (SPP) an. Das Schicksal der in *Source*-Gewebe neu synthetisierten SUC ist abhängig von der Spezies und vom Entwicklungsstatus der Pflanze, da sie entweder in der Vakuole gespeichert oder in andere Teile der Pflanze transportiert wird, um dort gespeichert oder metabolisiert zu werden (Sauer, 2007).



**Abbildung 1.1: Chemische Formel des Disaccharids Saccharose.**

SUC besteht aus den Monosacchariden  $\alpha$ -D-Glucose und  $\beta$ -D-Fruktose, die  $\alpha,\beta$ -1,2-glycosidisch verbunden sind. (Quelle:[http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/zucker/bilder/saccharose\\_gr.jpg](http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/zucker/bilder/saccharose_gr.jpg)).

Verläuft der Abtransport der primären Photosyntheseprodukte langsamer als seine Produktion, so wird der während der Lichtphase produzierte Überschuss (bis zu 30 Prozent der Photosyntheseprodukte) im Chloroplastenstroma als Assimilationsstärke (transitorische Stärke) gespeichert (Kjolberg & Manners, 1963; Dinges et al., 2003; Lu & Sharkey, 2006). Diese wird in der Dunkelphase mittels der Stärke-degradierenden Enzyme  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase, sowie der Dextrinase und Maltase abgebaut. Somit stehen auch während der Dunkelphase stets genügend „Bausteine“ für die SUC-Synthese zur Verfügung (Dunn et al., 1973; Lloyd et al., 2005).



**Abbildung 1.2: Transportweg eines SUC-Moleküls vom Source- zum Sink-Gewebe**

Der Weg der SUC von der Synthese im Source-Gewebe, über den Transport ins Phloemgewebe und entlang des Phloems bis in die Sink-Gewebe mit anschließender Metabolisierung. Die schwarzen Kreise mit Pfeil stellen SUC-Transporter dar, die grauen Kreise mit Pfeil kennzeichnen Hexose-Transporter. SUC, Saccharose; Fru, Fructose; Glc, Glucose; UDP-Glc, UDP-Glucose; SPP, Saccharoserose-Phosphatase; SPS, Saccharose-Phosphat Synthase; SUSY, Saccharose-Synthase; CWINV, Zellwand-Invertase; VINV, vakuoläre Invertase; CINV, cytosolische-/plastidäre-/mitochondriale-Invertase (Wind et al. 2010).

Mutationen in Genen, deren Genprodukt eine Funktion im Katabolismus der transitorischen Stärke wahrnimmt, führten zu einem Überschuss an Stärkeakkumulation in den Blättern (Lin et al., 1988a; Lin et al., 1988b; Rosti et al., 2006;

Rosti & Denyer, 2007). Das Enzym Saccharose-Synthase (SUSY) kann die Synthesereaktion von Glucose-1-phosphat mit Fructose (Fruc) zu SUC katalysieren, erfüllt seine Hauptaufgabe aber im SUC-Abbau in den *Sink*-Gewebe. Dort katalysiert SUSY im Zytosol der Zellen die Spaltung von SUC zu UDP-Gluc und Fruc (Salerno & Curatti, 2003; Sauer, 2007). Eine weitere Rolle beim Abbau von SUC spielen Invertasen, die SUC in Gluc und Fruc spalten. Mithilfe der Invertaseaktivität kann auch in Mitochondrien (Szarka et al., 2008), Plastiden wie den Chloroplasten und Amyloplasten (Gerrits et al., 2001), der Vakuole (Sonnewald et al., 1991; Grennan & Gragg, 2009) und dem Apoplasten (Roitsch & Gonzalez, 2004) ein Abbau von SUC stattfinden. Die Prozesse der Synthese, des Transports und der Nutzung von SUC sind schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt (Wind et al., 2010).

Für *Arabidopsis* konnten mittels einer Überexpression von SPS eine gesteigerte Biomasse, sowie erhöhte SUC-Konzentrationen im *Sink*-Gewebe gemessen werden (Park et al., 2008), da eine gesteigerte SUC-Synthese scheinbar zu einer gesteigerten Biomasseproduktion führt. In Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) führte die SPS-Überexpression zu verfrühter Blüte sowie zu einer größeren Anzahl und gesteigertem Gewicht der Früchte. Hingegen führte eine verringerte Aktivität von SPS in *Nicotiana tabacum* zu einer gestörten Photosynthese, mangelhafter Ausbildung des Chlorophylls, die zu einer blassgrünen Farbe führt (Chlorose) und verringertem Wachstum der Pflanzen (Micallef et al., 1995). Ähnliche Phänotypen beobachtet man, wenn Manipulationen im Transportweg von SUC vorgenommen werden. SUC/H<sup>+</sup>-Symporter sind essenziell an der Beladung des Phloems beteiligt (Riesmeier et al., 1994; Srivastava et al., 2008). Für SUT1-Verlustmutanten aus Mais, Kartoffel und Tabak wurden eine Hyperakkumulation von Kohlenhydraten in ihren Blättern, chlorotische Verfärbungen der Blätter, ein reduziertes Wachstum und eine verspätete Blüte beschrieben (Slewinski et al., 2009; Zhang & Turgeon, 2009). Die phänotypischen Veränderungen beim Eingriff in den SUC-Metabolismus und/oder SUC-Transport lassen auf eine zentrale Rolle des Disaccharids SUC im gesamten Stoffwechsel der Pflanze schließen. Der Metabolismus sowie die Umverteilung von SUC müssen also je nach Bedarf, Umweltbedingungen und Entwicklungsstatus der Pflanze fein aufeinander abgestimmt ablaufen.

### 1.2.3 Weitere Metabolite im Transportstrom des Phloems

Das Phloem vereint in sich die Langstrecken-Nährstoffversorgung und die Kommunikation zwischen verschiedenen Organen der Pflanze und macht damit einen wichtigen Teil des Signalsystems der Gefäßpflanzen aus (Turgeon & Wolf, 2009). Die gebildeten Kohlenhydrate, die hauptsächlich in Form von Zuckern in der Pflanze verteilt werden, bilden mengenmäßig den größten Anteil in der Zusammensetzung des Phloemsafts (Giaquinta, 1983). Auch die Versorgung aller Pflanzenteile mit mineralischen Elementen wird vom Phloem sichergestellt. Dabei werden Stickstoff und Schwefel im Phloem überwiegend als organische Verbindungen in Form von Aminosäuren transportiert. Dies sind vornehmlich Glutamat und Aspartat und ihre jeweiligen Amide Glutamin und Asparagin (Riens et al., 1991; Winter et al., 1992; Golecki et al., 1999; Lohaus & Moellers, 2000; Ruiz-Medrano et al., 2001). Es befinden sich jedoch nicht nur Makromoleküle sondern auch gelöste Substanzen im Transportstrom. Dazu zählen anorganische Ionen und Proteine (Leisner & Turgeon, 1993; Bowles, 1998; Ryan & Pearce, 1998). Unter den Makronährelementen ist Kalium ( $K^+$ ) für die Pflanze das wichtigste Kation mit Funktionen als Kofaktor bei enzymatischen Reaktionen, in der Osmoregulation und als Osmotikum bei nastischen Turgorbewegungen und wird als freies Ion im Phloem transportiert (Dreyer & Uozumi, 2011). Des Weiteren konnten Proteine und RNAs im Phloemsaft bestimmt werden, deren Funktionen eindeutig Stress- und Abwehrreaktionen zugeordnet werden können (Walz et al., 2004; Kehr & Buhtz, 2008). Diese Proteine und RNAs fungieren als Signale um z. B. eine systemische Resistenz (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) in der gesamten Pflanze auszulösen (Ryals et al., 1996; Christeller et al., 1998; Nurnberger & Scheel, 2001; van Bel, 2004). Auch die Existenz von endogenen *messenger*-RNAs, Pathogen-RNAs und kleinen RNA-Spezies, die im Prozess des „*gene silencing*“ eine Rolle spielen, konnte im Phloemsaft bestätigt werden (Doering-Saad et al., 2002; Kehr & Buhtz, 2008). Viele dieser RNAs scheinen sich als Komplexe mit Proteinen in Form von Ribonucleoproteinen (RNPs) fortzubewegen (Gomez et al., 2005). Weitere chemische Signale im Phloemsaft stellen sekundäre

Pflanzenstoffe wie Phytohormone, Salizyl- und Jasmonsäure dar (Creelman & Mullet, 1997; McConn et al., 1997; Ruiz-Medrano et al., 2001).

Um eine flächendeckende Energieversorgung sicherstellen zu können, werden auch ATP-Moleküle mittels des Transportstroms verteilt (Turgeon & Wolf, 2009). Die Leitungsbahnen werden somit auch für die Weiterleitung von Signalkomponenten chemischer Natur genutzt. Zusätzlich bewerkstelligt das Phloem die Vermittlung von physikalischen Langstreckensignalen z.B. die sich ausbreitenden Aktionspotenziale entlang der Siebelemente, die durch Verwundung und Insektenfraß generiert werden können (Rhodes, 1996). Das Phloem ist also das Äquivalent zum Blutgefäßsystem der Tiere und übernimmt zudem eine ähnliche Aufgabe wie das tierische Nervensystem. Im Gegensatz zum Blutkreislaufsystem handelt es sich beim Phloem jedoch nicht um einen geschlossenen Kreislauf, sondern um ein im *Source*-Gewebe entspringendes und im *Sink*-Gewebe endendes, offenes Leitgewebe.

### 1.3 Beladung des Phloems

Das Transportphloem zeichnet sich durch große Blattadern 1. bis 3. Ordnung („*major veins*“) aus. Phloemgefäße, die fein verzweigt sind und mit direktem Kontakt im Mesophyll enden, werden „*minor veins*“ genannt. Diese sind Blattadern 4. bis 7. Ordnung an denen die Beladung des Phloems stattfindet (van Bel, 2003a; Ehlers & van Bel, 2010). Zur Versorgung der heterotrophen Gewebe der Pflanzen müssen die Assimilationsprodukte der Mesophyllzellen in die SE/CC-Komplexe gelangen, wo z.B. SUC je nach Pflanzenart und Beladungstyp mit Konzentrationen von mehr als 1 Molar akkumuliert wird (Lohaus & Fischer, 2004). Für den Beladungsprozess des Phloems mit Photoassimilaten gibt es jedoch keinen einzelnen universellen Weg. Der Mechanismus der Beladung des SE/CC-Komplexes hängt maßgeblich mit dem Vorhandensein von Plasmodesmen, der Ausprägung des Geleitzelltyps und den unterschiedlichen Transportzuckern in den jeweiligen Pflanzenspezies zusammen.

Es werden zwei verschiedene Mechanismen der Phloembeladung unterschieden, die symplastische Beladung, der auch die Polymer-Fallen-Strategie angehört und die apoplastische Beladung (Abbildung 1.3). Dabei ist jeder der Mechanismen mit einem unterschiedlichen Typ von Geleitzellen verknüpft. Die Existenz unterschiedlicher Typen von SE/CC-Komplexen in verschiedenen Bereichen des Phloems belegt die Möglichkeit der Coexistenz mehrerer Beladungsstrategien in einer Pflanze (van Kesteren et al., 1988; van Bel, 1993; Aoki, 2012). Es ist ebenfalls denkbar, dass innerhalb einer Pflanze zu verschiedenen Zeiten, z.B. aufgrund von Stress- und/oder Mangelzuständen oder Entwicklungsstadien, zwischen mehreren Beladungsstrategien hin-und hergewechselt werden kann (Turgeon, 2010; Aoki, 2012).

### 1.3.1 Symplastische Phloembeladung

Die symplastische Phloembeladung stellt einen passiven Prozess dar, der keine Energie verbraucht (Russin et al., 1996; Rennie & Turgeon, 2009). Zucker und andere Assimilate gelangen über Diffusion entlang ihres Konzentrationsgefälles über das Zytoplasma durch Plasmodesmen von den Mesophyllzellen in den SE/CC-Komplex. Passiv beladende Pflanzenspezies transportieren hauptsächlich SUC und RFOs und besitzen "gewöhnliche" Geleitzellen. Sie verfügen über eine Vielzahl an Plasmodesmen zwischen SE/CC-Komplex und den umgebenden Mesophyllzellen. Sie sind des Weiteren durch eine hohe Gesamtkonzentration an SUC in den Blättern des *Source*-Gewebes gekennzeichnet. Sind die Assimilate auf Grund ihres bestehenden Gradienten in den Siebelementen angelangt, werden sie zu den *Sink*-Geweben transloziert (Turgeon & Medville, 1998).

#### 1.3.1.1 Der Polymer-Fallen-Mechanismus

Eine weitere Strategie der Phloembeladung beschreibt R. Turgeon mit dem *Polymer-Fallen-Prinzip* (Turgeon & Gowan, 1990). Die SUC gelangt bis in spezielle Geleitzellen, die sogenannten Intermediär- oder Übergangszellen. Diese sind größer als die gewöhnlichen Geleitzellen, haben sehr dichtes Zytoplasma, mehrere kleine Vakuolen und sind über zahlreiche Plasmodesmen mit den angrenzenden Zellen verbunden (Turgeon, 1993).

Dort hängt das Enzym Galactosyl-Transferase über eine  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindung ein Molekül Galactose (es entsteht Raffinose) oder zwei Galactosemoleküle (es entsteht Stachyose) an ein SUC-Molekül. Durch die Umwandlung von SUC in RFO's wird der bestehende Konzentrationsgradient für die Diffusion der SUC von den Mesophyll- in die Intermediärzellen aufrechterhalten. Die neu synthetisierten Makromoleküle sollen auf Grund ihrer Größe (ca. 500 kDa) nicht mehr durch Plasmodesmen in die Mesophyllzellen zurück diffundieren können. Die Intermediärzellen fungieren also als „Molekülfallen“, sind jedoch für Raffinose und Stachyose über Plasmodesmen in Richtung der Siebzellen passierbar (Turgeon & Gowan, 1990; Haritatos et al., 2000b; Turgeon & Wolf, 2009). Vertreter der Familie der Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*), die Buntnessel (*Coleus blumei*) und die Maskenblume (*Alonsoa meridionales*), die neben SUC auch die Oligosaccharide Raffinose und Stachyose transportieren, machen sich hauptsächlich diesen Weg der symplastischen Phloembeladung zu Nutze.

### 1.3.2 Apoplastische Phloembeladung

Bei der apoplastischen Phloembeladung gelangt die SUC auf symplastischem Weg bis in die Phloemparenchymzellen, die direkt an den SE/CC-Komplex grenzen. Dort tritt die SUC in den extrazellulären Raum (Apoplast) über.

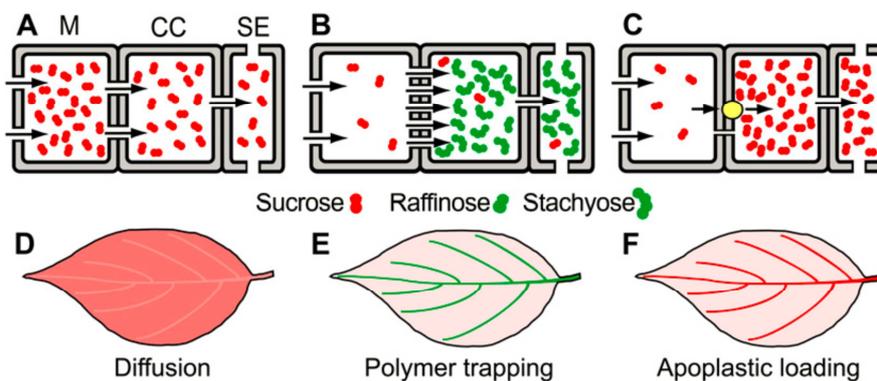
Erst kürzlich konnte Chen et al. (2010) zeigen, dass der SUC-Efflux aus den Phloemparenchymzellen in den Apoplasten von Vertretern der SWEET-Familie katalysiert wird. In *Arabidopsis thaliana*, Reis (*Oryza sativa*), dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und dem menschlichen Genom konnten Orthologe dieser Familie identifiziert werden (Chen et al., 2010; Baker et al., 2012; Chen et al., 2012). Diese Uniporter werden in *Arabidopsis thaliana* von AtSWEET 11 und 12 und in Reis (*Oryza sativa*) von OsSWEET11 und 14 repräsentiert. Sie gelten als bidirektional fungierende Facilitatoren, die eine erleichterte Diffusion von SUC vermitteln. SWEETS gelten neben den im Jahre 2007 entdeckten SUF's (*sucrose facilitators*) (Zhou et al., 2007) als pH-unabhängige Transportproteine, die den Efflux von SUC aus dem Zytoplasma der Zellen in den Apoplasten bewerkstelligen.

Messungen des osmotischen Potentials ( $\psi_s$ ) in verschiedenen Zelltypen des *Source-Gewebes* zeigten, dass die Konzentration an SUC in den SE/CC-Komplexen deutlich höher liegt als in umgebenden Mesophyllzellen (Geiger et al., 1973). Diese Akkumulation von SUC wird mittels aktivem Transport gegen den chemischen Gradienten von SUC-Transportproteinen bewerkstelligt (Sauer, 2007; Braun & Slewinski, 2009; Kuhn & Grof, 2010), die SUC aus dem Apoplasten ins Zytoplasma der Geleitzellen transportieren. Die mit dieser Beladungsstrategie verbundenen Geleitzellen werden Transferzellen genannt, die wenig Plasmodesmen besitzen und sich durch Zellwandeinstülpungen auszeichnen. Diese dienen der Oberflächenvergrößerung und damit einer effektiven Aufnahme der SUC aus dem Apoplasten (Pate, 1969).

Im Apoplasten, der die Schnittstelle des Austritts der Photoassimilate aus dem *Source-Gewebe* und dem Eintritt ins Phloem darstellt, herrscht ein pH-Wert im Bereich zwischen 5,0 und 6,0 (Tetlow, 1993; Kosegarten et al., 1999; Hedrich et al., 2001), während das Innere der Phloemzellen einen stabilen pH-Wert von ca. 7,5 besitzt (Hafke et al., 2005). Dieser  $H^+$ -gradient und ein hyperpolarisiertes Membranpotential wird von plasmamembranständigen  $H^+$ -ATPasen des P-typs in den Geleitzellen unter Verbrauch von ATP aufgebaut (De Witt, 1991; Bouche-Pillon et al., 1994). In der Plasmamembran des SE/CC-Komplexes sind SUC-, Peptid-, Polyol- und Aminosäuretransporter angesiedelt, die unter Nutzung der Protonenmotorischen Kraft ihr Substrat im Symport mit  $H^+$  in den SE/CC-Komplex transportieren (Li & Bush, 1990; Boorer et al., 1994; Jamai et al., 1994; Frommer et al., 1995; Rentsch et al., 1995; Chen & Bush, 1997; Carpaneto et al., 2005; Sauer, 2007).

Die Translokation des Substrats im Symport (in die gleiche Richtung) oder im Antiport (in die entgegengesetzte Richtung) mit  $H^+$ , nutzt die protonenmotorische Kraft als Antrieb aus, weshalb die beteiligten Transportproteine als sekundär aktive Transporter gelten. Diese Carrierproteine gehören nicht zu den Enzymen, da sich die Verbindung bei der Transportreaktion chemisch nicht verändert. Ansonsten kann die Transportreaktion jedoch wie eine enzymatische Reaktion betrachtet werden, da sie meist einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Da der Carrier-vermittelte Transport, im Gegensatz zur erleichterten Diffusion durch Kanäle, eine Konformationsänderung beinhaltet, bewegt

sich ihre Transportrate mit  $10^2$  bis  $10^3$  Molekülen pro Sekunde unterhalb der Rate, die Kanäle erreichen können (bis zu  $10^8$  Ionen pro Sekunde) (Sze et al., 1999). Zu den Carriern zählen auch diffusionserleichternde Transportproteine (*transport facilitators*), die passiv arbeiten und nur ein Substrat entlang seines Gradienten transportieren (Uniporter). Bekannt sind in dieser Kategorie Facilitatoren (Ludewig et al., 2007; Neuhauser et al., 2007), SUC-Transporter wie die SUF's (*sucrose facilitators*) (Zhou et al., 2007) und die SWEETS (Chen et al., 2010).



**Abbildung 1.3: Strategien zur Beladung des Phloems**

Schematische Darstellung unterschiedlicher Beladungsstrategien des Phloems (A-C) und den Zuckergehalten der Blattadern und der Blattspreite (D-F). In A und D diffundiert SUC passiv durch Plasmodesmen aus dem Mesophyllzellen (M), in die Geleitzellen (CC) und anschließend in die Siebelemente (SE). Die SUC-Konzentration ist im gesamten Blatt sehr hoch und in den Blattadern nur geringfügig niedriger. In B und E diffundiert SUC durch Plasmodesmen aus dem Mesophyll in die Geleitzellen/Intermediärzellen. Dort wird SUC überwiegend zu Raffinose und Stachyose konvertiert. Aufgrund der Impermeabilität der PPU's für RFO's, bleibt SUC-Konzentration im Mesophyll stets niedrig. Die Beladungsstrategien A und B werden der Symplastischen Phloembeladung zugeordnet. In C und F wird SUC mittels Transportproteinen aus dem Apoplasten in die Geleitzellen transportiert. Dieser Weg der Apoplastischen Phloembeladung ermöglicht ebenfalls eine niedrige SUC-Konzentration im restlichen Blattgewebe (Turgeon, 2010).

## 1.4 Entladung des Phloems

Im Gegensatz zur Beladung sind die Entladungsmechanismen von Photoassimilaten nicht einheitlich den einzelnen Pflanzenarten zu zuordnen. Die Phloementladung ist dagegen abhängig vom Entwicklungsstadium der *Sink*-Gewebe, die von wachsenden, vegetativen Pflanzenteilen (Wurzelspitzen und junge Blätter), über Speicherorgane (Wurzeln und Knollen) bis hin zu reproduktiven Organen (Früchte und Samen) variieren können. Da *sink*-Gewebe keine photosynthetische Aktivität besitzen, benötigen sie, die von *Source*-Gewebe produziert und über das Phloem verteilten Transportzucker als Kohlenstoffquelle. Bei der Entladung des Phloems wird ebenfalls zwischen einem symplastischen und einem apoplastischen Weg unterschieden.

Die Zucker können auf symplastischem Wege aus den SE/CC-Komplexen über Plasmodesmen in angrenzende Zellen transportiert werden. Solche Zonen in den *sink*-Gewebe werden Entladungsdomänen (*unloading domains*, UDL's) genannt (Stadler et al., 2005a; Stadler et al., 2005b). Die Plasmodesmen zwischen den SE in *Sink*-Regionen und den UDL's erlauben den mühelosen Übertritt von SUC und einem weiteren rein symplastischen Kurzstreckentransport bis in die *Sink*-Zellen. Solche Entladungsvorgänge wurden in jungen Blättern von dicotylen Pflanzen wie Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) beobachtet. Bei der apoplastischen Entladung müssen die Zucker an einer Stelle in den extrazellulären Raum übertreten, um dann wieder über Protonen-gekoppelte SUC- oder Hexosetransporter in die *Sink*-Zellen transportiert zu werden (Riesmeier et al., 1994; Truernit & Sauer, 1995; Kuhn et al., 1997; Weber et al., 1997; Lemoine, 2000). Dies geschieht entweder direkt beim Austritt aus den terminalen SE (Sauer, 2007) oder an einer Stelle des anschließenden Kurzstreckentransports, da in manchen Fällen keine durchgehenden symplastischen Verbindungen vom Phloemgewebe bis in die *Sink*-Zellen bestehen z.B. bei sich entwickelnden Embryos, Pollenkörnern, oder bei Schließzellen (Weber et al., 1997). Auch für die hohe Akkumulation von SUC in Früchten und Samen ist ein apoplastischer Schritt notwendig. Somit ist eine präzise Auswahl und Kontrolle über die Menge der Substanzen möglich, die dem Gewebe zugeführt werden.

In Samenschalen sich entwickelnder Erbsen (*Pisum sativum*) und Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) wurden sogenannte SUF's (*sucrose facilitators*) identifiziert. Diese Proteine werden den diffusionserleichternden Uniportern zugeordnet und vermitteln einen bidirektionalen, pH- und energieunabhängigen SUC-Transport (Zhou et al., 2007).

Da für die SWEET-Proteine ebenfalls ein bidirektionaler, weitestgehend pH-unabhängiger Transport und die Lokalisation im Phloemgewebe gezeigt werden konnte, liegt nahe, dass die SWEETS am Efflux der SUC aus dem SE/CC-Komplex in den Apoplasten involviert sind (Chen et al., 2010; Baker et al., 2012; Chen et al., 2012). Zellwand-gebundene Invertasen im Apoplasten, aber auch zytosolische Invertasen unterstützen die Entladung der Siebelemente sehr erheblich, indem sie durch Spaltung der SUC in Glucose und Fructose den benötigten Gradienten in die Sink-Gewebe generieren (Roitsch et al., 2003; Roitsch & Gonzalez, 2004; Barratt et al., 2009). Durch Zellwand-gebundene Invertasen wird die apoplastische SUC-Konzentration permanent auf einem niedrigen sub-millimolaren Niveau gehalten. Das Konzentrationsgefälle für SUC zwischen dem SE/CC-Komplex und dem Apoplasten und damit die Triebkraft für den Massenstrom, bleiben so dauerhaft bestehen (Sturm & Tang, 1999; Weber & Roitsch, 2000; Roitsch et al., 2003). Hexosetransporter können nun die Aufnahme der freigesetzten Monosaccharide in die Sink-Gewebe vermitteln (Buttner & Sauer, 2000). Sowohl Transkripte, als auch die SUC-Transportproteine wurden in Sink-Geweben lokalisiert, was auf eine Rolle dieser Transporter bei der Phloementladung hinweist (Riesmeier et al., 1994; Truernit & Sauer, 1995; Kuhn et al., 1997; Lemoine, 2000). Diesen Transportern wird eine Reversibilität ihrer Transportrichtung zugesprochen, so dass sie sowohl bei der SUC-Akkumulation in Source-, als auch bei der SUC-Entladung in Sink-Geweben involviert sein könnten (Truernit & Sauer, 1995). Ein direkter Beweis für die Reversibilität des SUC-Transports konnte bis jetzt jedoch nur von Caparneto et al. für den SUC/H<sup>+</sup>-Symporter ZmSUT1 gezeigt werden (Carpaneto et al., 2005).

## 1.5 Transporter der MFS Familie

Sequenzinformationen aus Genom- und Transkriptomsequenzierungsprojekten liefern Wissen über phylogenetische Beziehungen der Proteine untereinander. Verglichen wurden pflanzliche, bakterielle und tierische Transportproteine, die aufgrund bestehender Gemeinsamkeiten zur „*major facilitator superfamily*“ (MFS) zusammen gefasst wurden (Marger & Saier, 1993). Sie repräsentiert die größte Gruppe der sekundär aktiven Transporter und beinhaltet inzwischen mehr als 10.000 sequenzierte Mitglieder aus allen Reichen des Lebens. Ihre Vertreter sind für den Transport verschiedenster Substrate wie Zucker, Peptide, Glycopeptide, Aminosäuren, Eisenkomplexe, organische und anorganische Ionen und Arzneimittel bzw. deren Abbauprodukte verantwortlich und in 58 Unterfamilien gegliedert (Saier et al., 2006). Unter Verwendung von Programmen zur Suche nach Homologien wie *PSI-BLAST* (Altschul et al., 1997) konnte man einige Gemeinsamkeiten und Charakteristika dieser Proteinfamilie herausarbeiten (Pao et al., 1998).

Die Vertreter der MFS Superfamilie bestehen aus 400-600 Aminosäuren (AS). Ein strukturelles Merkmal ist ihre Topologie mit 12 Abschnitten, die überwiegend aus hydrophoben AS bestehen und in die Membran eingelagert sind. Mit ihrer  $\alpha$ -helicalen Sekundärstruktur nennt man diese Bereiche transmembrane  $\alpha$ -Helices, oder kurz Transmembranen (TM). Nur wenige Ausnahmen (3 Unterfamilien) besitzen 14 TM, eine Unterfamilie nur 6 TM und andere 24 TM, was auf eine vermutete Genfusion zurückgeführt wird. Untereinander sind die TM meist über hydrophile AS verbunden, die sich extra- und intrazellulär befinden. Die Proteine bestehen aus zwei pseudo-symmetrischen Hälften, N- und C-terminal aus jeweils 6 TM, deren Enden ins Zytosol ragen. Verbunden werden die Hälften über eine lange, zytosolische Schleife aus hydrophilen AS zwischen den Helices VI und VII. Beide Hälften bilden zusammen das funktionelle monomere Protein. Die bestehende Symmetrie zwischen N- und C-terminaler Hälfte lässt darauf schließen, dass sie den gleichen genetischen Ursprung besitzen und durch Genduplikation entstanden sind (Saier et al., 1999; Law et al., 2008).

Einen Meilenstein in der Struktur-Funktions-Forschung an Membrantransportern stellte die erste Kristallstruktur eines MFS-Mitglieds dar, bei dem es sich um LacY, einen Lactose/H<sup>+</sup>-Symporter aus *E.coli*, handelt. Dieser Disaccharid-Transporter wird durch den elektrochemischen Protonengradienten angetrieben und transportiert Laktose. Intensive Struktur-Funktionsuntersuchungen mit Hilfe von Mutagenesestudien und schließlich die Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse führten zur Aufklärung der molekularen Struktur von LacY mit einer Auflösung von 3,5 Angström (Abramson et al., 2003b; Abramson et al., 2004). Diese Entdeckung lieferte eine Menge detaillierte Informationen und bestätigte die strukturellen Merkmale der MFS Superfamilie mit ihrer typischen  $\alpha$ -Helix Struktur, die sich über 12-transmembrane Domänen erstreckt. Die hydrophile Tasche/Höhle für die Substratbindung liegt zwischen der N- und der C-terminalen Domäne. Es ist wahrscheinlich, dass die strukturelle Änderung zwischen der ein- und der auswärts gerichteten Konformation, eine Rotation zwischen der N- und der C-terminalen Domäne um die Substratbindestelle beinhaltet. Dadurch wird sie einmal zur zytosolischen und einmal zur extrazellulären Seite zugänglich. Die hydrophile Höhle wird von den Helices I, II, IV und V der N-terminalen Domäne und Helices VII, VIII, X und XI der C-terminalen Domäne gebildet. Die Spezifität der Bindestelle wird durch die dreidimensionale Anordnung der beteiligten Aminosäureseitenketten bestimmt. Mit Hilfe von Mutagenesestudien konnten sechs AS identifiziert werden, die an der Bindung von Lactose beteiligt sind. Veränderungen dieser Aminosäuren führten zu verändertem Transportverhalten, oder zu Defekten in der Substratbindung und damit zum Verlust der Transportaktivität (Sahin-Toth et al., 1999; Zhang et al., 2003). Die Funktionalität eines Proteins wird ebenfalls durch strukturbildende Aminosäuren bestimmt, die nicht direkt mit dem Substrat oder Protonen (H<sup>+</sup>) interagieren. Sie können Bestandteil entfernter Transmembranen sein, oder sogar auf zytosolischen Loopbereichen liegen. Sie stellen keine direkte Bindestelle dar, sondern sind indirekt an der Substratbindung beteiligt, indem sie zum Beispiel Salzbrücken zu einer benachbarten Helix bilden und darüber das Protein stabilisieren. Auch das Verändern solcher Aminosäuren kann großen Einfluss auf die Substrataffinität und oder die -spezifität haben.

Biophysikalische Untersuchungen unter Spannungskontrolle könnten zu detaillierten Studien der Kinetik und Substratspezifität beitragen, jedoch konnte LacY bis heute nicht elektrophysiologisch untersucht werden.

### 1.6 Pflanzliche SUC-Transporter

Bereits 1971 wurden Studien zur Aufnahme von Zuckern mit Algen (*Chlorella vulgaris*) durchgeführt, die auf einen aktiven Transport elektrogener Protonen-Symporter hinwiesen (Komor & Tanner, 1971; Komor & Tanner, 1974; Komor & Tanner, 1976), die kurz darauf mit Experimenten an intaktem Blattgewebe der Ackerbohne (*Vicia faba*) unterstützt wurden (Delrot, 1981; Delrot & Bonnemain, 1981; M'Batchi & Delrot, 1984). Ab Anfang der 1990er Jahre gelang es, durch die Komplementation von Hefemutanten mit cDNA-Expressionsbibliotheken, die entsprechenden DNA-Sequenzen dieser Transporter zu identifizieren (Riesmeier et al., 1992). Von mehreren Arbeitsgruppen wurden Gene in unterschiedlichen Pflanzenspezies identifiziert, die für Proteine weiterer SUC/H<sup>+</sup>-Symporter codieren (Gahrtz et al., 1994; Riesmeier et al., 1994; Sauer & Stolz, 1994; Boorer et al., 1996) und wurden typischerweise SUC oder SUT (*sucrose carrier/transporter*) genannt.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass SUT1-Proteine aus verschiedenen Solanaceen in den Plasmamembranen von SE lokalisiert sind (Kuhn et al., 1997). ZmSUT1 aus Mais (*Zea mays*) wurde in den Plasmamembranen von Geleitzellen lokalisiert (Aoki et al., 1999). Es konnten diurnale Veränderungen des Gehalts an Transkripten und Proteinen der Transporter nachgewiesen werden, die einen hohen „Turnover“ belegen (Kuhn et al., 1997; Aoki et al., 1999; Chincinska et al., 2008). Wie existentiell wichtig diese Transporter sind, konnte zum ersten Mal anhand von Pflanzen durch Antisenserepression und damit verminderter Bildung von SUT1-Proteinen aus Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) bewiesen werden (Riesmeier et al., 1994). In diesem und weiteren Versuchen mit T-DNA-Insertionsmutanten anderer Spezies zeigte sich eine Hemmung des Wachstums der Statur, bis hin zu Zwergwuchs, gehemmt Wachstum der Blüten

und Wurzeln, sowie Sterilität. Die Blätter wiesen chlorotische Flecken und Veränderungen der Form auf, da sie nicht mehr in der Lage waren, die tagsüber hergestellte SUC aus den Blättern zu exportieren. Es konnte eine vermehrte SUC- und Stärkeakkumulation in den Blättern gemessen werden (Kuhn et al., 1997; Burkle et al., 1998; Gottwald et al., 2000; Kuhn et al., 2003; Slewinski et al., 2009). Durch diese Akkumulation der SUC wird die an vielen Stoffwechselwegen beteiligte FBPase (Fructose-1,6-bisphosphatase) gehemmt, ein Anstieg von Triosephosphaten im Zytosol und eine Limitierung der Photosynthese sind die Folge (von Schaewen et al., 1990). Diese Daten zeigen, wie wichtig die SUC/H<sup>+</sup>-Symporter, mit ihrer Funktion als apoplastische Phloembelader, für ein ungestörtes Wachstum und damit auch die Reproduktion der Pflanzen sind.

Viele Plasmamembran-lokalisierte SUC/H<sup>+</sup>-Symporter wurden funktionell in heterologen Expressionssystemen charakterisiert (Bush, 1990; Gahrtz et al., 1994; Sauer & Stolz, 1994; Boorer et al., 1996; Zhou et al., 1997; Chandran et al., 2003; Knop et al., 2004; Carpaneto et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sivitz et al., 2007). Analysen SUC-induzierter H<sup>+</sup>-Ströme unter kontrollierten Spannungsbedingungen in *Xenopus* Oozyten zeigten eine Transportaktivität, die durch Protonophore (CCCP) und Sulfhydrylgruppenblocker (PCMBS) gehemmt wird. Ihr Optimum im Transport von SUC liegt im sauren pH-Wert Bereich und es konnte eine Stöchiometrie von SUC: H<sup>+</sup> von 1:1 ermittelt werden. Kompetitive Aufnahmeexperimente in Hefen und elektrophysiologische Messungen in Oozyten ergaben eine Affinität gegenüber SUC mit K<sub>m</sub>-Werten im micro- bis millimolaren Bereich. Außerdem wird die Aktivität der Transporter möglicherweise durch ihr eigenes Substrat SUC und Proteinphosphorylierungen reguliert (Roblin et al., 1998; Krugel et al., 2008).

### 1.6.1 Einteilung pflanzlicher SUC-Transporter

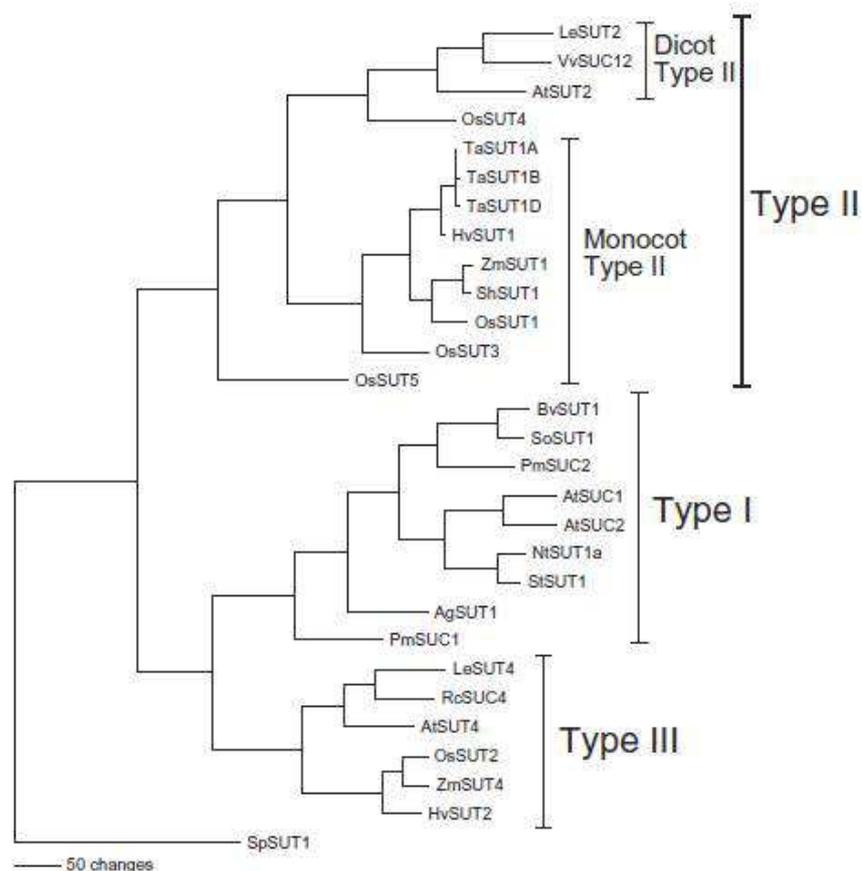
Die Mitglieder der „*major facilitator superfamily*“ (MFS) umfassen tierische, pflanzliche und prokariotische Kationen-gekoppelte Transportproteine (Marger & Saier, 1993; Saier, 1996). Innerhalb dieser großen MFS Familie bilden die SUT`s/SUC`s die Glycosid-

Pentosid-Hexuronid Unterfamilie der Kationen-Symporter-Familie (Saier et al., 2006). Alle bisher identifizierten H<sup>+</sup>-gekoppelten SUC-Transporter besitzen in ihrer Proteinsequenz das hoch konservierte Motiv -RxGRR-, welches sich an exakt der gleichen Position zwischen den Transmembrandomänen II und III befindet. Es wird als Signatur für SUC-Transporter angesehen und ist damit ein sehr hilfreiches Indiz bei der Identifikation weiterer SUC-Transporter (Lemoine, 2000).

Aufgrund einer großen Anzahl an zur Verfügung stehender Genom- und damit auch Proteinsequenzen sind mittlerweile viele SUC-Transporter aus verschiedensten Pflanzenarten identifiziert und kloniert worden. Es entstanden mehrere Einteilungen in phylogenetische Gruppen (Aoki et al., 2003; Braun & Slewinski, 2009; Kuhn & Grof, 2010), wobei sich die folgende Beschreibung auf die Einteilung der Autoren Aoki et al. aus dem Jahr 2003 bezieht (Abbildung 1.4).

Demnach lassen sich SUC-Transporter anhand phylogenetischer Untersuchungen in 3 Typen einteilen, Typ-I, Typ-II und Typ-III (Aoki et al., 2003). Vertreter des Typ-I umfassen Transporter, die spezifisch für dicotyle Pflanzen sind. Am Beispiel von AtSUC1, 2 und 9, sowie NtSUT1, StSUT1 und LeSUT1 konnte eine sehr hohe Affinität gegenüber SUC mit  $K_m$ -Werten zwischen 0.07 und 2 mM gezeigt werden, was sie zu hoch affinen (*high affinity*) SUC-Transportern macht (Kuhn et al., 1997; Barker et al., 2000; Sivitz et al., 2007). Ihre Lokalisation konnte in der Plasmamembran des SE/CC-Komplexes gezeigt werden, wo sie für die Beladung des Phloems verantwortlich sind (Riesmeier et al., 1994; Gottwald et al., 2000). Für diese Typ-I Vertreter konnte neben den Substraten SUC und Maltose eine breite Substratspezifität für natürliche sowie synthetische  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycoside belegt werden (Chandran et al., 2003). Es wird angenommen, dass die Vertreter des Typ- I evolutionär aus den Vertretern des Typ-III hervorgegangen sind. Typ-III Transporter, wie zum Beispiel AtSUC4, LjSUT4 HvSUT2 und OsSUT2 besitzen ebenfalls ein breites Substratspektrum (Reinders et al., 2008) und wurden in allen Landpflanzen inklusive der Lyco- und Bryophyten entdeckt. Anhand von Proteinanalysen aus aufgereinigten Vakuolenmembranen konnte Typ-III Vertretern eine Lokalisation im Tonoplasten von Mesophyllzellen belegt werden. Dies gilt für LjSUT4 aus Hornklee (*Lotus japonicus*) (Reinders et al., 2008) sowie HvSUT2 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) und

AtSUC4 aus *Arabidopsis* (Schneider, 2011). Des Weiteren konnte durch Expression in Hefen und *Xenopus* Oozyten für AtSUC4, LjSUT4 und StSUT4 eine pH-abhängige Aufnahme extrazellulärer SUC beobachtet werden (Weise et al., 2000; Weschke et al., 2000; Reinders et al., 2008).



**Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher SUC-Transporter**

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt. Danach folgten weitere Analysen mit parsimony (Paup 4.0; Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA) für die Erstellung des Stammbaums (Reinders et al., 2006).

Im Labor von Prof. Hedrich wurden Patch-Clamp Experimente durchgeführt, die AtSUC4 als SUC/H<sup>+</sup>-Symporter beschreiben (Schulz et al., 2011), dessen Fehlen die Zeit der Blüte und die Bildung der Früchte beeinflusst. Ihre physiologische Rolle besteht vermutlich darin, die tagsüber produzierte und in der Vakuole zwischengespeicherte SUC, bei Bedarf wieder ins Zytosol der Zelle zu entlassen (Schulz et al., 2011). Sowohl in Mono- als

auch Dicotylen wurden die Vertreter der Typ-III SUC-Transporter ausschließlich im Tonoplasten nachgewiesen (Endler et al., 2006; Eom et al., 2011).

Die Vertreter der Typ-II Transporter wie z.B. ZmSUT1 und ZmSUT3 aus Mais (*Zea mays*), ShSUT1 aus Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*), HvSUT1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) und OsSUT1 und 3 aus Reis (*Oryza sativa*) sind wie die Typ-I Vertreter in den Plasmamembranen des SE/CC-Komplexes lokalisiert. Sie weisen gegenüber den Typ-I Transportern höhere  $K_m$ -Werte für SUC auf (von 2 bis 8 mM) und gehören damit zu den niederaffinen (*low affinity*) Transportern mit einer geringeren Affinität gegenüber SUC (Aoki et al., 2003; Carpaneto et al., 2005; Reinders et al., 2006). Im Gegensatz zu den Typ-I, besitzen die Typ-II Transporter eine hohe Selektivität für SUC und Maltose, zeigen allerdings keine Transportaktivität für weitere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycoside und haben damit eine eingeschränkte Substratspezifität (Sivitz et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sun et al., 2010).

### 1.7 ZmSUT1

Die cDNA von ZmSUT1, einem pflanzlichen Transporter aus Mais (*Zea mays*) wurde 1999 als erster SUC-Transporter aus  $C_4$ -Pflanzen von japanischen Forschern kloniert (Aoki et al., 1999). Seine starke Expression konnte in Trieben ergrüner Keimlinge und grünen Blättern, also den *Source*-Organen speziell in der Phase des Kolbenwachstums nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Maiskörnern. Das Expressionsmuster beschreibt einen diurnalen Verlauf mit maximaler Expression am Ende des Tages und minimaler Expression in der Nacht (Aoki et al., 1999).

Im Jahre 2009 konnten Slewinski et al. eine ZmSUT1-Verlustmutante isolieren, die durch ein verringertes Wachstum, formveränderte und chlorotische Blätter und weniger Verzweigungen der Nebenwurzeln, sowie eine verspätete Blütezeit mit verkümmerten Blütenständen und Sterilität beschrieben werden. In den Blättern wurde ein erheblich größerer Anteil an zurückgehaltenen Kohlenhydraten gemessen. Diese Ergebnisse

stützen die These, dass ZmSUT1 ein für die Pflanze essentielles Protein ist, deren Hauptfunktion in der Phloembeladung liegt (Slewinski et al., 2009).

Aufgrund hoher Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz von ZmSUT1 verglichen mit SUC-Transportern anderer Getreidearten wie OsSUT1 (82 % Identität) oder ShSUT1 (95 % Identität) vermutete man, dass dieses aus 521 Aminosäuren bestehende Protein ebenfalls ein SUC/H<sup>+</sup>-Symporter sei (Aoki et al., 1999; Rae et al., 2005).

Da sich ZmSUT1 sehr gut heterolog in der Membran von *Xenopus laevis* Oozyten exprimieren lässt, sind mit ZmSUT1-injizierten Oozyten in Verbindung mit der DEVC-Technik für Transporter ungewöhnlich hohe, SUC-induzierte Protoneneinströme ( $I_{ss}$ ) bis zu 4  $\mu$ A messbar. Carpaneto et al. lieferten mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Techniken bereits 2005 eine erste Charakterisierung von ZmSUT1, auf welche die vertiefte Charakterisierung dieser vorliegenden Arbeit aufbaut (Carpaneto et al., 2005). Simultane Messungen SUC-induzierter Ströme ( $I_{ss}$ ) zusammen mit dem zytosolischen pH-Wert, die mit Hilfe zusätzlich eingestochener H<sup>+</sup>-sensitiver Elektroden angefertigt wurden, zeigten die Kopplung des SUC-Transports an H<sup>+</sup>. In Anwesenheit von SUC wurden negative Einwärtsströme gemessen, während das Zytosol parallel dazu über die Zeit ansäuerte. Wurde die SUC entfernt, erloschen die Einwärtsströme und die pH-Elektroden detektierten im Zytosol zunehmend basischere Werte. Es wurde für ZmSUT1 ein SUC/H<sup>+</sup>-Symport mit einer Stöchiometrie von SUC:H<sup>+</sup> 1:1 ermittelt. Eine starke pH-Abhängigkeit des SUC-Transports zeigte sich in deutlich abnehmenden  $I_{ss}$  bei abnehmender H<sup>+</sup>-Konzentration. Bei einem pH von 4,5 konnten makroskopische H<sup>+</sup>-Einwärtsströme gemessen werden, während ab einem pH-Wert von 7 keine SUC-induzierte Transportaktivität mehr detektiert werden konnte.

Die Transportaktivität und damit die Höhe des gemessenen Stroms nahmen mit hyperpolarisierenden Spannungen zu. Der  $K_m$ -Wert für SUC bei einem physiologischen pH-Wert von 5,6 und einer Membranspannung von -100 mV betrug ca. 7 mM SUC, während die SUC-Affinität bei pH 6,5 auf etwa 25 mM verringert war. Der  $K_m$ -Wert wies eine starke Spannungsabhängigkeit auf: Sowohl bei pH 5,6 als auch bei pH 6,5 sanken die  $K_m$ -Werte bei hyperpolarisierenden Spannungen (Carpaneto et al., 2005). Die Affinität von ZmSUT1 gegenüber den cotransportierten H<sup>+</sup> stieg ebenfalls mit

hyperpolarisierenden Membranspannungen. Die Autoren konnten zeigen, dass ZmSUT1 je nach Membranspannung,  $H^+$ - und SUC-Gradienten in der Lage ist, SUC entweder in die Zelle aufzunehmen, oder aus der Zelle abzugeben. Anhand von Oozyten-Aufnahme- und -Abgabeexperimenten unter Verwendung radioaktiver [ $^{14}C$ ]-SUC konnten zwei Richtungen des Transports direkt gezeigt werden. In Giant-Patch-Clamp Versuchen wurde im inside-out Modus die zytosolische SUC-Konzentration soweit angehoben bis sich die  $H^+$ -Ströme umkehrten. Das bedeutet, dass die Kopplung des  $H^+$ - und SUC-Transports bei ZmSUT1 so stark ist, dass der SUC-Gradient den  $H^+$ -Strom antreiben kann. Die resultierenden Transportströme ( $I_{ss}$ ) ergaben interne  $K_m$ -Werte, die eine mehr als 20 mal niedrigere Affinität gegenüber SUC auf der zytosolischen Seite belegen. Aufgrund der Eigenschaft in beide Richtungen arbeiten zu können, besteht die Hypothese, dass ZmSUT1 eine duale Rolle in *Zea mays* übernimmt und sowohl bei der Beladung wie auch der Entladung des Phloems mitwirkt.

Das Binden von  $H^+$  im elektrischen Feld der Membran eines Proteins kann mit Untersuchungen der Membrankapazität ( $C_m$ ) sowie von pre-steady-state Strömen ( $I_{pre}$ ) studiert werden. Die „paired-ramp“-Methode (Schmitt, 2002) ermöglicht ein simultanes Messen von Transportströmen ( $I_{ss}$ ) und  $C_m$  über der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten. Unter Verwendung dieser Methode konnten Carpaneto et al. (2010) mit kontinuierlichen Messungen der  $C_m$  bei Zugabe von SUC ein konzentrationsabhängiges und reversibles Absinken der  $C_m$  beobachten. Diese Abnahme der  $C_m$  nahm mit steigenden SUC-Konzentrationen zu. Weitere Messungen konnten einen Einfluss der  $H^+$ -Konzentration des externen Mediums in Abwesenheit von SUC auf die  $C_m$  belegen. Je höher die  $H^+$ -Konzentration gewählt wurde, umso stärker nahm die  $C_m$  zu. Es konnte gezeigt werden, dass die  $C_m$  neben der  $H^+$ -Konzentration auch durch die angelegte Spannung maßgeblich beeinflusst wird (Carpaneto et al., 2010).

Pre-steady-state Ströme ( $I_{pre}$ ) sind transiente Ströme, die durch Ladungsverschiebungen im elektrischen Feld der Membran entstehen (Boorer et al., 1994; Boorer et al., 1996; Loo et al., 1998; Fesce et al., 2002; Carpaneto et al., 2010). Bei Carriern sind diese Ströme lediglich in der Abwesenheit des Substrats und in Anwesenheit der cotransportierten Ionen zu detektieren. In Anwesenheit von sättigenden

Substratkonzentrationen erlöschen die  $I_{pre}$  und es sind lediglich Transportströme messbar. Die weiteren Analysen zeigten, dass  $I_{pre}$  mit dem Binden der  $H^+$  an den Transporter innerhalb des elektrischen Feldes der Membran in Verbindung gebracht werden können. Dies führte zur Aufklärung des ersten Schritts im Transportzyklus von ZmSUT1 - dem Binden der  $H^+$  (Carpaneto et al., 2010).

Im Rahmen einer Studie von Derrer et al. (2013) wurde der Transportmechanismus von ZmSUT1 in weitere einzelne Schritten zerlegt und ein erstes Modell des Reaktionszyklus beschrieben. Hierfür wurden Untersuchungen von  $I_{pre}$  mit der Methode der Spannungsklemmen-Fluorometrie (VCF) kombiniert. Die VCF-Methode stellt eine Möglichkeit dar, intramolekulare Bewegungen eines Proteins in Echtzeit sichtbar zu machen (Mannuzzu et al., 1996; Loo et al., 1998; Geibel et al., 2003). Dabei bedient man sich eines kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs am ZmSUT1-Protein, dessen emittierte Fluoreszenzintensität ein Indikator für intramolekulare Bewegung des Transporters repräsentierte. Aufgrund von Konformationsänderungen des Proteins gelangt der Fluoreszenzfarbstoff in eine andere Umgebung/Lage, wodurch die Fluoreszenzemission gequencht wird. Durch die Kombination der VCF-Methode und  $I_{pre}$ -Messungen und unter Verwendung des kompetitiven Inhibitors Sucralose gelang es, die Konformationsänderung als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Transportmechanismus von ZmSUT1 zu identifizieren (Derrer et al., 2013).

### **1.8 SUC-Transporter anderer Organismen**

Inzwischen ist eine große Anzahl pflanzlicher SUC-Transporter bekannt und zum Teil funktionell untersucht (Bush, 1990; Gahrtz et al., 1994; Sauer & Stolz, 1994; Boorer et al., 1996; Zhou et al., 1997; Chandran et al., 2003; Knop et al., 2004; Carpaneto et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sivitz et al., 2007). Auch in Bakterien findet man SUC-spezifische Protonen-gekoppelte Transporter, wie z. B. den SUC/ $H^+$ -Symporter CscB aus *E.coli* (Abramson et al. 2003). Lange Zeit ging man dagegen in tierischen Organismen davon aus, dass die Aufnahme von Kohlenhydraten nur durch Hexosetransporter

vermittelt wird. SUC, nahm man an, wird von Bakterien im Lumen des Darms zu Hexosen gespalten und dann in dieser Form in die Blutbahn aufgenommen. Daher war kürzlich die Entdeckung des ersten tierischen SUC-Transporters eine Überraschung. Eine Arbeitsgruppe aus Osnabrück entdeckte den ersten tierischen SUC-Transporter SCRT in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Meyer, 2011). Die vorhergesagte Struktur ist mit 12 transmembranen Domänen typisch für ein Mitglied der MFS und nach Expression des Proteins in Hefen konnte mittels [<sup>14</sup>C]-SUC Aufnahmeexperimenten ein  $K_m$ -Wert für SUC von 16 mM ermittelt werden. Wie in pflanzlichen und bakteriellen Organismen wurde ein H<sup>+</sup>-gekoppelter Transport ermittelt, der durch das Protonophor CCCP fast vollständig inhibiert wurde (Meyer, 2011). Sucht man nach homologen Proteinen in bereits sequenzierten Abschnitten von Säugern, wird man auch im menschlichen Genom fündig. Vier Proteine der SLC45-Familie des Menschen weisen deutliche Gemeinsamkeiten zum SUC-Transporter SCRT aus *Drosophila* auf. Diese tierischen Transporter weisen interessanterweise auch das SUC-Transporter spezifische Motiv - RxGRR- auf, das man in pflanzlichen SUC-Transportern findet (Lemoine, 2000).

Der erste SUC-Transporter aus Pilzen wurde im Jahre 2010 entdeckt und charakterisiert. Es handelt sich um das Protein UmSRT1 aus dem Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*) und wird als hochaffiner, spezifischer SUC-Transporter beschrieben (Wahl et al., 2010, siehe Kap. 1.8.1).

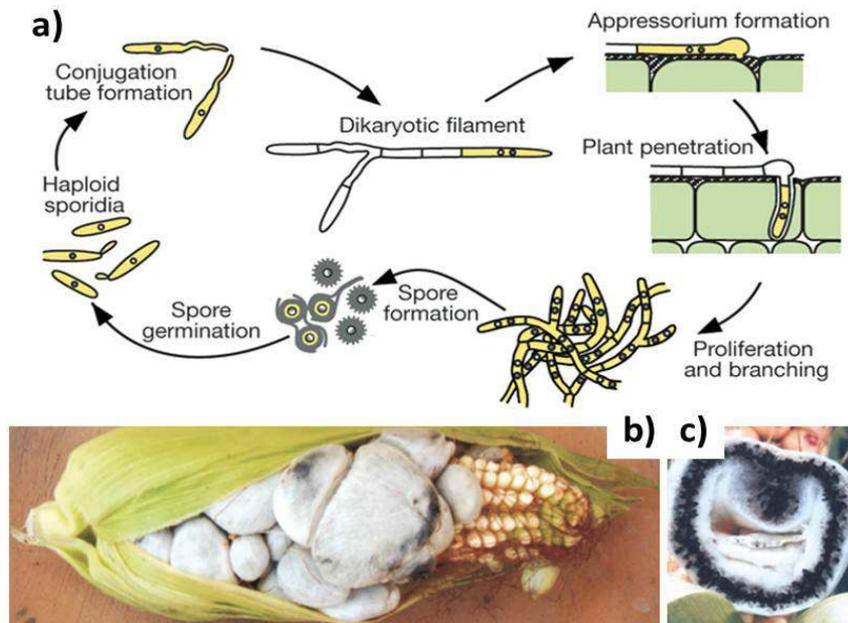
### **1.8.1 UmSRT1**

Pilze (*Fungi*) gehören zu den eukaryotischen Lebewesen und bilden neben Pflanzen und Tieren ein eigenes Reich. Im Gegensatz zu Pflanzen, die in der Lage sind sich vollständig photoautotroph zu ernähren, sind Pilze heterotrophe Organismen, die im Laufe der Evolution unterschiedliche Strategien der Ernährung entwickelt haben. In der Regel besteht der Vegetationskörper der Pilze aus einem feinfädigen, verästelten Thallus, dessen einzelne Fäden als Hyphen bezeichnet werden. Die Hyphen bilden meist ein weit ausgedehntes, den Wirt, bzw. das Substrat durchsetzendes Geflecht, welches eine große Oberfläche und damit viel Kontaktzone zur Nahrungsaufnahme aufweist (Mendgen &

Hahn, 2002). Viele nekrotrophe Pilzarten beziehen ihre Nährstoffe aus sterbendem, oder totem Gewebe, während biotrophe Arten ihren Wirt nach der Infektion nicht zerstören, um sich bis zu mehreren Monaten von lebendigem Material zu ernähren (Mayer, 1989; Hahn & Mendgen, 2001). Biotrophe Pilze zeigen eine dementsprechend sensitive Strategie der Infektion, um heftige Abwehrreaktionen der Wirte zu vermeiden. Deshalb werden beim Eindringen in den Wirt oft natürliche Öffnungen, z. B. Stomata, oder bestehende Verwundungen in Pflanzen genutzt, um den Schaden an den Wirtszellen so gering wie möglich zu halten (Tucker & Talbot, 2001; Talbot, 2010). Anhand der verschiedenen Ernährungs- und Infektionsmechanismen unterscheidet man bei den Interaktionen der Pilze und ihren Wirtsorganismen zwischen Symbiosen und Parasitismus.

Der Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*) gehört zu den *Basidiomyceten* und ist ein omnipräsenter, hochspezialisierter Pilz mit einer biotrophen Lebensweise. Der phytopathogene Maisbeulenbrand ist hoch spezialisiert befällt somit ausschließlich Maispflanzen (*Zea mays*). Der Pilz kann alle oberirdischen Teile der Pflanze befallen, bevorzugt werden jedoch Meristeme, die noch teilungsfähig und im Wachstum sind. Verschmelzen zwei haploide Sporen, entsteht ein dikaryotisches, infektiöses Filament (Abbildung 1.5a). Gelangt dies auf die Oberfläche des Maisblatts, bildet sich ein Appressorium, mit dem der Pilz in das Pflanzengewebe eindringen und unter Bildung eines Hyphengeflechts interzellulär weiter wachsen kann. Die Hyphengeflechte wachsen gezielt entlang des Phloems der Maispflanzen und bilden damit eine große Kontaktfläche in nächster Nähe der SUC gefüllten Leitbündel (Tucker & Talbot, 2001; Doehlemann et al., 2008). Mittels Invagination bilden die pilzliche Zellwand zusammen mit dem Apoplasten der Pflanze einen extrazytoplasmatischen Raum. Die pflanzliche Plasmamembran wird nicht zerstört sondern lediglich eingestülpt. Diese Kontaktzone zwischen Pilz und Pflanze, bei der beide Organismen durch ihre Plasmamembranen separiert bleiben, stellt für den pathogenen Pilz die Versorgungsquelle mit Nährstoffen dar (Hahn, 2001). Durch die Weiterentwicklung des Pilzes entsteht ein Netz aus Hyphen, welches im weiteren Verlauf zur morphologischen Veränderung des Wirtsgewebes führt. Zellen in direkter Umgebung werden zu

Größenwachstum und vermehrter Zellteilung angeregt, was die Ausbildung infektionsbedingter Merkmale nach sich zieht. Befallene Pflanzen sind makroskopisch gut an ihren tumor- und gallenartigen Wucherungen erkennbar (Abbildung 1.5b).



**Abbildung 1.5: Infektion von *Zea mays* durch *Ustilago maydis***

a) Schematische Darstellung des Fortpflanzungszyklus von *Ustilago maydis*. b) Abbildung eines nach der Infektion befallenen Maiskolbens mit charakteristischen Tumoren. c) Querschnitt vom Inneren eines Tumors mit zahlreichen schwarzen Sporen (Kamper et al., 2006).

In den tumorartigen Gallen sind große Mengen schwarze Sporen enthalten (Abbildung 1.5c), die den Maispflanzen nach dem Aufplatzen der Gallen das „brandige“ Aussehen verleihen (Kamper et al., 2006; Brefort et al., 2009; Talbot, 2010). Da vermutet wurde, dass der Pilz das pflanzliche Phloem als Zuckerquelle anzapft, wurde nach Aufnahmesystemen für SUC in der pilzlichen Plasmamembran gesucht. Das identifizierte Gen eines SUC-Transporters aus der Plasmamembran von *U. maydis* wurde daraufhin von Wahl et al. im heterologen Expressionssystem der Hefen untersucht. Es handelt sich um ein Protein bestehend aus 546 AS und laut Hydrophobizitätsanalysen (TMHMM Server; Sonnhammer et al., 1998) aus 12 vorhergesagten Transmembranen. Zwischen TM I und TM II befindet sich ein langer extrazellulärer Loop, ein typisches Merkmal

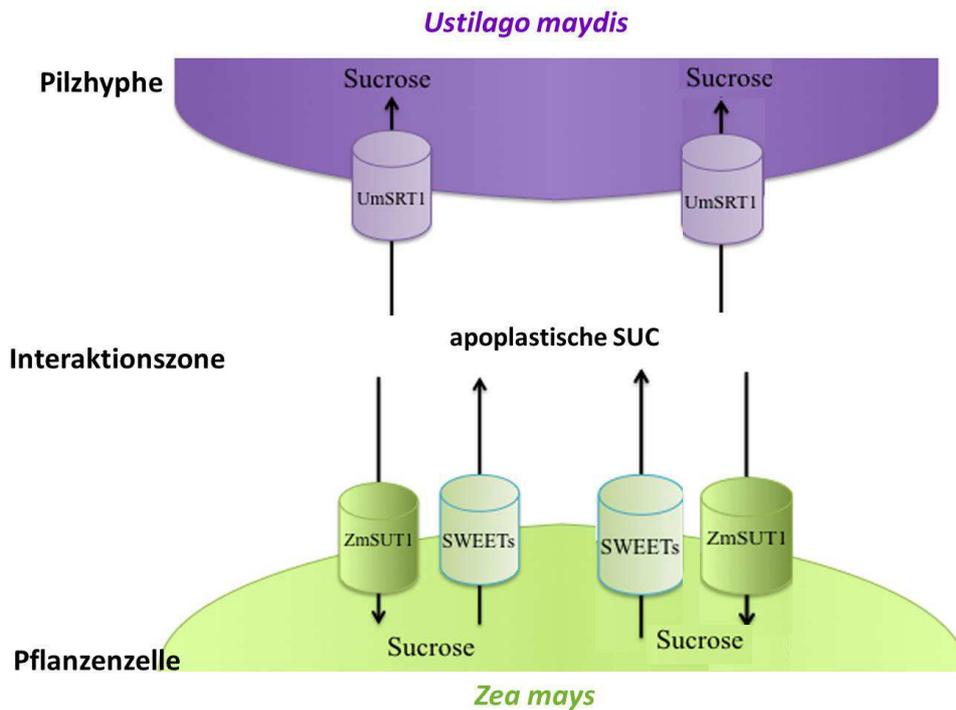
pflanzlicher und pilzlicher Monosaccharid-Transporter (MST) (Buttner and Sauer, 2000). Phylogenetische Sequenzanalysen ordnen den Transporter den STPs (*sugar transport proteins*) und darin einer kleinen Gruppe bisher uncharakterisierter Proteine, deren weitere Vertreter aus *Aspergillus*-, *Sporisorium*- und *Ustilago*- Arten bestehen zu. Diese Gruppe steht den putativen Maltose- und  $\alpha$ -Glucosidtransportern aus Pilzen am nächsten (Wahl et al., 2010).

Mithilfe eines UmSRT1::GFP-Fusionsproteins konnte die subzelluläre Lokalisation von UmSRT1 in den Plasmamembranen der Hefen gezeigt werden. Die Substratabhängigkeit wurde mittels [ $^{14}$ C]-Aufnahmeexperimenten mit UmSRT1-exprimierenden Hefen getestet. Hierfür wurde der Hefestamm SEY2102 verwendet, dessen Invertase-Gen *ScSUC2* inaktiviert vorliegt und eine Anreicherung der SUC in den Zellen ermöglicht. Diese Experimente wurden bei pH 5,5 durchgeführt und ergaben einen niedrigen  $K_m$ -Wert von 26  $\mu$ M und damit eine sehr hohe Affinität gegenüber SUC. Mithilfe von Kompetitionsanalysen konnte Raffinose mit einer sehr geringen Transportrate als alternatives Substrat für UmSRT1 identifiziert werden. Es konnte eine pH-Abhängigkeit des SUC-Transports herausgearbeitet werden, dessen Optimum im sauren Bereich bei pH 5 liegt. Die Transportaktivität von UmSRT1 wird in Anwesenheit des Protonophors CCCP um etwa 50 % gehemmt. Somit konnte UmSRT1 als ein energieabhängiger SUC/H<sup>+</sup>-Symporter beschrieben werden, der SUC mit einer ausgesprochen hohen Affinität und Spezifität transportiert. Des Weiteren konnte mit Infektionsversuchen junger Maispflanzen eine rasche Induktion der Genexpression von UmSRT1 nach 1-2 Tagen beobachtet werden. Das Expressionslevel nahm zwischen 4-8 Tagen nach Infektion der Maispflanzen rapide zu. Beobachtungen des Infektionsverlaufs der Maispflanzen, 7 Tage nach der Infektion mit dem jeweiligen Pathogen, ergab für den WT (SG200) die Ausbildung der erwarteten Symptome wie formveränderte, chlorotische Blätter, sowie massiver Tumorbildung auf Blättern und Stängeln. Die Infektion mit einem Stamm, der ein funktionelles UmSRT1-GFP-Fusionsprotein exprimiert (SG200 $\Delta$ srt1::srt1-GFP), führte ebenfalls zu einer solchen Symptomentwicklung. Die Pflanzen, die mit dem *Umsrt1*-Deletionsstamm infiziert wurden (SG200 $\Delta$ srt1), wiesen jedoch nur sehr geringe Symptome einer Infektion auf und waren in ihrer Entwicklung optisch kaum

beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass UmSRT1 eine essentielle Rolle in der Virulenz des Pathogens übernimmt. Eine hohe Akkumulation von SUC in Hefezellen, sowie die Insensitivität gegenüber PCMBs lassen vermuten, dass UmSRT1 ein neuartiger SUC-Transporter ist, da er sich funktionell und strukturell (Mitglied der MST-Familie) von pflanzlichen SUC-Transportern unterscheidet (Wahl et al., 2010).

Im Gegensatz zum Immunsystem tierischer Organismen verfügen Pflanzen nicht über spezialisierte Zellen, die der Abwehr von Pathogenen dienen. Die erste Strategie der Verteidigung besteht aus einer mechanischen Barriere, die von Kutikula und Zellwand gebildet wird. Im pflanzlichen Organismus verfügt jedoch jede einzelne Zelle über das Potential, Abwehrmechanismen zu entwickeln und systemische Signale, als Folge eines Angriffs, aussenden und empfangen zu können (Dangl & Jones, 2001; Ausubel, 2005). Dies stellt somit die zweite Verteidigungsstrategie dar. Ist ein Pathogen einmal wahrgenommen, reagiert die Pflanze mit der raschen Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickoxiden, sowie der Aktivierung der Synthesewege des Sekundärstoffwechsels (Hahn, 2001). Dies resultiert in der zusätzlichen Bildung von chemischen Barrieren (Phytoalexinen) und mechanischen Barrieren durch die Verstärkung der Zellwand, indem Kallose, Silikate oder Lignin eingelagert werden (Mayer, 1989; Nurnberger & Scheel, 2001). Auch die Auslösung von Zelltod-Mechanismen trägt oft zur lokalen Eindämmung des Pathogens bei. Um jedoch nicht nur eine Wirkung auf infizierte, sondern auch weiter entfernte Bereiche entfalten zu können, wird die Bildung von Signalmolekülen wie Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen verstärkt (Glazebrook, 2005).

Die bislang bekannten Hexosetransporter der Pilze bevorzugen Gluc oder Fruc als Substrat, weshalb vor der Aufnahme in die Hyphen eine extrazelluläre Spaltung der SUC durch Invertasen notwendig ist (Ehness et al., 1997; Kocal et al., 2008). Diesem Mechanismus haben sich die Pflanzen angepasst, indem sie aufgrund der Invertaseaktivität, auf Veränderungen der extrazellulären Gluc-Konzentration, mit der Induktion von Abwehrmechanismen reagieren (Herbers et al., 1996a; Herbers et al., 1996b).



**Abbildung 1.6: Schema der Pilz/Pflanze-Interaktionszone**

*U. maydis* dringt mit interzellulärem Wachstum der Hyphen bis zu den Zellen des Phloems vor und infiziert diese ohne die Plasmamembran zu zerstören. Somit bilden die Plasmamembranen von *Z. mays* und *U. maydis* einen gemeinsamen extrazellulären Raum, der die Kontaktzone zwischen Pilz und Pflanze darstellt. Hier ist es für *U. maydis* möglich, mittels UmSrt1 eine direkte SUC-Aufnahme ohne vorhergehende SUC-Hydrolyse zu bewerkstelligen. Somit stehen UmSrt1 und ZmSUT1 möglicherweise in direkter Konkurrenz um die apoplastische SUC (modifiziert nach Lemoine et al., 2013).

UmSRT1, der zum direkten Transport von SUC in der Lage ist, benötigt keine extrazelluläre Invertaseaktivität. Somit wird *U. maydis* anhand dieses Mechanismus nicht als Pathogen erkannt und enttarnt.

Betrachtet man die lokale Situation, die in Abbildung 1.6 dargestellt ist, ist ZmSUT1 in der pflanzlichen und UmSRT1 in der pilzlichen Plasmamembran exprimiert (Wahl et al., 2010; Lemoine et al., 2013). Diese Membranen liegen einander gegenüber und bilden die Kontaktzone der Pflanze/Pilz-Interaktion. Somit stellen die beiden in der jeweiligen Plasmamembran lokalisierten SUC-Transporter UmSrt1 und ZmSUT1 Konkurrenten um die extrazelluläre SUC im Apoplasten dar.

## 1.9 Zielsetzung

Im Forschungsgebiet der SUC-Transporter konnten in den letzten Jahren viele Erkenntnisse bezüglich phylogenetischer Zusammenhänge und Charakterisierungen von Transporteigenschaften der Proteine sowie deren subzellulärer Lokalisationen gewonnen werden. Inzwischen liegen nicht nur Ergebnisse bakterieller und pflanzlicher SUC-Transporter vor. Auch im tierischen Organismus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) konnte ein SUC-Transporter identifiziert werden. Weiterhin stellt UmSrt1 aus dem Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*) den ersten beschriebenen SUC-Transporter aus Pilzen dar.

Interessanterweise begegnen sich zwei SUC-Transporter aus unterschiedlichen Organismen im Falle des Pflanze/Pilz-Pathosystems Mais (*Zea mays*) und Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*). Die derzeitige Hypothese spricht den beiden SUC-Transportern, UmSrt1 aus *Ustilago maydis* und ZmSUT1 aus *Zea mays*, Funktionen als direkte Gegenspieler im Konkurrenzkampf um die für den jeweiligen Organismus existentielle extrazelluläre SUC zu.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vergleichende elektrophysiologische Analysen von ZmSUT1 und UmSrt1 mit der DEVC-Methode im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten angefertigt werden. Die Transporteigenschaften der Proteine sollten bezüglich ihrer Substrat-Abhängigkeit von SUC und  $H^+$  mit anschließender Bestimmung der  $K_m$ -Werte, ihr spannungsabhängiges Verhalten sowie ihre Substratspezifität untersucht werden.

Bisher sind lediglich Kristallstrukturen bakterieller Kationen-gekoppelter Transporter bekannt. Bei  $H^+$ -gekoppelten SUC-Transporten aus Pflanzen sind nur vereinzelte Topologie-Modelle verfügbar. Basierend auf der Kristallstruktur von LacY wurde ein 3-D-Modell von ZmSUT1 generiert, um die Struktur von ZmSUT1 vorhersagen zu können. Anhand dieses Modells sollte schließlich mit Hilfe von Mutagenesestudien gekoppelt mit elektrophysiologischen Experimenten in *Xenopus* Oozyten die Substratbindestelle von ZmSUT1 identifiziert werden.

SUC-Transporter haben eine essentielle Bedeutung für Pflanzen. Das Fehlen oder eine gestörte Funktion dieser Proteine führt zu einem dramatischen Phänotyp, der auf eine gestörte Kohlenstoffverteilung in der Pflanze schließen lässt. Eine Ansammlung von Kohlenstoff in den Blättern, chlorotische Flecken der Blätter und ein reduziertes Wachstum und eine verspätete Blüte mit verkrüppelten Blüten- und Staubblättern sind zu beobachten.

Über die Regulation der Transportaktivität von SUC-Transportern auf posttranslationaler Ebene ist bis heute jedoch nicht viel bekannt. Wenige Ergebnisse belegen, dass die Aktivität der Proteine von Phosphorylierungen, der Interaktion mit anderen Proteinen oder dem Redox-Status abhängt. Daher sollten elektrophysiologische Analysen bezüglich möglicher posttranslationaler Regulationsmechanismen angefertigt werden, die die Redox-Abhängigkeit der Transportaktivität von ZmSUT1 beleuchten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeiten mit *E. coli* Bakterien

Prokaryoten wie *Escherichia coli* eignen sich für die Amplifikation von Plasmid-DNA. Durch Isolation der DNA kann sehr leicht ein Vielfaches der vorher eingesetzten DNA-Menge gewonnen werden. Verwendete *E. coli* Sicherheitsstämme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Institut selbst hergestellte, chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Kap. 2.1.3) verwendet, die auf den Stämmen XL1-Blue MRF<sup>+</sup> (Stratagene) oder auf TOP 10 F<sup>+</sup> (Invitrogen) basierten.

#### 2.1.1 Anzucht der Bakterien

Für eine Vorkultur wurden 5 ml flüssiges LB-/Antibiotika Medium (Kap. 2.7) mit 30 µl Flüssigkultur, einer gepickten Bakterien-Kolonie einer LB-Agarplatte oder direkt von einem Bakterien-Stock in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen angeimpft. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelinkubator (Shaker Model G25“, New Brunswick Scientific).

#### 2.1.2 Herstellung von Bakterienstocklösungen

Vorkulturen oder auch Bakterien auf LB-Platten sind bei 4° C nur begrenzt haltbar. Um Klone über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können empfiehlt es sich, von diesen Bakterien Stocklösungen herzustellen, die bei -80° C gelagert werden. Aus diesen lassen sich dann bei Bedarf neue Vorkulturen animpfen. Dazu wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup 400 µl einer frischen Übernachtskultur mit 400 µl 80 %-igem Glycerin versetzt. Der Ansatz wurde sorgfältig gemixt, bis sich eine homogene Emulsion ergab. Diese in Glycerin suspendierten Zellen wurden sofort in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80° C gelagert.

### 2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Als kompetent werden Bakterienzellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, verstärkt fremde DNA aufzunehmen. Da das Bakterium *E. coli* nicht von Natur aus kompetent ist, muss seine Zellwand durch eine chemische Vorbehandlung für Plasmid-DNA durchlässig gemacht werden. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit Zellen aus einer *E.coli*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und unter aeroben Bedingungen bei 37°C bis zu einer OD 600 angezogen. Nach Abkühlen der Zellen für 10 min auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3500 *g*, 10 min, 4°C) sedimentiert und anschließend in 40 ml TFB1-Puffermedium resuspendiert. Nach einer 10 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Danach wurde das erhaltene Pellet in 4 ml TFB2-Puffermedium aufgenommen. Nach dem Aliquotieren der kompetenten Zellen wurden diese sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.1.4 Bakterien-Transformation und Selektion

Eine Transformation ist der Vorgang, bei dem DNA in eine lebende Zelle eingefügt wird. Die auf -80 °C gelagerten 50µl-Aliquots chemisch kompetenter *E. coli* (Kap. 2.1.3) wurden zu nächst schonend auf Eis aufgetaut und zu der zu transformierenden Plasmid-DNA gegeben. Durch einen Hitzeschock von 45 sek in einem Wasserbad mit 42°C wurde die Plasmid-DNA mit hoher Effizienz in die Bakterienzellen aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis für weitere 3 min inkubiert. Zur Selektion wurden die transformierten Bakterien auf Selektionsplatten ausgestrichen. Diese bestanden aus LB-Medium mit 1,5 % Agar und waren mit dem Antibiotikum Ampicillin in adäquater Menge (50 µg/ml LB-Agar) versetzt. Das Antibiotikum gewährleistete, dass nur transformierte Zellen, die ein Plasmid aufgenommen hatten und dadurch resistent wurden, sich auf dem Selektionsagar vermehren konnten. Die Vermehrung der Zellen erfolgte aerob über Nacht bei 37°C.

### **2.1.5 Isolation der Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien**

Bei der Plasmid-Mini-Präparation wird die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA der Bakterien, sowie den bakteriellen Proteinen getrennt (Zhou et al. 1990). Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 1,5 ml einer Übernacht-Vorkultur (vgl. Kap. 2.1.1) der entsprechenden Bakterien in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 30 sec bei Raumtemperatur (RT) und 13.000 *g* in einer Eppendorf *MiniSpin plus*- Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl verworfen und das Pellet darin resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellwände wurden 300 µl TENS-Lysepuffer zugegeben und es wurde sofort kurz gemixt. Das Lysat wurde mit 150 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) neutralisiert. Anschließend konnten durch Zentrifugation (13 000 *g*, 5 min) die Zellwandbestandteile, die genomische DNA, Lipide und Proteine größtenteils aus der Lösung entfernt werden. Die Plasmid-DNA befand sich weiterhin in der Lösung. Nach der Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe 600 µl Isopropanol, I fiel die Plasmid-DNA aus und konnte durch Zentrifugation (13 000 *g*, 5 min) pelletiert werden. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl 70 %-Ethanol gewaschen (2 min zentrifugiert). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei 37° C in einem Heizblock (QBT digital block heater, Grant Instruments Ltd.) getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in 50µl TE und 1 µl RNase (10 mg/ml) resuspendiert. Die isolierte Plasmid-DNA konnte nun bei -20° C gelagert werden.

## **2.2 DNA-Techniken**

### **2.2.1 Oligonucleotide**

Oligonukleotide sind kurze einzelsträngige DNA-Fragmente, die als „Primer“ bei der PCR (Kap. 2.2.2) verwendet wurden. Diese wurden individuell von der Firma Metabion hergestellt.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Seit 1986 stellt die Polymerase-Kettenreaktion oder auch PCR (*polymerase chain reaction*) ein Verfahren dar, das es ermöglicht, DNA-Fragmente (Templates) *in vitro* schnell und effizient zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Im Wesentlichen besteht sie aus drei aufeinander folgenden Phasen, die mehrfach durchlaufen werden:

1. Denaturierung, 2. Primer-Annealing und 3. Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die Probe auf 95° - 98° C erhitzt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren, d. h. Sekundärstrukturen aufzulösen und die beiden Stränge voneinander zu trennen. Im zweiten Schritt wird die Stringenz über die Temperatur so weit herabgesetzt, dass die gewünschten Primer an die einzelsträngige DNA binden können. Beide Primer sind Oligonukleotide von jeweils ca. 20 bp und jeweils komplementär zu einem der beiden Enden der zu amplifizierenden Sequenz. Wird die Temperatur für diesen Schritt zu niedrig gewählt, binden die Primer meist unspezifisch, ist sie zu hoch, binden die Primer gar nicht. Während der Elongation werden ausgehend von den gebundenen Primern die komplementären Stränge durch eine hitzestabile Polymerase und zugegebenen Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTP's) so verlängert, dass wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Lässt man diesen dreistufigen Zyklus n-mal hintereinander ablaufen, erhält man theoretisch aus einem einzigen DNA-Molekül  $2^n$  neu synthetisierte DNA-Moleküle.

### 2.2.3 IVT-PCR

Mittels einer *in vitro*-PCR (IVT-PCR; Tabelle 2.1) kann ein cDNA-Fragment synthetisiert werden, das als Template zur Herstellung von cRNA durch eine *in vitro* Transkription (IVT; Kap. 2.3.1) dient. Durch den Einsatz von speziellen IVT-Primern entstanden lineare DNA-Matrizen. Die Bindestellen der Primer wurden in den verwendeten Vektoren so gewählt, dass die DNA-Matrizen den für die *in vitro* Transkription benötigten Promotor der viralen T7-RNA-Polymerase, die am 3' und 5' Ende des Gens befindlichen untranslatierten Regionen (UTRs), sowie die dazwischen sitzende klonierte cDNA

enthielten. Die PCR-Reaktion fand nach einem selbst gestalteten Programm in einem PCR-Cycler der Firma Eppendorf statt (Tabelle 2.2). Die Elongationszeit  $x$  richtete sich nach der Größe des zu generierenden DNA-Fragments. Das PCR-Produkt wurde nach einer Überprüfung auf einem Agarose-Gel und einer Aufreinigung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) zur *in vitro* Transkription herangezogen oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Tabelle 2.1: Ansatz einer IVT-PCR mit Gesamtvolumen 50  $\mu\text{l}$**

Reagenz	eingesetzte Menge
Plasmid-DNA	
Phusion $C_x$ DNA-Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{l}$
5x Reaktionspuffer Phusion HF	10 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (je 10 mM)	1 $\mu\text{l}$
IVT-Primer forward (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
IVT-Primer reverse (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Nuklease-freies $\text{H}_2\text{O}$	35 $\mu\text{l}$

**Tabelle 2.2: PCR-Cycler Programm einer IVT-PCR**

Status	Zyklen	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit [s]
Denaturierung	1	98	60
Denaturierung	} 30	98	20
Primer-Annealing		56	25
Elongation		72	$x$
Abschluß der Synthese	1	72	60

#### 2.2.4 USER-Klonierungsverfahren

Klonierungsarbeiten wurden mit der USER<sup>TM</sup> (racil-specific excision reagent) -Methode (New England Biolabs) nach (Nour-Eldin et al., 2006) angefertigt. Diese Technik macht herkömmliche Methoden mit Restriktions- und Ligationsschritten im Klonierungsverfahren überflüssig. Sie beruht darauf, dass am 5'- und 3'-Ende des Inserts

und des Vektors Überhänge von 8 bp generiert werden. Diese sind komplementär zueinander und ergeben ein stabiles Hybridisierungsprodukt, welches ohne eine separate Ligation in *E.coli* Bakterien transformiert werden kann.

### 2.2.4.1 Präparation der Vektoren

Durch eine 38 bp lange PacI-USER-Kassette werden Vektoren kompatibel für das USER-Verfahren gemacht. Diese wird in die *multiple cloning site* (MCS) des Vectors eingebracht (Nour-Eldin et al., 2006). Durch die Behandlung mit dem Restriktionsenzym PacI (Fermentas) wurden die Vektoren aufgeschnitten. Mit Hilfe des Enzyms Nt.BbvCI (New England Biolabs Inc.), das nur einen Strang der doppelsträngigen DNA durchschneidet, entstanden 3'-Überhänge von 8 bp, die nicht komplementär zueinander waren. Somit wurden Rehybridisierungen des Vektors verhindert und für eine gerichtete Insertion gesorgt. Der generierte USER Vektor pNBlu 16 besitzt eine Ampicillin-Resistenz und wurde mit insgesamt 60 U DNA-Restriktionsenzym PacI/5 µg Plasmid linearisiert und durch anschließende Behandlung mit 20 U NtBbvCI konnten die 8 nt langen (nicht komplementären) 3'-Überhänge erzeugt werden. Nach einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung wurde der linearisierte Vektor aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4.2 Präparation der Inserts (USER-PCR)

Damit die zu klonierenden DNA Fragmente in den vorbereiteten Vektor eingebracht werden können, müssen diese 5'-Überhänge besitzen, die komplementär zu den 3'-Überhängen der Vektoren sind. Diese „sticky ends“ werden mit speziell designten Primern erzeugt. Dazu wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (Kap. 2.2.2) mit Insert-spezifischen Primern durchgeführt. Der Primer *fwd* besaß zusätzlich 5' die Sequenz (5' GGCTTAAU + Insert), während der Primer *reverse* die Sequenz (komplementär zum Insert + UAATTTGG 5') enthielt. Für die PCR wurde die DNA Polymerase Phusion™ (Finnzymes) benutzt. Die DNA-Fragmente wurden während der PCR um die spezifischen 8 bp-Überhänge verlängert und somit USER-kompatibel. Anschließend wurde das PCR-

Produkt mit 10 U *DpnI* für 60 min. inkubiert, um stabile Ausgangs-DNA zu eliminieren. Nun wurde das PCR-Produkt für weitere molekularbiologische Arbeiten verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.4.3 Durchführung des USER-Klonierungsverfahrens

Zusammengefügt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden der vorbereitete Vektor pNBlu16, das PCR-Produkt und der USER-Enzymmix (New England Biolabs Inc.). Dieser Ansatz wurde für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 30 min bei  $25^{\circ}\text{C}$  in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler personal) inkubiert. Während dieser Zeit entstand das stabile Hybridisierungsprodukt, das nun für Transformationen in entsprechend chemisch kompetente Bakterien (Kap. 2.1.3) verwendet werden konnte.

**Tabelle 2.3: Standardansatz einer USER-Reaktion**

Reagenz	eingesetzte Menge
Vector-DNA	1,5 $\mu\text{l}$
PCR-Produkt	3 $\mu\text{l}$
USER-Enzym Mix	1 $\mu\text{l}$
TE-Puffer	4,5 $\mu\text{l}$

### 2.2.4.4 User-Mutagenese PCR

Es wurden in dieser Arbeit Mutanten von ZmSUT1 hergestellt, die sich in einzelnen Aminosäuren vom WT unterschieden. Dies wurde mittels Mutagenese-PCR, die eine spezielle Form der USER-PCR darstellt, vorgenommen. Bei dieser modifizierten USER-Methode (Norholm, 2010) kann eine gezielte Mutation in cDNA eingefügt werden, es kann sich um eine Punktmutation, eine Deletion oder um einen Austausch ganzer Sequenzen handeln. Dafür wurde eine normale PCR mit speziellen Mutagenese-Primern auf der Plasmid-DNA des Klons durchgeführt. Dazu setzen die Primer im Gegensatz zu einer normalen PCR nicht an den Enden des Konstrukts auf, sondern an der Stelle, an der

die Mutation eingefügt werden soll und überlappen mit 8-11 Basenpaaren. Durch das Verändern einzelner Basen in den Primern lassen sich Aminosäuren im translatierten Protein austauschen. Das zweite Paar Primer setzt in der Ampizillin-Resistenz des Vektors auf. Es wurden in zwei einzelnen PCRs je ein Teil des Gens und ein Teil des Vektors von der Mutationsstelle in beide Richtungen bis zur Ampizillin-Resistenz repliziert. Anschließend wurden die zwei Hälften in einer USER-Reaktion (Kap. 2.2.4.3) wieder zu einem kompletten Plasmid inklusive des mutierten Gens zusammengefügt. Durch die in den Primern ausgetauschten Basen entstanden dabei die Mutationen an der gewünschten Stelle des Gens. Das zusammengefügte Konstrukt wurde anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert und selektiert (vgl. Kap. 2.1.4).

### **2.2.5 Aufreinigung einer PCR-Reaktion**

Die Aufreinigung einer PCR erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden). Dabei wurden die PCR-Fragmente von Enzymen, Primern und Nukleotiden befreit. Auf 50 µl des PCR-Produktes wurden 400 µl PB-Puffer gegeben. Das gesamte Volumen wurde auf eine QIAquick spin column überführt. Bei höchster Drehzahl wurde 1 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Die in der Säule verbleibenden PCR-Fragmente wurden mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zum Trocknen der Säule folgten zwei Zentrifugationsschritte von je 1 min. Bei der dritten Zentrifugation wurde ein neues Gefäß verwendet, um sicher zu stellen, dass jegliches Ethanol des PE-Puffers entfernt wurde. Anschließend konnten die amplifizierten PCR-Fragmente mit 30 µl Elutions-Puffer eluiert werden. Dies erfolgte durch einen letzten Zentrifugationsschritt von 1 min.

### **2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine Möglichkeit dar, DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Um ein Gel mit 1 % Agarose

herzustellen, wurde 5 g Agarose (Peqlab) in 500 mL 1x TAE-Puffer durch mechanisches Rühren und Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde GelGreen (Biotium) mit einer Konzentration von 5 µl/100ml zugegeben. Das fertige Gel konnte nun in einem Wärmeschrank gelagert werden, damit das Gel nicht auspolymerisierte. In einen Gelschlitten wurden je nach Probenvolumen und -anzahl ein oder zwei Kämme mit mehreren Zähnen gesteckt, die die Probestaschen darstellen und das ca. 60°C warme Gel hinein gegossen. Nach Abkühlung und vollständiger Polymerisation der Agarose wurde das Gel in eine Gelkammer überführt, diese mit 1x TAE-Puffer als Laufmittel gefüllt, den Proben die entsprechende Menge an 5x DNA-Probenpuffer zugegeben und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente parallel aufgetragene λ-DNA (Fermentas), die vollständig mit *Pst*I verdaut worden war (λ-PST-Standard). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 70-100 V angelegt, und das Gel etwa 20-40 min laufen gelassen. Die entstandenen Bandenmuster konnten durch das dem Gel beigefügten GelGreen (Biotium) über Fluoreszenzanregung bei 254-366 nm sichtbar gemacht werden. Die Detektion und photographische Darstellung der entstandenen Banden erfolgte an einem Intas UV Imager (Intas UV-Systeme).

### **2.2.7 DNA-Elution aus einem Agarose-Gel**

Die Elution der elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnittene Bande wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl QG-Puffer folgte eine Inkubation bei 50° C (Eppendorf Thermomixer 5436), bis sich das Gelstück komplett aufgelöst hatte (ca. 10 min). Um dies zu beschleunigen, wurde während der Inkubation geschüttelt. Das Binden der gelösten DNA erfolgte, indem der Ansatz auf eine Membran einer Säule (QIAquick spin column) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 1 min zentrifugiert wurde. Die auf der Säule verbliebene DNA wurde mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, d. h. 1 min zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule eine weitere Minute zentrifugiert, um vom Puffer verbleibendes Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-

Reaktionsgefäß überführt. Um die gebundene DNA zu eluieren, wurden 30 µl Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) mittig auf die QIAquick Membran pipettiert, nach einer kurzen Inkubation bei RT folgte ein weiterer 1 min Zentrifugationsschritt und die eluierte, gereinigte DNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

### **2.2.8 Sequenzierung**

Die Nucleotidsequenz jedes neu klonierten Konstrukts wurde durch eine Sequenzanalyse kontrolliert. Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden in Form einer Plasmid-Mini-Präparation (Kap. 2.1.5), oder als aufgereinigte IVT-PCR (Kap.2.2.3) zum Sequenzieren abgegeben. Die Grundlagen der Sequenzierung beruhen auf der Didesoxy-Methode (Sanger, 1977) und fanden im Labor des Julius-von-Sachs Institutes statt (Hitachi/Applied Biosystems ABI Prism 3100-avant genetic analyzer).

## **2.3 RNA -Techniken**

### **2.3.1 *In vitro*-Transkription (IVT)**

Durch die *in vitro*-Transkription einer DNA-Matrize können große Mengen eines beliebigen cRNA-Moleküls erzeugt werden, die in Oozyten exprimiert werden sollten. Als Ausgangsmaterial hierfür diente eine IVT-PCR (Kap.2.2.3) mit der codierenden Sequenz des Proteins. Der Vektor mußte über die viralen Promotoren Sp6 oder T7 verfügen, die von den RNA-Polymerasen erkannt werden, mit der die IVT durchgeführt wurde. Die Vektoren sind so aufgebaut, dass vor der kodierenden Sequenz (CDS) in 5'- 3'-Richtung der virale Promotor steht. Hinter der CDS folgt die poly(A)-Sequenz, ein kurzer Bereich, der ausschließlich aus mehreren Adenosinen besteht und vor Degradation schützt. Das gereinigte, rekombinierte DNA-Molekül wird mit einer RNA-Polymerase und den vier Ribonucleosid-Triphosphaten gemischt. Bei einer 1,5-2 Std. Inkubation bei 37°C wurden

große Mengen der gewünschten RNA in diesem zellfreien System synthetisiert. Als Template für die cRNA-Synthese wurde die aufgereinigte IVT-PCR (Kap.2.2.3) benutzt. Die DNA-Matrize lag somit gereinigt (Kap.2.2.5) und linearisiert vor und besaß den T7-Promotor. Die Herstellung von cRNA wurde wie folgt durchgeführt:

**Tabelle 2.4: Ansatz einer *in vitro*-Transkription nach AmpliCap-Max™**

Reagenz	eingesetzte Menge
Vector-DNA	2 µg (ca. 6 µl)
10x Transcription Buffer	1 µl
Cap/NTP PreMix	8 µl
DTT (100 mM)	2 µl
T7 Enzyme Solution	2 µl

Dieses Reaktionsgemisch inkubierte 2 Std. bei 37°C. Durch die anschließende Zugabe von 30 µl Lithiumchlorid-Präzipitationslösung (7,5 M Lithiumchlorid und 50 mM EDTA) und 30 µl Nuklease-freiem Wasser wurde die ablaufende Reaktion gestoppt. Es folgte eine Inkubation für mindestens 1 h bei -20°C, in der die synthetisierte RNA ausfiel. Anschließend wurde für 1 h bei 4°C zentrifugiert (13000 g), der Überstand verworfen und das Pellet mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung von 15 min. bei 37°C im Heizblock wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Um die Qualität der RNA zu prüfen, wurde 1 µl in einem Agarose-Gel überprüft (Kap. 2.2.6) und 1 µl für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit im Photometer Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) benötigt. Die Konzentration der RNA wurde auf 0,5 µg/µl eingestellt und stand nun für die Injektion in Oozyten von *Xenopus laevis* zur Verfügung.

### 2.3.2 Analyse von RNA im Agarosegel

Die cRNA, wie auch DNA, kann ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Dies diente zur Überprüfung der Reinheit und dem Denaturierungsgrad der vorliegenden RNA. Dafür wurde ein 1% Agarosegel hergestellt,

indem 0,5 g Agarose in 41 ml MEN-Puffer durch Aufkochen gelöst wurde. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 9 ml Formaldehyd 37% und 2,5 µl des Fluoreszenzfarbstoffs GelGreen (Biotium) (5 µl/100ml) hinzugegeben. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel in einen Gelschlitten mit einem entsprechenden Kamm gegossen. Es wurden 1 µl cRNA mit 3 µl 4x RNA-Probenpuffer gemischt. Zur Zerstörung der Sekundärstrukturen wurde das Gemisch in einem Heizblock 5 min auf 65°C erhitzt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 60-70 V mit 1x MEN als Laufpuffer. Die Dokumentation erfolgte photographisch am UV Imaging System (Intas UV Imager).

### 2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren (DNA und RNA) erfolgte mit Hilfe von UV-Photospektrometrie am NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific) über Messung der optischen Dichte (OD). Gemessen wurde bei  $\lambda=260\text{nm}$  ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren und bei  $\lambda=280\text{nm}$  ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Über den Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  konnte zusätzlich die Proteinkontamination der Probe ermittelt werden.

## 2.4 Arbeiten mit Oozyten von *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis* ist nicht nur ein Modellorganismus der Entwicklungsbiologie. Aufgrund ihrer Größe lassen sich die Oozyten sehr gut elektrophysiologisch mit der DEVC-Methode untersuchen. Ihre verhältnismäßig große Oberfläche ermöglicht es, mit Elektroden relativ leicht einzustechen und Ströme ableiten zu können. Die Oozyte hat einen Durchmesser von ca. 1mm und sie enthält, verglichen mit einer normalen Körperzelle, ein Vielfaches an Zytoplasma (500 nl). Bereits seit 1971 werden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem erfolgreich eingesetzt. Gurdon et al. entdeckten, dass nach Injektion von fremder RNA in

*Xenopus* Oozyten, das entsprechende Protein translatiert und in die Plasmamembran eingebaut wird (Gurdon et al., 1971) Daraufhin konnte die funktionelle Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen von Gunderson et al. und Miledi et al. gezeigt werden (Gundersen et al., 1983b; Gundersen et al., 1983a; Miledi et al., 1983). Heute zählt dieses Expressionssystem zu den Standardmethoden bei der Untersuchung von Membranproteinen.

### 2.4.1 Operative Entnahme der Oozyten

Die südafrikanischen Krallenfrösche wurden von Nasco (Fort Atkinson, Texas, USA) bezogen und in kleinen Gruppen von 5 Tieren in Aquarien bei 18-20°C Wassertemperatur gehalten. Die Entnahme von Oozyten erfolgte nach 30 min Narkotisierung des Frosches mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-ethylester; 0,75g/l) auf Eis. Hierzu wurden die Bauchhaut und das darunter liegende Muskelgewebe mit einem ca. 1 cm langen Schnitten geöffnet. Es wurden möglichst vollständige Ovarlappen mit Hilfe einer Pinzette entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger ND96-Lösung aufbewahrt. Nach der Operation wurden die Schnitte wieder vernäht und der Frosch zum Aufwachen in ein gesondertes Becken gesetzt. Die Ovarlappen wurden anschließend unter einem Binokular mit Uhrmacherpinzetten in kleine Stücke von 8-12 Oozyten zerteilt, um eine möglichst große Oberfläche für den anschließenden Collagenaseverdau zu bilden. Nach mehrfachem Waschen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung wurden sie in 0,263 PZU/mg Collagenase für 1,5 Std bei Raumtemperatur geschüttelt, um sie von den Follikelzellen und restlichem Bindegewebe zu befreien. Erneutes Waschen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung sorgte für die Abtrennung der Follikelzellen und dem Entfernen der Collagenase von den Oozyten. Zur Aufbewahrung bei 16°C im Klimaschrank wurden die Oozyten in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger ND96-Lösung mit Gentamycin (25 µg/l) überführt. Bei täglichem Wechsel der Aufbewahrungslösung konnten die Oozyten bis zu fünf Tage nach der Injektion für Messungen verwendet werden.

#### **2.4.2 Injektion von RNA in die Oozyten von *Xenopus laevis***

Die Injektion der cRNA erfolgte ca. 3-24h nach der Präparation der Oozyten mittels des Nanoject II Auto Nanoliter Injectors (Drummond) durch welchen 50nL cRNA pro Oozyte injiziert wurde. Dafür wurden aus Glaskapillaren (31/2“ Drummond #3-00-203-G/X (Drummond Scientific Company) mit dem Kapillarziehgerät (Scientific Instrument Lab, Narishige Japan) Injektionskapillaren gezogen. Der Durchmesser der Mikropipetten betrug maximal 1-2  $\mu\text{m}$ . Die feine, ausgezogenen Spitze wurde unter dem Mikroskop abgebrochen (Mikroschmiede, Leitz), um die Oozytenmembran leichter durchstoßen zu können. Zur Injektion musste die Mikropipette vollständig mit einem inerten, inkompressiblen Öl gefüllt werden, bevor die cRNA in die Spitze der Kapillare aufgezogen wurde. Die injizierten Oozyten wurden bei 16°C aufbewahrt. Nach ca. 3-4 Tagen war das Expressionsniveau so hoch, dass die Oozyten mit Hilfe der DEVC-Technik gemessen werden konnten.

### **2.5 Elektrophysiologische Messungen**

#### **2.5.1 Konvention**

Die Differenz zwischen einem Potential auf der zytosolischen Membranseite und dem Potential des extrazellulären Raums bestimmt die Membranspannung. Das extrazelluläre Potential wird konventionsgemäß auf null gesetzt (geerdet). Ein Einstrom von Kationen in die Zelle und ein Ausstrom von Anionen in den extrazellulären Raum, entspricht einem negativen elektrischen Strom. Somit steht ein positiver Strom für einen Ausstrom von Kationen, oder einem Einstrom von Anionen in die Oozyte.

#### **2.5.2 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik**

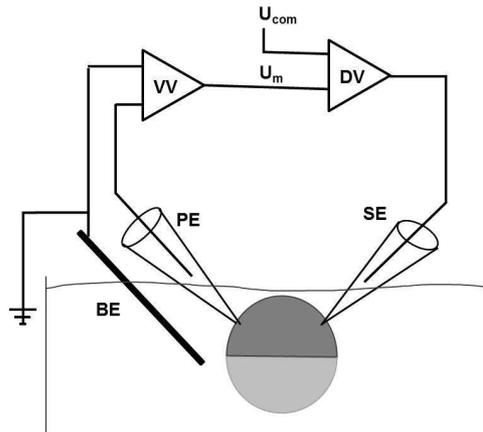
Für die elektrophysiologische Charakterisierung von Membranproteinen in *Xenopus laevis* Oozyten wird das bereits etablierte Messsystem der Zwei-Elektroden-

Spannungsklemmen-Technik (engl. Double-Electrode Voltage-Clamp, DEVC) herangezogen (Finkel & Gage 1985). Diese Methode ermöglicht die Konstanz der Membranspannung bei gleichzeitiger Messung des über die Membran fließenden Stroms.

### 2.5.2.1 Das Messprinzip

Das Grundprinzip der DEVC-Technik beruht darauf, dass zwei Elektroden in eine Oozyte eingestochen werden und ermöglicht die Messung von Strömen, über die ganze Zelle, bei einem definierten Membranpotential (Abbildung 2.1). Die Differenz zwischen dem Inneren der Oozyte und dem Potential im Badmedium stellt das Membranpotential ( $U_m$ ) dar. Dieses wird mit der Potentialelektrode (PE) und der Badelektrode (BE) gemessen und über einen Vorverstärker (VV) an den Differenzverstärker (DV) weitergegeben. Der Differenzverstärker vergleicht nun die Kommandospannung ( $U_{com}$ ) mit der tatsächlich herrschenden Membranspannung ( $U_m$ ). Die andere eingestochene Elektrode wird als Stromelektrode (SE) bezeichnet. Ihre Funktion ist es, den entsprechenden Strom in die Zelle zu applizieren, um die vorgegebene Potentialdifferenz an der Oozytenmembran auszugleichen. Dieser zu applizierende Strom ist proportional zu der auszugleichenden Differenz zwischen der aktuellen Membranspannung ( $U_m$ ) und der gewünschten Kommandospannung ( $U_{com}$ ) dar. Somit stellt der applizierte Strom über die Stromelektrode ein direktes Maß für die Ströme der Transportproteine in der Oozytenmembran dar.

Wird die Membranspannung ( $U_m$ ) sprunghaft geändert, setzt sich der gemessene Strom aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen aus dem kapazitiven Strom  $I_{kap}$ , der durch eine Umladung der Membran hervorgerufen wird und dem Strom, der durch den Ionentransport hervorgerufen wird. Da der kapazitive Strom nur während des kurzen Zeitraums der Umladung der Membran fließt, stört er bei der Charakterisierung der Transportproteine nicht und wurde deshalb auch nicht abgeglichen.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der DEVC-Technik**

Dargestellt sind der Vorverstärker (VV) und der Differenzverstärker (DV), an dem die Kommandospannung ( $U_{com}$ ) und die Membranspannung ( $U_m$ ) verglichen werden. Die herrschende Membranspannung  $U_m$  misst die Potentialelektrode (PE). Über die Stromelektrode (SE) wird der Strom injiziert, der notwendig ist,  $U_{com}$  zu generieren. Die Badelektrode (BE), die mit dem Badmedium verbunden ist, dient als Referenz für PE und SE, sowie der Erdung.

### 2.5.2.2 Der Messaufbau

Die gesamte Messapparatur befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um mechanische Störungen der Umgebung weitestgehend auszugleichen. Ebenso war sie von einem Faraday'schen Käfig umgeben, um elektrische Störungen aus der Umgebung abzuschirmen. Der optische Teil bestand aus einer Stereolupe (SZ40, Olympus) und einer Lichtquelle (KL 1500 electronic, Schott). Die Oozyte wurde in der Mitte einer Badkammer platziert, in der sie gleichmäßig von Lösung umspült wurde. Die Lösungen befanden sich in 50 ml Spritzen und flossen mit einer Perfusionsrate von ca. 0,5 ml/min durch die Badkammer. Mittels einer Vakuumpumpe wurden die Lösungen am hinteren Ende der Badkammer abgesaugt, sodass ein konstanter Flüssigkeitsstrom mit möglichst gleichbleibendem Flüssigkeitsniveau entstand. Die leitenden Bestandteile innerhalb des Faraday'schen Käfigs wurden geerdet. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen) konnten die Elektroden, die in Glaskapillaren eingeführt wurden, in die Oozyte eingestochen werden. Eine Referenzelektrode (BE) wurde an die Erde des

Vorverstärkers der Spannungselektrode angeschlossen und nahe der Oozyte in die Badlösung eingetaucht. Über den Vorverstärker wurde die von der Membran abgeleitete Stromantwort in den eigentlichen Messverstärker Turbo TEC-10 CD (NPI electronics) geleitet. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde durch eine geeignete Filterung im Messverstärker optimiert. Die analogen Signale des Messverstärkers wurden dann mit einem 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert und somit nutzbar für den Messrechner gemacht.

### 2.5.3 Mess-Elektroden und Pipetten

Die Mess- und die Referenzelektroden waren Silber/Silberchlorid-Elektroden, die durch elektrolytische Chlorierung eines Silberdrahtes (World Precision Instruments, Berlin) in 2 M KCl-Lösung hergestellt wurden. Auf der Oberfläche der Silberdrähte befand sich eine Silberchloridschicht (AgCl).



Die Einstichpipetten bestanden aus Borosilikatgaskapillaren und wurden durch das Laserziehgerät KWIK-FIL™ (World Precision Instruments Inc., USA) in zwei Schritten gezogen. Diese wurden mit Hilfe einer Kanüle mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, in welche die Silberelektroden der Vorverstärker eingesteckt wurden. Der Öffnungsdurchmesser der Pipetten betrug 2-3  $\mu\text{m}$  und ihr dadurch resultierender Widerstand in der Badlösung lag im Bereich zwischen 0,4 und 1,4 M $\Omega$ .

### 2.5.4 Datenerfassung und Spannungspuls-Protokolle

Nach Eintauchen der Elektroden in die Messlösung (Current-Clamp Modus am Messverstärker) wurden zunächst die Offset-Potentiale durch Potentiometer auf null abgeglichen. Ebenso wurden die Widerstände von Strom- und Spannungselektrode überprüft. Die Pipetten wurden zunächst auf der Membran aufgesetzt. Dann wurde der Widerstand an den Pipetten durch ein akustisches Signal angezeigt. Durch einen leichten

Stoß auf die Mikromanipulatoren wurde in die Zellen eingestochen, was durch die Veränderung des Widerstands an der Pipettenspitze und der damit verbundenen Änderung des akustischen Signals wahrgenommen werden konnte.

Diverse Spannungspuls-Protokolle wurden mit der Software „Patchmaster“ (HEKA, Lambrecht) erstellt und mittels des Messrechners über den Spannungseingang/-ausgang des Messverstärkers an die Membran angelegt. Nun wurde in den Voltage-Clamp Modus des Messverstärkers umgeschaltet und die Abdichtung zwischen Membran und Pipette mittels eines Testpulses (Abbildung 2.2a) überprüft, um gegebenenfalls vorhandene Leckströme zu detektieren. Dazu wurden 10 ms-Spannungssprünge von +20 und -20 mV relativ zur Haltespannung ( $V_H$ ) mit einer Frequenz von 50 Hz durchgeführt. Es wurden nur Oozyten vermessen, deren Leckströme kleiner als 50 nA waren.

Um die Strom/Spannungs-Beziehungen der Transportproteine zu untersuchen, wurde ein Einfachspannungspuls-Protokolle (IV`s) verwendet, wie in Abbildung 2.2b) dargestellt. Die Haltespannung ( $V_H$ ) betrug für 20 ms -20mV, da dieses Potential annähernd dem natürlichen Membranpotential der Oozyten entspricht. Ausgehend von  $V_H$  wurde bei Einfachspannungspulsen die Testspannung beginnend von +40mV in 10mV-Schritten erniedrigt. Die zu testenden Spannungen wurden für 50 ms angelegt, anschließend wieder die Haltespannung appliziert und der nächste Durchlauf mit einer 10 mV niedrigeren Testspannung initiiert. Für Messungen mit ZmSUT1 betrug die negativste angelegte Spannung -130 mV, bei UmSRT1-Messungen wurden Spannungen bis -180 mV appliziert. Der markierte Bereich in Abbildung 2.2b) kennzeichnet die Stelle, an der die Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ , steady-state currents) für die resultierenden Strom-Spannungskurven extrahiert wurden.

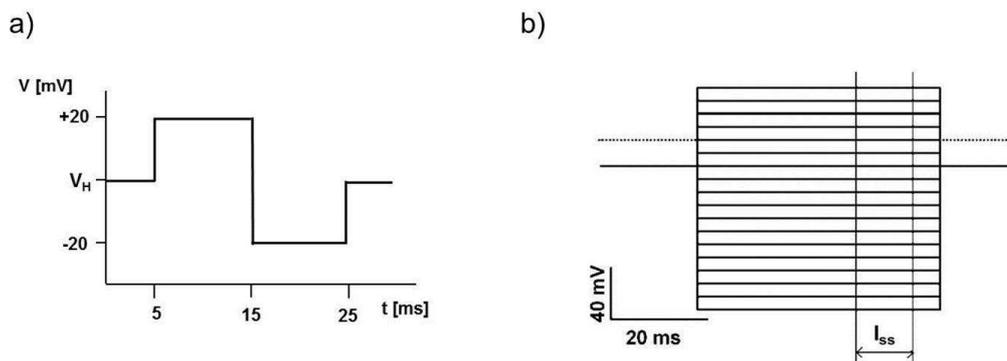
### **Einfachspannungspuls-Messungen**

Messungen mit IV`s, die in Strom-Spannungskennlinien resultierten, begannen immer mit einem IV in Sorbitol-Lösung. Dann wurde zu der Lösung mit dem jeweils zu messenden Substrat gewechselt, in dessen Anwesenheit erneut ein IV appliziert wurde. Die Messungen endeten immer mit einem erneuten IV in Sorbitol-Lösung. Dieses

Vorgehen ermöglichte die Bestimmung von Differenzströmen, die sich aus den  $I_{ss}$  in An- und Abwesenheit des jeweiligen Substrats errechnen ließ.

### Singlepuls-Messungen

Hierbei wurden Substrat-induzierte Stromantworten mit ihrem zeitlichen Verlauf bei einer Einzelspannung von entweder -20 mV oder -100 mV aufgenommen.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung verschiedener Puls-Protokolle**

a) Darstellung eines Testpuls-Protokolls. Für 5 ms liegt eine Haltespannung ( $V_H$ ) an, von der aus Spannungssprünge für 10 ms um +20 mV und weitere 10 ms um -20 mV angelegt werden. b) Abbildung eines Einzelspannungspuls-Protokolls (IV's). Für 20 ms liegt eine Haltespannung ( $V_H$ ) von -20 mV an. Die Spannung ändert sich für 50 ms (hier beginnend bei +40 mV) und erreicht erneut die Haltespannung  $V_H$  von -20 mV für weitere 20 ms. Bei den angelegten Spannungssprüngen wurde die Spannung um 10 mV pro Durchgang erniedrigt.

### **2.5.5 Kapazitätsmessungen (Schmitt & Koepsell 2002)**

Kapazität ist die Fähigkeit Ladungen zu trennen. Bei einem Plattenkondensator befinden sich unterschiedliche Ladungen auf den Platten, so dass ein Potential zwischen den Platten vorhanden ist/entsteht. Zwischen den Platten befindet sich ein dielektrisches Feld. Vergleicht man eine Zelle mit einem annähernd kugelförmigen Kondensator, so stellen das Zytosol und die extrazelluläre Lösung die beiden Kondensatorplatten dar, wobei die Zellmembran der Schicht des Dielektrikums entspricht. Die Kapazität der Zelle

( $C_m$ ) lässt sich daher aus ihrer Membranfläche  $A$ , der Dicke  $d$ , der Dielektrizitätskonstanten der Doppellipidschicht  $\epsilon_r$  und der Dielektrizitätskonstanten des Vakuums  $\epsilon_0$  berechnen:

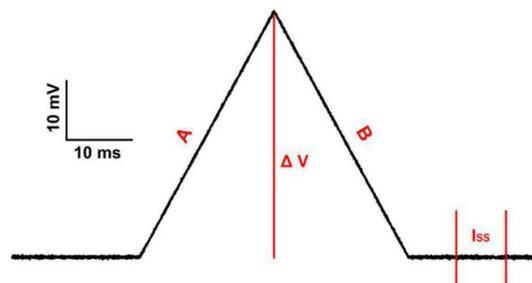
$$C_m = \epsilon_0 \epsilon_r \cdot A/d \quad \text{Gleichung (2)}$$

Da die Dicke und die Dielektrizitätskonstante einer Lipidmembran durch ihren molekularen Aufbau nahezu feststehen, sind  $\epsilon_r$  und  $d$  für alle Zellmembranen in guter Näherung konstant. Die Proportionalitätskonstante  $\alpha$  liegt für die bisher untersuchten Zellen in der Größenordnung von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Die Kapazität  $C_m$  einer Zelle ist daher proportional zu ihrer Oberfläche  $A$ :

$$C_m = \alpha \cdot A \quad \text{Gleichung (3)}$$

Die Ladungen sind direkt proportional zur Spannung. Unter der Annahme einer gleichbleibenden Kapazität führt eine Erhöhung der Spannung zu einer Erhöhung der Ladung auf den Platten. Der Proportionalitätsfaktor dabei ist die Kapazität.

$$Q \sim U \rightarrow Q = C \cdot U \quad \text{Gleichung (4)}$$



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Kapazitäten-Protokolls**

Abgebildet ist eine Zweifach-Spannungsrampe, die zur Messung und Berechnung der Membrankapazität herangezogen wurde. Ausgehend von der Haltespannung  $V_H$  wurde die Spannung linear in 20 ms um +40 mV depolarisiert und danach in der gleichen Zeit auf  $V_H$  wieder repolarisiert.

Da biologische Membranen ebenfalls Ladungen trennen, fungieren die Membranen als Dielektrikum wie die Luft zwischen den Platten eines Kondensators.

Die Kapazität ändert sich während des Substrattransports, aufgrund der intramolekularen Ladungsbewegungen durch das Protein. Die Kapazität ( $C_m$ ) wurde aus den Strömen, die während einer depolarisierenden (A) und einer repolarisierenden (B) Spannungsrampe fließen, berechnet.

Aus den Ladungen  $Q_A$  und  $Q_B$ , den Stromintegralen während den Spannungsrampen und  $\Delta V$  kann die kapazitive Ladung  $Q_{cap}$  vereinfacht werden:  $Q_{cap} = 1/2(Q_A - Q_B)$ .

Die Kapazität wird berechnet als

$$C_m = Q_{cap}/\Delta V = 1/2(Q_A - Q_B) / \Delta V \quad \text{Gleichung (5)}$$

Die Daten zur Ermittlung der Kapazität wurden mittels einer Zweifach-Spannungsrampe (*paired voltage ramp*) (Abbildung 2.3) in Verbindung mit der beschriebenen Gleichung (5) vom Programm Patchmaster (HEKA) berechnet. Ausgehend von -20mV wurde die Spannung linear in 20 ms auf 20 mV erhöht und danach in der gleichen Zeit auf -20 mV wieder erniedrigt ( $\Delta V = 40\text{mV}$ ). Diese Daten wurden kontinuierlich gegen die Zeit aufgetragen und als fortlaufender Graph am Computer angezeigt und aufgezeichnet. Diese kontinuierlichen  $C_m$ -Messungen wurden gelegentlich für Einfachspannungspulse (IV's) unterbrochen.

### 2.5.6 Enzymaffinität - Ermittlung des $K_m$ -Wertes

Bei Enzymen variiert die Katalysegeschwindigkeit  $V$  mit der Substratkonzentration  $[S]$ . In der Enzymkinetik kann das Phänomen der Sättigung eintreten. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit  $V$  nicht weiter gesteigert werden d. h. es wird ein Wert  $V_{max}$  erreicht.  $V$  ist definiert als die Anzahl der pro Sekunde entstehenden Mole eines Produkts. Die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  wird erreicht, wenn alle Bindungsstellen des Enzyms mit Substrat gesättigt sind. Die Bedeutung des  $K_m$ -Wertes, als Maß für die Affinität eines Enzyms/Transporters zu seinem Substrat, wird mit Hilfe der Michaelis-Menten Gleichung (6) unter Verwendung der Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wie folgt formuliert:

Michaelis-Menten Gleichung

$$v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung (6)

Der  $K_m$ -Wert entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht, also die halbmaximale Aktivität des Transporters erreicht ist. Anhand der Substrat-induzierten  $I_{ss}$ , die bei variierenden Substratkonzentrationen gemessen wurden, konnten über die oben angegebenen Grundlagen die Affinitäten der Transporter ( $K_m$ -Werte) gegenüber SUC und  $H^+$  ermittelt werden. Mittelwerte aus Messungen  $\geq 3$ , sowie die Standardabweichungen wurden berechnet. Des Weiteren wurden die Datensätze der ermittelten  $K_m^S$ -Werte Tests zur Signifikanz unterzogen.

### 2.5.7 Bestimmung des elektrochemischen Potentials

Das elektrochemische Potential ( $\Delta \mu_i$ ) bestimmt maßgeblich die Intensität und Transportrichtung eines Transportvorgangs. Handelt es sich um einen Symportvorgang, wird das elektrochemische Potential von folgenden Triebkräften beeinflusst:

Elektrochemisches Potenzial

Gleichung (7)

$$\Delta \mu_i = R \cdot T \cdot \ln \frac{c_i^{II}}{c_i^I} + F \cdot z_i \cdot (E_i^{II} - E_i^I)$$

R = Gaskonstante, T = Temperatur, F = Faraday-Konstante, z = Ladungszahl

Ermittelt werden kann das elektrochemische Potential aus der unterschiedlichen Teilchenkonzentration ( $\ln c_i^{II}/c_i^I$ ), die die Gradienten beider zu transportierender Substrate bilden (chemisches Potential), dem Ladungsunterschied ( $E_i^{II}-E_i^I$ ) über der Membran (elektrisches Potential), und den in Gleichung 7 genannten Konstanten. beschrieben wird.

## 2.6 Computerprogramme

- Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen (alignments) in Abbildung 3.1 und Abbildung 3.18 wurden mit Vector NTI Suite, Advanced 10.0 (Invitrogen) erstellt.
- Das Internetportal ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>) sowie TMHMM (Transmembrane Hidden Markov Model, Sonnhammer *et al.*, 1998) lieferten zusätzliche Informationen zur Topologie von ZmSUT1 mit Voraussagen über die Lage der transmembranen Domänen. Diese Informationen dienten als Grundlage für das 2-D-Arbeitsmodell (Abbildung 3.16).
- Das schematische 2-D Strukturmodell von ZmSUT1 (Abbildung 3.16) wurde in Excel (Microsoft Office 2010) erstellt.
- Das 3-D Strukturmodell von ZmSUT1 (Abbildung 3.17) wurde von Prof. Dr. Thomas Müller unter Verwendung von QUANTA Modeling Environment (Accelrys; San Diego USA) erstellt.
- Die Aufnahme der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit der Software Patchmaster (HEKA, Lambrecht)
- Die weitere Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Excel (Microsoft Office 2010) und Igor Pro 6.12A (WaveMetrics)
- Die Signifikanztests der Datensätze der ermittelten  $K_m^S$ -Werte wurden mit Origin (Version 8.5) einer einfachen ANOVA sowie anschließenden Tukey-Tests mit einem festgelegten Signifikanzniveau von 0.05 unterzogen.

## 2.7 Messlösungen und Puffer

Die Herstellung aller verwendeten Lösungen (siehe unten) erfolgte ebenso wie die Durchführung der Experimente bei Raumtemperatur (20-25°C). Unter osmometrischer Kontrolle eines Vapor Pressure Osmometers 5520 (Schlag GmbH, Bergisch Gladbach) wurde die Osmolalität der Messlösungen mit D-Sorbitol auf 220-240 mosmol/kg eingestellt. Die Einstellung des pH-Wertes wurde mit einem Digital-pH-Meter (Knick) vorgenommen.

### Messreihe der Substratabhängigkeit

Durch anteiliges Mischen der SUC- und Sorbitol- Stammlösungen wurden die Messlösungen mit den verschiedenen SUC-Konzentrationen hergestellt. Für Messungen mit ZmSUT1 betragen die Konzentrationen 1, 3, 5, 10, 30, 50 und 100 mM SUC. Für Messungen mit UmSrt1 wurden Lösungen mit 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 und 1 mM SUC hergestellt.

<b>Sorbitollösung</b>		<b>Saccharoselösung</b>	
30mM	KCl	30mM	KCl
1mM	CaCl <sub>2</sub>	1mM	CaCl <sub>2</sub>
1mM	LaCl <sub>3</sub>	1mM	LaCl <sub>3</sub>
1mM	MgCl	1mM	MgCl
70mM	D-Sorbitol	70mM	D-Sorbitol
10mM	MES/ Tris	10mM	MES/ Tris
	+		+
100mM	D-Sorbitol	100mM	D-Saccharose

### Messreihe der pH-Abhängigkeit

Der pH-Wert Bereich zwischen 4-6,5 wurde basierend auf dem Puffersystem von 10 mM MES/Tris, der Bereich zwischen 7–8,5 mit 10 mM Tris/MES eingestellt. Zum Einstellen des pH-Wertes 3,5 wurde der Lösung mit pH-Wert 4 Citronensäure hinzugefügt.

### Messreihe der Substratspezifität

<b>Sorbitollösung</b>		<b>Substrat X-Lösung</b>	
30mM	KCl	30mM	KCl
1mM	CaCl <sub>2</sub>	1mM	CaCl <sub>2</sub>
1mM	LaCl <sub>3</sub>	1mM	LaCl <sub>3</sub>
1mM	MgCl	1mM	MgCl
70mM	D-Sorbitol	70mM	D-Sorbitol
10mM	MES/ Tris	10mM	MES/ Tris
	+		+
100mM	D-Sorbitol	100mM	Substrat X

Für die Messreihe zur Ermittlung der Substratspezifitäten der Transporter wurde eine Sorbitol-Stammlösung hergestellt. Diese wurde anteilig mit einer Lösung gemischt, die das jeweils zu testenden Substrat (X) in einer Konzentration von 100 mM enthielt. Die zu testenden Substrate waren Suc, D-Glucose, D-Fructose, D-Maltose, D-Mannose, Raffinose, Sucralose und Salicin. Für Messungen mit ZmSUT1 betragen die Konzentrationen der getesteten Substrate 100 mM, für Messungen mit UmSrt1 wurden die Lösungen auf 1 mM eingestellt.

### Aufbewahrungslösungen für Oozyten

<b>ND96-Lösung + Ca<sup>2+</sup></b>		<b>ND96-Lösung</b>	
96 mM	NaCl	96 mM	NaCl
2 mM	KCl	2 mM	KCl
1mM	CaCl <sub>2</sub>	-	-
1 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MES/NaOH	10 mM	MES/NaOH
50µg/ml	Gentamycin	-	-
ad 220 mosmol/ID-Sorbitol		ad 220 mosmol/ID-Sorbitol	

## **Molekularbiologische Lösungen**

### **DEPC Wasser**

DEPC (Diethylpyrocarbonat) 0,1 vol%

in ddH<sub>2</sub>O ca. 24 h magnetisch gerührt und 20 min bei 121°C autoklaviert

#### **1x MEN-Puffer**

20 mM MOPS  
50 mM Na-Acetat  
5 mM Na-EDTA in ddH<sub>2</sub>O

#### **1x TAE-Puffer**

40 mM Tris  
40 mM Essigsäure  
1 mM Na-EDTA in ddH<sub>2</sub>O

### **5x DNA-Probenpuffer**

50% Glycerin (w/v)  
100 mM EDTA  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylen Cyanol FF

### **RNA-Probenpuffer**

100 µl 1x MEN-Puffer  
175 µl Formaldehyd (37%)  
500 µl Formamid  
25 µl DNA-Probenpuffer  
200 µl ddH<sub>2</sub>O

### **LB (Luria-Broth) Ampicillin Kulturmedium**

10 g/l NaCl  
10 g/l Trypton  
5 g/l Yeast Extract  
50 µg/ml Ampicillin in ddH<sub>2</sub>O

### **LB-Ampicillin-Selektions-Agarplatten**

AgarAgar 2% in LB Medium autoklaviert;

Ampicillin zugegeben 50 µg/mL

in Petrischalen gegossen; bei 4°C im Kühlraum gelagert.

### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

### **TENS-Lysispuffer**

0,1 M NaOH

0,5% SDS

200 µg/ml RNase in TE-Puffer (9,4 ml)

### **TFB1**

30 mM KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>

100 mM RbCl

10 mM CaCl<sub>2</sub>

50 mM MnCl<sub>2</sub>

15% (v/v) Glycerin

sterilfiltriert pH 5,8

### **TFB2**

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

15% (v/v) Glycerin

sterilfiltriert pH 6,5

### **Verwendete Antibiotika:**

Ampicillin 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Gentamycin 25 mg/ml in H<sub>2</sub>O

### 3 Ergebnisse

Das *Ustilago maydis* - *Zea mays* Pathosystem ist eine biotrophe Interaktion, die während der vollständigen Entwicklung des Pilzes in der Wirtspflanze besteht. Biotrophe Pilze sind parasitär lebende Organismen, die erfolgreiche Mechanismen entwickelt haben, in lebendigen Pflanzengeweben ihren eigenen Entwicklungszyklus durchleben zu können. Dies geschieht über die Ausbildung einer durch Membranen getrennten Interaktionszone, die es ermöglicht, die von den Maispflanzen gebildeten Assimilate für sein eigenes Wachstum unidirektional umzuleiten. Die Aufnahme der Kohlenhydrate durch *Ustilago maydis* geschieht ohne die extrazelluläre Hydrolyse von Suc, die als bekannter Auslöser pflanzlicher Abwehrmechanismen gilt, wie z.B. der heftigen Bildung von ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies), der Aktivierung von Caspasen und Defensinen, oder dem „programmierten Zelltod“ (Doehlemann et al., 2008; Brefort et al., 2009). Durch die Umgehung dieser Invertase vermittelten Glucoseproduktion im Apoplasten, sorgt der Pilz somit auf unbemerkte Weise und auf Kosten der Produktivität der Maispflanzen für sein eigenes schnelles Wachstum und seine Verbreitung (Mendgen & Hahn, 2002).

Seit dem Jahre 2006 steht die Genomsequenz des biotrophen Pilzes *Ustilago maydis* zur Verfügung (Kamper et al., 2006). Daraufhin wurden Gene für potentielle Transportproteine identifiziert und im Jahre 2010 beschrieben Wahl et al. erstmalig einen pilzlichen Suc-Transporter, UmSrt1 aus *Ustilago maydis*. Mittels experimenteller Untersuchungen des Proteins im heterologen Expressionssystem der Bäckerhefen *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben die Autoren UmSrt1 als einen hochaffinen und spezifischen SUC/H<sup>+</sup>-Symporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und im Infektionsstadium exprimiert wird. Sie konnten zeigen, dass die Expression von UmSrt1 essentiell für die Virulenz des Pilzes ist.

Für die apoplastisch beladende Wirtspflanze *Zea mays* ist der niederaffine plasmamembranständige SUC/H<sup>+</sup>-Symporter ZmSUT1 maßgeblich an der Aufnahme der extrazellulären SUC ins Phloem beteiligt (Carpaneto et al., 2005). Wahl et al. stellten die

Hypothese auf, dass die beiden Plasmamembran lokalisierten SUC-Transporter ZmSUT1 und UmSrt1, sich im Falle einer erfolgreichen Infektion in einer ausgebildeten Interaktionszone und damit in gegenüberliegenden Membranen befinden und um die extrazelluläre SUC konkurrieren (Wahl et al., 2010).

Der sekundär aktive Transporter ZmSUT1 wurde bereits im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten eingehend untersucht (Aoki et al., 1999; Carpaneto et al., 2005; Slewinski et al., 2009; Carpaneto et al., 2010; Wahl et al., 2010; Wippel et al., 2010). UmSrt1 hingegen, wurde bisher nur in Hefeexperimenten charakterisiert (Wahl et al., 2010; Wippel et al. 2010). In Gleichung 7 (Kap.2.5.7) wird deutlich, dass neben den  $H^+$ - und SUC-Gradienten, das Membranpotential eine entscheidende Rolle beim Transportprozess Kationen-gekoppelter Transporter spielt. Aufnahmeexperimente im Hefesystem gewährleisten allerdings keine definierte Membranspannung während der Experimente. Mehr noch, sobald SUC im Außenmedium angeboten wird, depolarisiert die Plasmamembran. Um diese undefinierten Versuchsbedingungen zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine vergleichende Analyse zur Charakterisierung der Transporteigenschaften von ZmSUT1 und UmSrt1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten angefertigt. Mit Hilfe der Zweielektroden-Spannungsklemmentchnik (DEVIC) kann in Oozyten die Aktivität eines elektrogenen Transporters unter kontrollierten Membranspannungen bestimmt werden. So wurden ZmSUT1 und UmSRT1 im Hinblick auf ihre Spannungs- und Substratabhängigkeit, ihre Substratspezifität sowie auf ihre pH-Abhängigkeit hin untersucht.

### 3.1 Vergleichende Analysen von ZmSUT1 und UmSrt1

Die „major facilitator superfamily“ (MFS) fasst integrale Membranproteine zusammen, die gelöste Stoffe mithilfe chemiosmotischer Ionengradienten transportieren. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie verfügen über ein gemeinsames Strukturmotiv von zwölf hydrophoben  $\alpha$ -helicalen Transmembrandomänen (TM), die aus einer N-

## Ergebnisse

terminalen (TM I - VI) und eine C-terminalen Hälfte (TM VII – XII) bestehen (Marger & Saier, 1993; Pao et al., 1998). In dieser Proteinfamilie gehört ZmSUT1 zur Unterfamilie der Glycosid-Pentosid-Hexuronid:Kationen-Symporter (Hoischen et al.) und weiterhin zu den SUC-Symportern (Chang et al., 2004; Sauer, 2007). UmSrt1 gilt ebenfalls als Mitglied der MFS, weist jedoch mit einem langen extrazellulären Loop zwischen TM I und TM II, ein als typisch geltendes strukturelles Merkmal pflanzlicher und pilzlicher Monosaccharid-Transporter (MSTs) auf (Buttner & Sauer, 2000; Schussler et al., 2006). Vergleicht man die Proteinsequenzen der beiden Transporter miteinander (Abbildung 3.1; Vector NTI Suite, Advanced 10.0) weisen die Sequenzen nur 14 % identische Aminosäuren auf.

	Section 1				
	(1) 1	10	20	30	47
ZmSUT1	(1) MARGDGEL	ELSVGV	RGTGGAA	AAAAADH	VAPISLGRLL
UmSRT1 suc transporter	(1) MASSSPIRE	SVSVTP	SISSTQA	AKPKVWS	LSVFVTVIT
Consensus	(1) MA	E	A	IA	I
	Section 2				
	(48) 48	60	70	80	94
ZmSUT1	(48) QYGWALQ	LSLLTPY	VQTLGLSHAL	T-----	SFMWLCGP
UmSRT1 suc transporter	(48) ENSLMSP	LAAMPEF	VKKYQGLNRE	T	RNYTFTARHQ
Consensus	(48)	LA L FV	T		M
	Section 3				
	(95) 95	100	110	120	130
ZmSUT1	(86) VQPLVGLY	SDRCTF	RWGRR	RPFI	LIGCMLIC
UmSRT1 suc transporter	(95) AGALVSPY	LQNRLGR	KWLSLCAAY	MFSIPSTQ	LQLWAPNL
Consensus	(95)	LV Y	AR	L	L L
	Section 4				
	(142) 142	150	160	170	188
ZmSUT1	(132) LGDTKEH	CSLYHGP	RWHAA	IVYVLGF	WLLDFSN
UmSRT1 suc transporter	(142) MNGLAYG	CALSIGB	LYLADVV	PTSIRGG	AVASSN
Consensus	(142)	L	CAL GP W A IV		S N L
	Section 5				
	(189) 189	200	210	220	235
ZmSUT1	(179) CGHHGPS	AANSIF	CSWMALGN	ILGYSS	GSTNNWHKWF
UmSRT1 suc transporter	(189) CW-----	ATEGHY	SGARKYKI	PLAVQA	GLPFLLLLPT
Consensus	(189)	C	A	F	LA AG
	Section 6				
	(236) 236	250	260	270	282
ZmSUT1	(226) ACANLKG	AFLVAV	VFLVMCL	TVTLEFF	FANEVPYR
UmSRT1 suc transporter	(231) VQKGRIG	EARMAL	QRVPRV	SDRELE	DELQEIVR
Consensus	(236)	G	MAL L	I	RA Q
	Section 7				

**Abbildung 3.1: Ausschnitt eines Sequenzvergleichs von ZmSUT1 und UmSrt1**

Sequenzvergleich der AS-Abfolge von UmSRT1 und ZmSUT1. Es wurden die N-terminalen Hälften der beiden Transporter verglichen. Gelb markiert sind identische AS, grün sind homologe AS, dunkelblau markiert ist das SUC-Transporter „Erkennungsmotiv“ bei ZmSUT1.

## Ergebnisse

---

Das angefertigte Alignment der Aminosäuresequenzen von ZmSUT1 und UmSrt1 (Abbildung 3.1) ergab weiterhin einen 27 %igen Anteil konservierter AS. Man findet in der Proteinsequenz von ZmSUT1 das für SUC-Transporter hoch konservierte Motiv -RxGRR- (Lemoine, 2000), welches sich zwischen den Transmembrandomänen II und III an den Positionen der AS 100-104 (siehe Markierung in Abbildung 3.1) befindet. UmSrt1 fehlt dieses Motiv gänzlich. Wahl et al. (2010) postulieren eine nahe Verwandtschaft von UmSrt1 zu den MSTs aus Pflanzen und Pilzen. Phylogenetischen Analysen zu Folge steht UmSrt1 einer kleinen Gruppe uncharakterisierter putativer pilzlicher Transportproteine (bestehend aus *Aspergillus*-, *Sporisorium*- und *Ustilago*-Arten) am nächsten (Wahl et al., 2010).

Die vergleichenden Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden für beide Transportproteine im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten anhand elektrophysiologischer Messungen unter Verwendung der DEVC-Methode mit konstanten Spannungsklemmbedingungen durchgeführt.

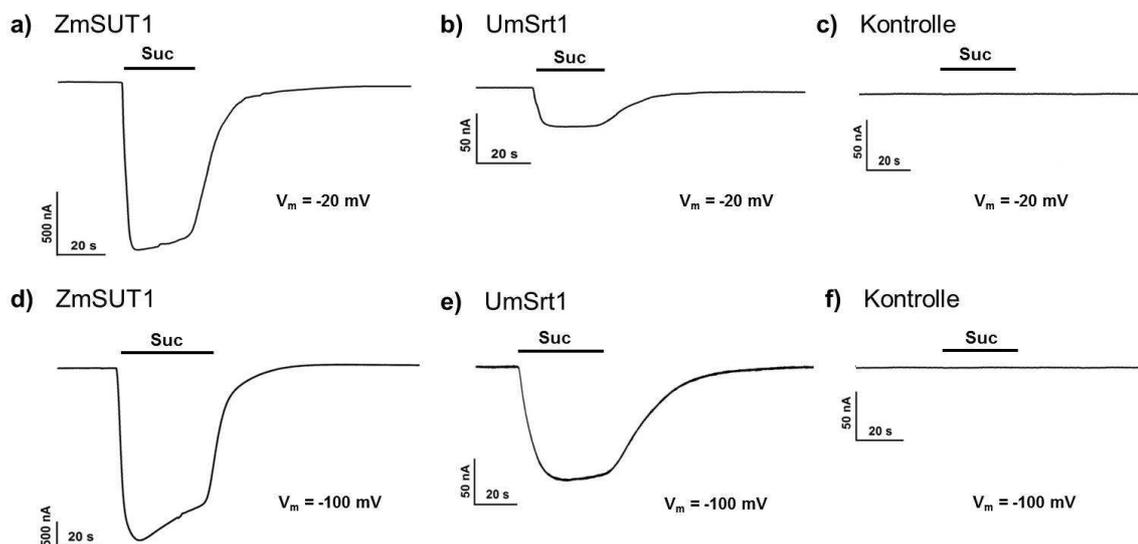
Die codierenden Sequenzen von ZmSUT1 mit 1566 Bp (in der AG Hedrich bereits vorhanden) und UmSrt1 mit 1638 Bp (zur Verfügung gestellt von der AG Sauer, Universität Erlangen) wurden im Fall von ZmSUT1 in den Oozyten-Expressionsvektoren pGEMKN und im Fall von UmSRT1 in den Vektor pNB1u 16 kloniert. Beide Vektoren basieren auf dem Vektor pGEMHE und unterscheiden sich nur in ihrer Klonierungsstelle. Die anschließend generierten c-RNAs wurden mit einer Konzentration von 500 ng/μl in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Nach einer Expressionszeit von 3-4 Tagen wurden die Oozyten für die Messungen mit der DEVC-Methode herangezogen.

### 3.1.1 Funktionelle Expression von ZmSUT1 und UmSrt1 in *Xenopus* Oozyten

Für ZmSUT1 konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten eine Expression in der Membran von *Xenopus laevis* Oozyten mit Saccharose-induzierten Strömen im μA-Bereich gezeigt werden. Diese überaus hohen Ströme machen ihn zu einem idealen Modelltransporter für elektrophysiologische Charakterisierungen (Carpaneto et al., 2005).

## Ergebnisse

Um die erfolgreiche Expression und damit die Funktionalität der beiden Transportproteine in der Plasmamembran der Oozyten zu untersuchen, wurden Messungen mit konstanter Haltespannung von -20 bzw. -100 mV (Kap. 2.5.4) durchgeführt (Abbildung 3.2). In Abwesenheit von SUC wurden keine makroskopischen Ströme detektiert. Das Perfusionssystem wurde schließlich von SUC-freier (0 SUC) zu SUC-haltiger Lösung (100 mM SUC) umgeschaltet, was ein Einströmen von SUC im Symport mit Protonen (Kationeneinstrom) in die Oozyten und damit eine negative Stromantwort zur Folge hatte. Der erneute Wechsel zu SUC-freier Lösung bewirkte ein erneutes Verstummen der Stromantwort.



**Abbildung 3.2: Transporter-vermittelte Originalströme nach SUC-Zugabe**

SUC-induzierte Stromantworten von ZmSUT1 und UmSrt1 bei einem pH-Wert von 5.5. Die zugegebene SUC-Konzentration betrug in allen Messungen 100 mM (angezeigt durch die schwarzen Balken). a) - c) Die Haltespannung betrug -20 mV; d) - f) Die Haltespannung betrug -100 mV. Messung a) und d) bilden ZmSUT1-vermittelte Transportströme ab. Messung b) und e) zeigen UmSrt1-vermittelte Transportströme. c) und f) zeigen Stromantworten uninjizierter (Kontroll-) Oozyten.

Die negativen SUC-induzierten Gleichgewichts-Transportströme ( $I_{ss}$ ) von ZmSUT1 und UmSrt1, als Reaktion auf die Zugabe von 100 mM SUC, waren das Resultat einer funktionellen Expression in der Membran der Oozyten, da uninjizierte Oozyten keine

## Ergebnisse

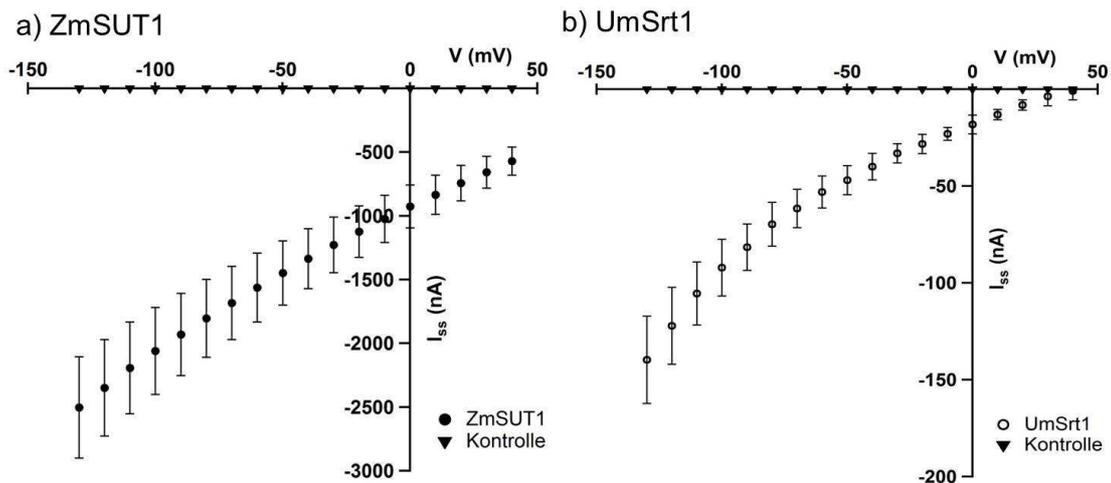
---

makroskopischen Ströme nach Zugabe von SUC vermittelten (Abbildung 3.2c und f). Jedoch unterschied sich die Amplitude der Transportströme von UmSrt1 und ZmSUT1 sehr stark, wie in den repräsentativen Messungen aus Abbildung 3.2 deutlich zu erkennen ist. Bei einer Membranspannung von -20 mV (Abbildung 3.2a - c) betrug das von ZmSUT1 erreichte Maximum der Transportströme  $-1.35 \mu\text{A}$ , während die maximalen  $I_{ss}$  von UmSrt1 lediglich  $-25 \text{ nA}$  betragen. Bei einer Haltespannung von -100 mV (Abbildung 3.2d - f) wurden deutlich höhere Transportströme für beide Transporter detektiert. Die maximalen  $I_{ss}$  von ZmSUT1 erreichten  $-4.16 \mu\text{A}$  (Abbildung 3.2d), während sie für UmSrt1 bei  $-100 \text{ nA}$  lagen (Abbildung 3.2e).

Um Kenntnisse über die spannungsabhängige Aktivität der Transporter zu erlangen, wurden die Aktivitäten mit Einzelspannungspulsprotokollen (IV's; Kap. 2.5.4) aufgezeichnet, die die  $I_{ss}$  in 10 mV Schritten über einen Spannungsbereich von +40 bis -130 mV im Fall von ZmSUT1 und +40 bis -180 mV erfassten. Die Einzelspannungspulsprotokolle wurden in An- und Abwesenheit von sättigenden SUC Konzentrationen aufgezeichnet. Die  $I_{ss}$  in Abwesenheit wurden von den  $I_{ss}$  in Anwesenheit von SUC subtrahiert (Differenzströme). Eventuelle Leckströme, z.B. verursacht durch das Anstechen der Oozyte, wurden durch die Subtraktion eliminiert, sodass die erhaltenen Differenzströme ausschließlich die durch SUC induzierten Protonenströme abbilden. Das Auftragen der Differenzströme bei einer hohen SUC-Konzentration von 100 mM gegen die angelegte Spannung, resultierte für ZmSUT1 (Abbildung 3.3a) in einer linearen Strom-Spannungskennlinie.

Die Differenzströme beider Transportproteine nahmen mit Hyperpolarisation der Membran zu. Die Strom-Spannungskennlinie von UmSrt1 (Abbildung 3.3b) ergab im Bereich von +40 bis -100 mV ein nahezu lineares Ansteigen der Stromamplitude. Ab einer Spannung von -100 mV stiegen die Ströme stärker an. Über die gesamte Bandbreite der getesteten Spannungen ergaben sich für UmSrt1 jedoch stets 10- bis 20-fach niedrigere Stromantworten als für ZmSUT1. Wie erwartet konnten bei den Messungen mit uninjizierten Oozyten (Negativkontrollen) keine SUC-induzierten  $I_{ss}$  detektiert werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.3: Stromantworten auf Einzelspannungspulse bei pH 5,5**

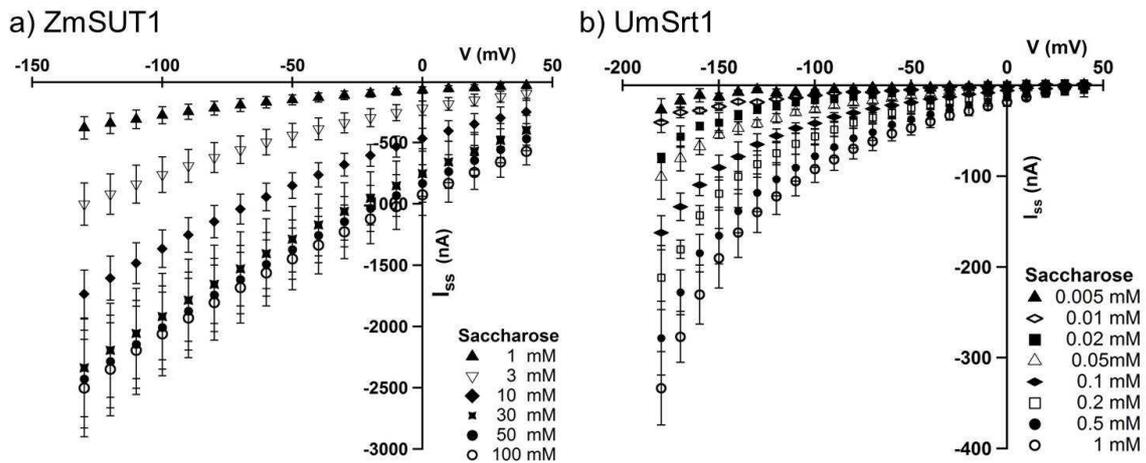
Strom-Spannungskennlinien der Differenzströme  $I_{ss}$  bei einer externen SUC-Konzentration von 100 mM. In beiden Diagrammen ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD, n=5 abgebildet. (a) Ströme von ZmSUT1- und uninjizierten (Kontroll-) Oozyten. (b) Ströme von UmSrt1- und uninjizierten (Kontroll-) Oozyten.

### 3.1.2 Ermittlung der Substratabhängigkeit

#### 3.1.2.1 Bestimmung der SUC-Abhängigkeit

Um zu untersuchen, in wieweit die Aktivität der Transporter von der SUC-Konzentration als Triebkraft bestimmt wird, wurden die Aktivitäten der Transporter und damit die Höhe der SUC-induzierten Transportströme ( $I_{ss}$ ) bei unterschiedlich hohen SUC-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden die Oozyten mit Lösungen unterschiedlich hoher SUC-Konzentrationen umspült. ZmSUT1 und UmSrt1 wiesen bei einem physiologischen pH-Wert von 5,5 eine wachsende Transportaktivität mit steigenden SUC-Konzentrationen auf (Abbildung 3.4).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4: Bestimmung SUC-abhängiger Transportströme bei pH 5,5**

Strom-Spannungskennlinien in Anwesenheit verschiedener SUC-Konzentrationen (wie im Diagramm angegeben). a) Differenzströme von ZmSUT1. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ . b) UmSrt1-vermittelte Differenzströme. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=8$ .

Mit steigenden Konzentrationen von 1 mM bis 30 mM stiegen die SUC-induzierten  $I_{ss}$  von ZmSUT1 an (Abbildung 3.4a). Die Höhe der Ströme bei den Konzentrationen 30 mM und 50 mM SUC unterschieden sich nur noch sehr gering voneinander. Ab einer Außenkonzentration von 50 mM war die Transportaktivität weitestgehend nicht mehr zu steigern, was auf sättigende SUC-Konzentration ab 30 mM schließen lässt. Bei jeder der gemessenen SUC-Konzentrationen resultierte die ZmSUT1-vermittelte Aktivität in einer nahezu linearen Strom-Spannungskurve. Mit zunehmender Hyperpolarisation der Haltespannungen erhöhen sich die gemessenen Ströme.

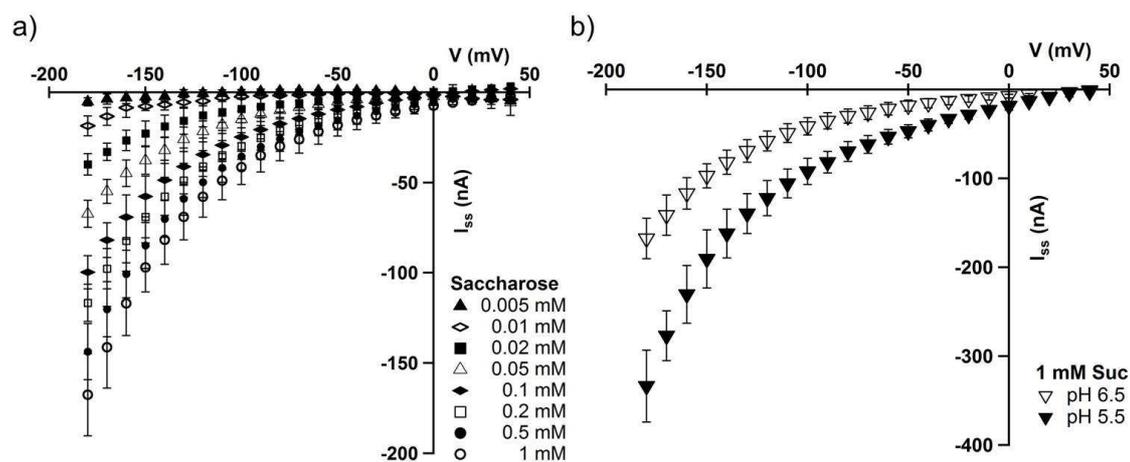
Die SUC-induzierten  $I_{ss}$  von UmSrt1 (Abbildung 3.4b) lagen maximal bei -400 nA, also 10-mal geringer als bei ZmSUT1. Die gewählten SUC-Konzentrationen für UmSrt1 betragen 0,001 mM bis 1 mM, da die halbmaximale Transportaktivität im Expressionssystem der Hefen mit 0,026 mM SUC bestimmt wurde (Wahl et al., 2010). Mit steigenden SUC-Konzentrationen stiegen die  $I_{ss}$  ebenfalls an. Es konnte mit Konzentrationen über 1 mM SUC keine weitere Erhöhung der Transportströme erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Somit war die maximale Transportaktivität unter sättigenden SUC-Konzentrationen für UmSrt1 bei 1 mM in den Messlösungen erreicht. Es bildete sich deutlich ab, dass

## Ergebnisse

UmSRT1 in seiner Spannungsabhängigkeit einen hyperbolischen Kurvenverlauf folgt. Somit zeigt UmSrt1 ein schwaches spannungsabhängiges Verhalten. Aufgrund der sehr niedrigen Stromantworten von UmSRT1 wirken sich allerdings schon geringe endogene eventuell spannungsabhängige Änderungen in der Hintergrundleitfähigkeit der Oozyten sehr stark auf die ermittelten Differenzströme aus. Deshalb sind die Aussagen über die Spannungsabhängigkeit des Transporters UmSrt1 mit Vorsicht zu genießen.

### 3.1.2.1.1 SUC-Abhängigkeit von UmSrt1 bei pH 6.5

Carpaneto et al. 2005 konnten für ZmSUT1 zeigen, dass dessen Affinität zu SUC sehr stark von der extrazellulären Protonenkonzentration abhängt. Deshalb wurde die Substratabhängigkeit für UmSrt1 auch bei pH 6,5 bestimmt.



**Abbildung 3.5: SUC-abhängige Ströme von UmSRT1 bei pH 5,5 und pH 6,5**

Strom-Spannungskennlinien von UmSrt1-exprimierenden Oozyten. a) Differenzströme UmSrt1-vermittelter  $I_{ss}$  bei pH 6,5 bei den angegebenen SUC-Konzentrationen, Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=9$ . b) Vergleich der Differenzströme bei pH 5,5 und pH 6,5 in Anwesenheit von 1 mM SUC. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD für pH 6,5  $n=9$  und pH 5,5  $n=8$ .

Die maximalen  $I_{ss}$  bei 1 mM SUC betragen weniger als -200 nA (Abbildung 3.5a). Somit ergab sich für UmSrt1 bei pH 6,5 eine schwächere Transportaktivität mit geringeren

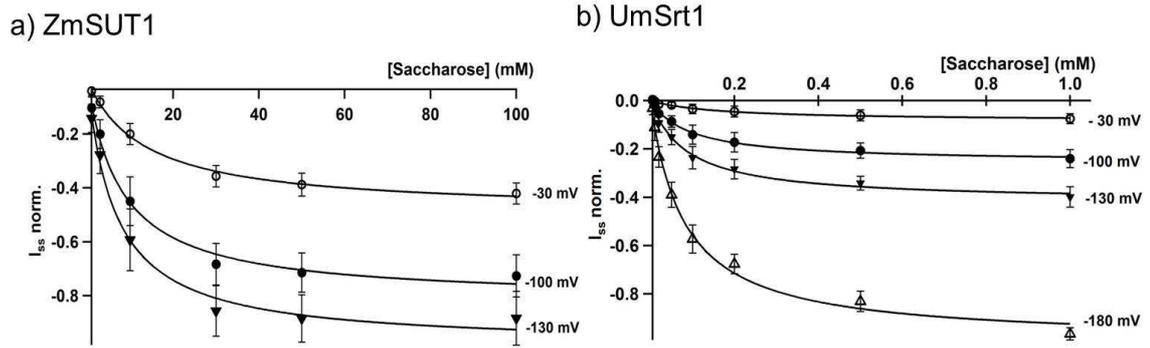
Transportströmen als bei pH 5,5. Mit SUC-Konzentrationen größer als 1 mM konnte keine höhere Transportaktivität mehr erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die Kurvenverläufe der Strom-Spannungskennlinien glichen sich, jedoch war die Stromamplitude bei pH 5,5 doppelt so hoch als bei pH 6,5 (Abbildung 3.5b).

### 3.1.2.2 Ermittlung der Affinitäten gegenüber SUC

Die Michaelis-Menten Theorie ist ein Modell zur kinetischen Beschreibung einfacher enzymatischer Reaktionen, deren Verlauf einer hyperbolischen Sättigungskurve folgt. Mithilfe der Michaelis-Menten Gleichung (Kap. 2.5.6) wird die Michaeliskonstante ( $K_m$ ) errechnet. Sie gibt die Substrat-Konzentration an, bei welcher die halbmaximale Aktivität des Enzyms bzw. Transportproteins erreicht ist. Der  $K_m$ -Wert gilt als Maß für die Affinität eines Proteins gegenüber seinem Substrat. Damit stellt der  $K_m$ -Wert eines Proteins ein spezifisches Charakteristikum dar und ermöglicht den Vergleich verschiedener Transportproteine untereinander. Bei einem niedrigen  $K_m$ -Wert ist demnach nur eine niedrige Substratkonzentration nötig, damit das Transportprotein mit seiner maximalen Geschwindigkeit arbeitet.

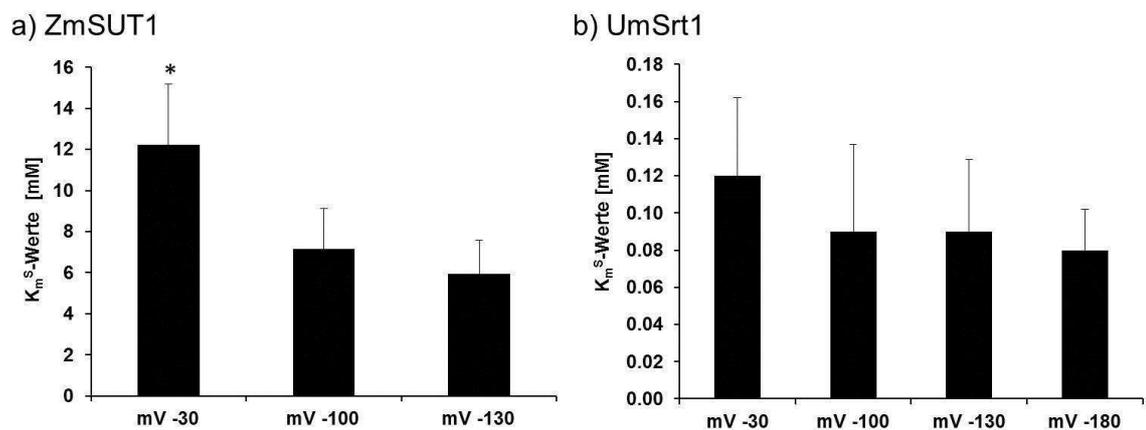
Die errechneten Differenzströme aus den Messungen zur SUC-Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 3.4) lieferten die Ausgangsdaten zur Berechnung der  $K_m$ -Werte von ZmSUT1 und UmSrt1 für SUC ( $K_m^S$ ). Hierfür wurden die Differenzströme von ZmSUT1 bei den Haltespannungen -30, -100, -130 mV und von UmSrt1 bei den Haltespannungen -30, -100, -130 mV und -180 mV herausgegriffen und gegen die SUC-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.6). Die Abhängigkeit der SUC-Transportaktivität, dargestellt in Abbildung 3.6, beschrieb für die Transporter hyperbolische Sättigungskurven. Diese konnten mit der Michaelis-Menten-Gleichung (6) beschrieben und die  $K_m^S$ -Werte der Transporter bei verschiedenen Spannungen bestimmt werden (Abbildung 3.7).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6: Bestimmung der  $K_m$ -Werte bei verschiedenen Spannungen**

Um die  $K_m^S$ -Werte berechnen zu können, wurden die Differenzströme bei den angegebenen Membranpotentialen gegen die SUC-Konzentration aufgetragen und mit einer Michaelis-Menten Funktion ( $I = I_{\max} [S]/[S]+K_m$ ) beschrieben (durchgezogene Linie). a) ZmSUT1; normalisiert wurden die Ströme auf  $I_{\max}$  bei 100 mM SUC und -130 mV. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=12$ . b) UmSrt1; normalisiert wurden die Ströme auf  $I_{\max}$  bei 1 mM SUC und -180 mV. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=8$ .



**Abbildung 3.7: Vergleich der  $K_m^S$ -Werte bei pH 5,5**

Aufgetragen sind die errechneten  $K_m^S$ -Werte bei den Spannungen -30, -100 und -130 mV (zusätzlich bei UmSrt1 bei -180 mV) bei pH 5,5. Die Werte wurden mittels Signifikanztests (Tukey-Test) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 miteinander verglichen (signifikante Unterschiede wurden mit \* gekennzeichnet). a)  $K_m^S$ -Werte von ZmSUT1; Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=12$ . b)  $K_m^S$ -Werte von UmSrt1; dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=8$ .

Bereits Carpaneto et al. beschrieben für ZmSUT1 einen  $K_m^S$ -Wert bei -100 mV von 7,2 mM SUC. Der in dieser Arbeit berechnete  $K_m^S$ -Wert bei -100 mV betrug ebenfalls

## Ergebnisse

---

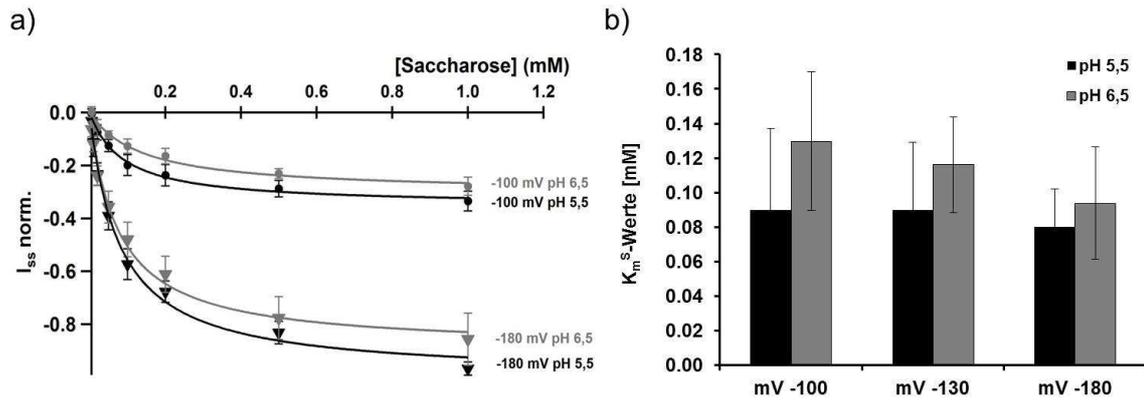
$7,2 \pm 1,9$  mM SUC und ist also mit den bereits veröffentlichten identisch (Carpaneto et al., 2005). Für -30 mV wurde ein  $K_m^S$ -Wert von  $12,2 \pm 2,9$  mM, und für -130 mV wurde ein  $K_m^S$ -Wert von  $5,9 \pm 1,6$  mM SUC ermittelt. Mit hyperpolarisierenden Membranspannungen sanken die  $K_m^S$ -Werte von ZmSUT1 also ab (Abbildung 3.7a), ein Verhalten, das ebenfalls bei Carpaneto et al. 2005 beschrieben wurde.

Für UmSrt1 (Abbildung 3.7b) wurden  $K_m^S$ -Werte bei -30 mV von  $0,12 \pm 0,04$  mM, bei -100 mV von  $0,09 \pm 0,05$  mM, bei -130 mV von  $0,09 \pm 0,04$  mM und bei -180 mV von  $0,08 \pm 0,02$  mM SUC bei pH 5,5 ermittelt. Bei -100 mV wies UmSrt1 mit 0,09 mM einen 80 fach niedrigeren  $K_m^S$ -Wert als ZmSUT1 auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten von Wahl et al, die bei pH 5 einen  $K_m^S$ -Wert von  $26 \pm 4,3$   $\mu$ M im heterologen Expressionssystem der Hefe ermittelten und UmSrt1 als einen hochaffinen Transporter einstufen (Wahl et al., 2010). Im Gegensatz zu ZmSUT1 lässt sich bei UmSrt1 jedoch kaum eine Spannungsabhängigkeit der  $K_m^S$ -Werte ablesen. Die  $K_m^S$ -Werte bei pH 5,5 nahmen mit hyperpolarisierenden Spannungen nur geringfügig ab.

### 3.1.2.2.1 Ermittlung der $K_m^S$ -Werte von UmSrt1 bei pH 6,5

In Kapitel 3.1.2.1.1 konnte bereits gezeigt werden, dass die UmSRT1-vermittelten Transportströme bei pH 5,5 doppelt so hoch wie bei pH 6,5 waren. Die Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte bei pH 6,5 (Abbildung 3.8) wiesen jedoch nur geringfügige Unterschiede zu den  $K_m^S$ -Werten bei pH 5,5 auf.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.8:**  $K_m^S$ -Werte von UmSrt1 bei pH 5,5 und pH 6,5

a) Die Differenzströme UmSrt1-vermittelter  $I_{ss}$  bei -100 mV und -180 mV wurden gegen die SUC-Konzentrationen 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 und 1 mM aufgetragen. Gefittet wurden die Daten mit einer Michaelis-Menten Funktion ( $I = I_{max} [S]/[S]+K_m$ ), angezeigt durch die durchgezogenen Linien. Die  $I_{ss}$  wurden auf  $I_{max}$  bei pH 5,5 in Anwesenheit von 1 mM SUC und -180 mV normalisiert. b)  $K_m^S$ -Werte für UmSrt1 bei den Membranpotentialen -100, -130 und -180 mV.

Der  $K_m^S$ -Wert für -30 mV konnte, aufgrund der sehr schwachen Stromamplitude nicht verlässlich ermittelt werden. Für -100 mV wurde bei pH 6,5 ein  $K_m^S$ -Wert von  $0,13 \pm 0,04$  mM, für -130 mV ein  $K_m^S$ -Wert von  $0,12 \pm 0,03$  mM und für -180 mV wurde ein  $K_m^S$ -Wert von  $0,09 \pm 0,03$  mM SUC ermittelt (Abbildung 3.8 b). Anschließend wurden die Werte einem Tukey-Test mit einem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 unterzogen. Die ermittelten p-Werte dieses Signifikanztests betragen Werte  $> 0,05$ . Es konnten also keine signifikanten pH-abhängigen Änderungen in der Affinität des Transporters festgestellt werden.

	$K_m^S$ -30 mV	$K_m^S$ -100 mV	$K_m^S$ -130 mV	$K_m^S$ -180 mV
ZmSUT1 pH 5,5	$12,2 \pm 2,9$ mM	$7,2 \pm 1,9$ mM	$5,9 \pm 1,6$ mM	-
UmSrt1 pH 5,5	$0,12 \pm 0,04$ mM	$0,09 \pm 0,05$ mM	$0,09 \pm 0,04$ mM	$0,08 \pm 0,02$ mM
UmSrt1 pH 6,5	-	$0,13 \pm 0,04$ mM	$0,12 \pm 0,03$ mM	$0,09 \pm 0,03$ mM

**Tabelle 3.1:** Übersichtstabelle der  $K_m^S$ -Werte

### 3.1.2.3 Ermittlung der Affinitäten gegenüber Protonen ( $H^+$ )

Unter physiologischen Bedingungen wird die SUC-Aufnahme hauptsächlich durch die Membranspannung und dem  $H^+$ -Gradienten energetisiert. Das lässt auf eine enge Kopplung des Zucker- und  $H^+$ -Transports schließen. Dabei wirkt sich die extrazelluläre  $H^+$ -Konzentration wesentlich auf den  $H^+$ -Konzentrationsgradienten als Triebkräfte des Transportvorgangs aus. Mit steigender extrazellulärer  $H^+$ -Konzentration sind bei SUC/ $H^+$ -Symportern aufgrund einer Erhöhung der Triebkraft für den SUC/ $H^+$ -Transport in die Oozyte auch höhere Einwärtsströme zu erwarten. Dies konnte 2005 für ZmSUT1 in einem Bereich zwischen pH 4,5 und pH 6,5 bereits bestätigt werden (Carpaneto et al., 2005). Für UmSrt1 wurde ebenfalls eine pH-abhängige Transportaktivität mit einem Optimum im sauren Bereich bei pH 5 – 5,5 ermittelt (Wahl et al., 2010; Wippel et al., 2010). Diese pH-Abhängigkeit von UmSRT1 sollte im Rahmen dieser Arbeit unter Spannungskontrolle im heterologen Expressionssystem der Oozyten überprüft werden. Dabei wurde die Transportaktivität nach SUC-Zugabe bei verschiedenen extrazellulären  $H^+$ -Konzentrationen bestimmt:

In Abbildung 3.9 sind die Originalströme bei -100 mV und pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 7,5 von ZmSUT1- und UmSrt1-exprimierenden Oozyten abgebildet.

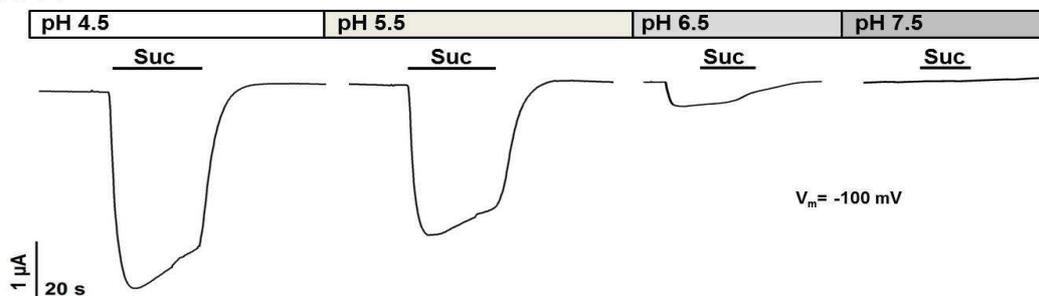
In Anwesenheit von 100 mM SUC in der Badlösung waren die höchsten Transportströme von ZmSUT1 bei pH 4,5 zu verzeichnen (Abbildung 3.10a). Die Abnahme der  $H^+$ -Konzentration führte zu einer Abnahme der  $I_{ss}$ . Bei pH 5,5 waren 20% geringere Ströme als bei pH 4,5 zu verzeichnen. Die weitere Verringerung der  $H^+$ -Konzentration, bei einem Wechsel von pH 5,5 auf pH 6,5, führte zu einem deutlichen Verlust der Transportaktivität um weitere 60 % verglichen mit den Werten bei pH 4,5. Bei einem externen Medium mit einem pH-Wert von 7,5 konnte keine nennenswerte Transportaktivität mehr detektiert werden.

UmSRT1 zeigte die höchsten Transportströme bei einer SUC-Konzentration von 1 mM bei pH 5,5 (Abbildung 3.10b). Bei pH 4,5 wurden niedrigere Ströme als bei pH 5,5 verzeichnet, die bei pH 6,5 im Vergleich zu pH 5,5 ebenfalls erniedrigt waren.

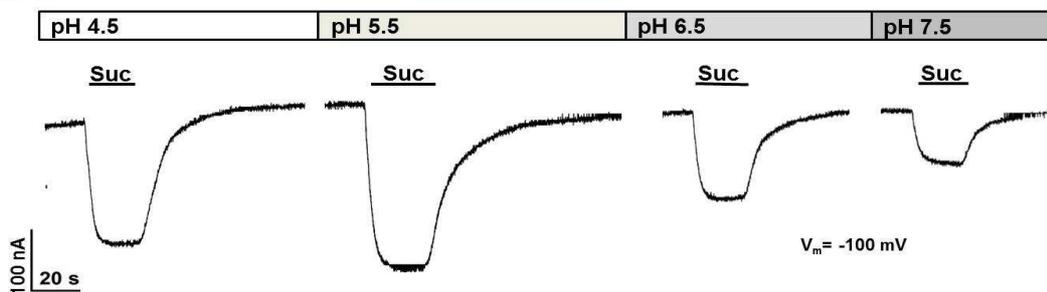
## Ergebnisse

Im Gegensatz zu ZmSUT1 konnten mit UmSRT1 injizierten Oozyten bei pH 7,5 jedoch weiterhin deutliche Transportaktivitäten verzeichnet werden.

### a) ZmSUT1



### b) UmSrt1

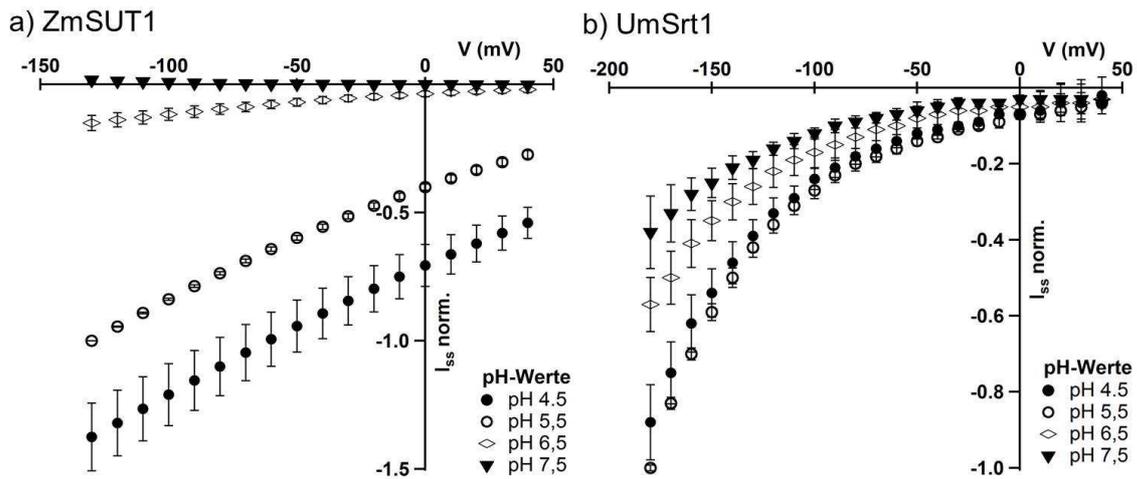


**Abbildung 3.9: SUC-induziert Originalströme bei verschiedenen pH-Werten**

Die Antworten auf die Zugabe sättigender SUC-Konzentrationen sind anhand der repräsentativen Originalströme im zeitlichen Verlauf bei den pH-Werten 4,5, 5,5, 6,5 und 7,5 gezeigt. Die Haltespannung betrug  $-100$  mV und der Wechsel der pH-Werte ist mit den verschiedenfarbigen Balken angezeigt. a) ZmSUT1-vermittelte  $I_{ss}$  bei Zugabe von 100 mM SUC. b) UmSrt1-vermittelte  $I_{ss}$  bei Zugabe von 1 mM SUC.

Der physiologische Bereich der pH-Werte von 4,5 bis 7,5 wurde mit Einzelspannungspuls-Messungen untersucht, um die Aktivitäten der Transporter über einen weiten Spannungsbereich beobachten zu können. Die daraus resultierenden normalisierten Differenzströme wurden gegen die Spannung aufgetragen und sind in Strom-Spannungskennlinien in Abbildung 3.10 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.10: Strom-Spannungskennlinien zur pH-Abhängigkeit**

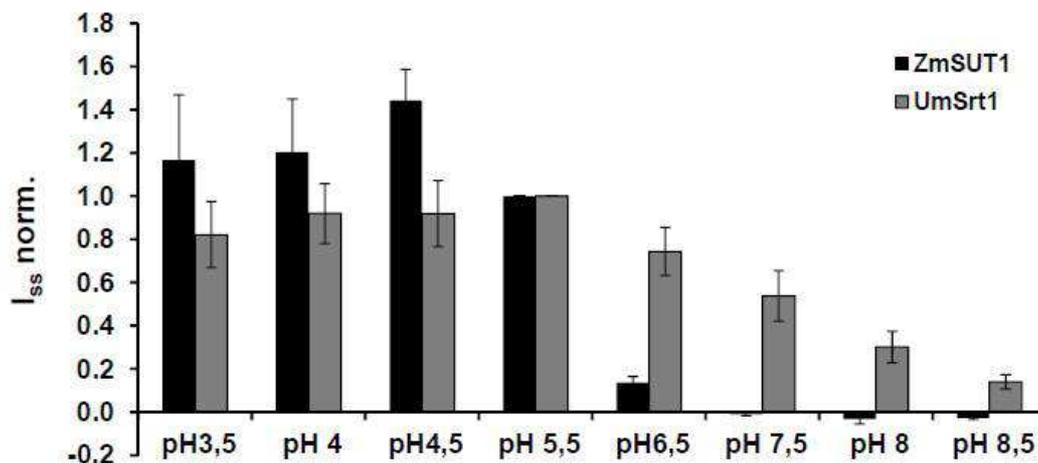
Differenzströme bei den pH-Werten 4,5, 5,5, 6,5 und 7,5 wurden gegen die Spannung aufgetragen. a) Die Ströme wurden auf den Wert von 100 mM SUC bei pH 5,5 und -130 mV normalisiert. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ . b) Ströme von UmSrt1 in Anwesenheit von 1 mM SUC. Die Ströme wurden auf den Wert von 1 mM SUC bei pH 5,5 und -180 mV normalisiert. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ .

ZmSUT1 zeigte über den gesamten getesteten Spannungsbereich von +40 bis -130 mV (Abbildung 3.10a) einen linearen Kurvenverlauf. Diese lineare Zunahme der Transportströme mit hyperpolarisierenden Spannungen blieb bei allen getesteten  $H^+$ -Konzentrationen nahezu gleich, lediglich die absoluten Werte der Transportströme sanken mit Abnahme der Protonenkonzentration. Wie bereits in Abbildung 3.9a) gezeigt, konnte die höchste Transportaktivität bei pH 4,5 gemessen werden. Die weitere Abnahme der externen  $H^+$ -Konzentration führte zu geringeren Transportströmen, die bei pH 7,5 kaum noch detektiert werden konnten.

Wie bereits bei den Messungen mit kontinuierlicher Membranspannung zu erahnen war (Abbildung 3.9), besitzt UmSrt1 ein pH-Optimum bei pH 5,5. Diese pH-Abhängigkeit deckt sich sehr gut mit den in Hefen angefertigten Analysen (Wahl et al., 2010; Wippel et al., 2010). Die Stromspannungskurven besitzen bei allen getesteten pH-Werten einen leicht hyperpolarisationsaktivierten Verlauf (vgl. Abbildung 3.4b und Abbildung 3.5a). Im Gegensatz zu ZmSUT1 konnten mit UmSRT1-exprimierenden Oozyten jedoch auch bei

## Ergebnisse

pH 7,5 noch deutliche SUC-induzierte Ströme aufgezeichnet werden. Diese breite pH-Abhängigkeit unterscheidet UmSRT1 deutlich von ZmSUT1.



**Abbildung 3.11: Vergleich der Transportaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten**

Dargestellt sind die Differenzströme Transporter-vermittelter  $I_{ss}$  bei den pH-Werten 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8 und 8,5 und einer Haltespannung von -100 mV. Die Ströme von ZmSUT1 (schwarz) wurden auf den Wert von 100 mM SUC bei pH 5,5 normalisiert. Die Ströme von UmSrt1 (grau) wurden auf den Wert von 1 mM SUC bei pH 5,5 normalisiert. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n \geq 5$ .

Da UmSRT1 selbst in Abwesenheit eines  $H^+$ -Gradienten über der Oozytenmembran (pH 7,5 extern und ca. pH 7,5 zytosolisch; ermittelt in vielen Experimenten mit pH-sensitiven Mikroelektroden in der AG Geiger) noch Transportströme vermittelte, wurde das Transportverhalten von ZmSUT1 und UmSrt1 in einem noch breiteren Spektrum an externen  $H^+$ -Konzentrationen vergleichbar betrachtet. Da die Variante der Singlepuls-Messungen eine exaktere Bestimmung der Differenzströme zulässt, wurde die statistische Analyse der Transportaktivitäten über den Bereich der pH-Werte 3,5 bis 8,5 mittels Singlepulse-Messungen (Kap.2.5.4) angefertigt (Abbildung 3.11).

Im stark sauren pH- Bereich ab pH 3,5 bis pH 5,5 wurden für UmSrt1 ansteigende  $H^+$ -Ströme gemessen, bis das Maximum bei pH 5,5 erreicht war. Die Ströme verloren ab pH 6,5 bis pH 8,5 wieder gleichmäßig an Intensität. Bei pH 8,5 konnten jedoch noch immer deutliche Transportaktivitäten gemessen werden. Damit deckte UmSrt1 den gesamten

## Ergebnisse

---

pH-Bereich mit einer Transportaktivität ab und es konnte eine relativ schwache Sensitivität der Transportaktivität gegenüber Schwankungen im extrazellulären pH-Wert beobachtet werden.

Für ZmSUT1 stieg die Höhe der Ströme im sauren pH- Bereich von pH 3,5 bis pH 4 ebenfalls nur sehr gering an. Bei pH 4,5 erreichte die Transportaktivität von ZmSUT1 ihr Maximum. Bei pH 5,5 nahmen die SUC-induzierten Ströme bereits deutlich ab und waren bei pH 6,5 nur noch sehr schwach. Die Aktivität von ZmSUT1 kam bereits bei neutralem pH-Wert (7) zum Erliegen, weshalb bei pH 7,5 keine nennenswerte Transportaktivität mehr gemessen wurde. Für die SUC/H<sup>+</sup>-Symporter ZmSUT1 und UmSrt1 konnten also unterschiedlich starke pH-Abhängigkeiten der Transportströme aufgezeigt werden, wobei UmSrt1 mit deutlich geringeren Schwankungen in der Transportaktivität auf die wechselnden pH-Wert Bedingungen reagierte.

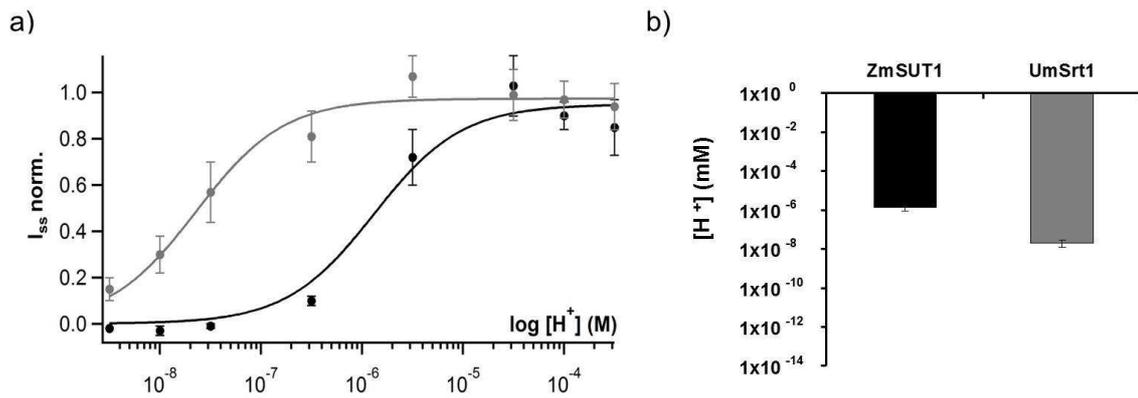
### 3.1.2.3.1 Ermittlung der Affinitäten gegenüber Protonen (H<sup>+</sup>)

Für ZmSUT1 wurde ein Transport von SUC im Symport mit H<sup>+</sup> belegt, welcher einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (H<sup>+</sup>:SUC) folgt. Carpaneto et al. bestimmten in der Charakterisierung von ZmSUT1 (2005) den K<sub>m</sub>-Wert für H<sup>+</sup> (K<sub>m</sub><sup>H</sup>) auf 5,7 μM bei -100 mV (Carpaneto et al., 2005).

Die normalisierten Differenzströme aus den Singlepuls-Messungen zur pH-Abhängigkeit (Abbildung 3.11) wurden gegen den Logarithmus der H<sup>+</sup>-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.12a). Dies lieferte die Grundlage zur Berechnung der K<sub>m</sub><sup>H+</sup>-Werte von ZmSUT1 und UmSrt1 über einen Michaelis-Menten Fit (Abbildung 3.12b).

Der berechnete K<sub>m</sub><sup>H+</sup>-Wert bei einer Haltespannung von -100 mV betrug für ZmSUT1  $1,36 \pm 0,4 \mu\text{M H}^+$ . Diese H<sup>+</sup>-Konzentration entspricht einem pH-Wert von  $5,9 \pm 0,47$ . Dieses Ergebnis liegt im ähnlichen Bereich, wie der K<sub>m</sub><sup>H+</sup>-Wert, der von Carpaneto et al. (2005) bestimmt wurde (5,7 μM bei -100 mV).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.12:**  $K_m^{H^+}$ -Werte von ZmSUT1 und UmSRT1

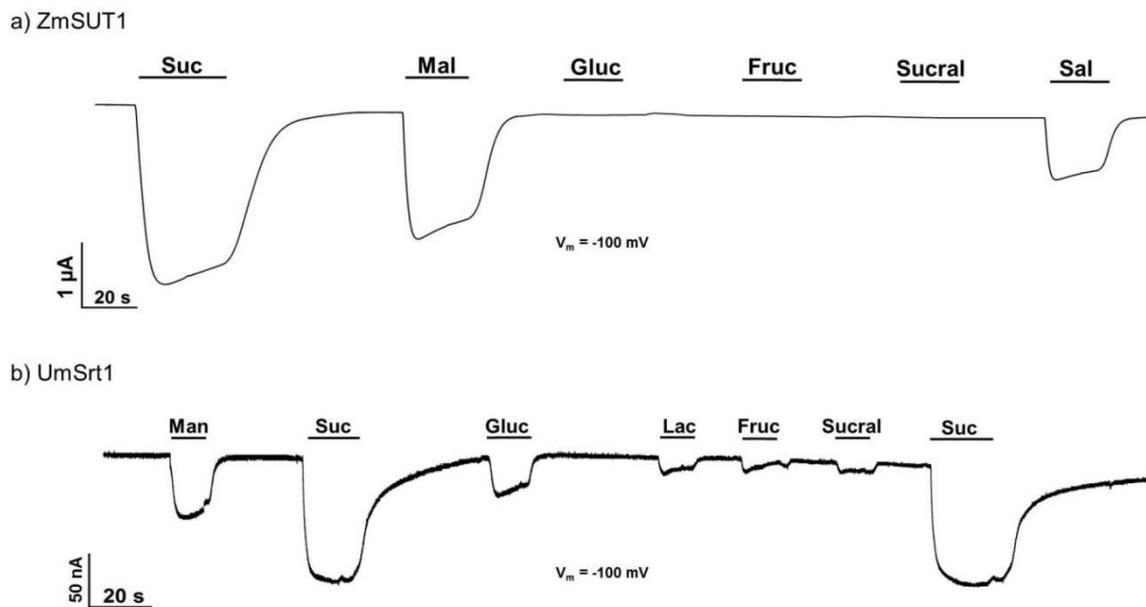
a) Darstellung der normalisierten  $I_{ss}$  bei einer Haltespannung von -100 mV aufgetragen gegen die logarithmische  $H^+$ -Konzentration. Die Daten wurden mit der Michaelis-Menten Gleichung gefittet (durchgezogene Linien). Die Ströme von ZmSUT1 und UmSrt1 wurden jeweils auf  $I_{max}$  normalisiert. ZmSUT1 (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ ) und UmSrt1 (grau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n \geq 5$ ). b) Vergleich der berechneten  $K_m^{H^+}$ -Werte (in  $\mu M$ , aus den Daten, die bei a) aufgetragen wurden) bei einer Haltespannung von -100 mV.

Für UmSrt1 betrug der errechnete  $K_m^{H^+}$  bei -100 mV  $20,04 \pm 8$  nM  $H^+$ . Dieser geringere Wert der  $H^+$ -Konzentration entspricht einem pH-Wert von  $7,7 \pm 0,31$ . Damit besitzt UmSrt1 eine höhere Affinität gegenüber  $H^+$  als ZmSUT1, die sich in einem 68-fach niedrigeren  $K_m^{H^+}$ -Wert niederschlägt.

### 3.1.3 Ermittlung der Substratspezifität

Die Messungen zur Substratspezifität wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Singlepuls Messungen (Kap.2.5.4) bei einer Haltespannung von -100 mV durchgeführt. Hierbei wurden die natürlichen Monosaccharide Glucose, Fructose und Mannose, die Disaccharide Maltose und Lactose, das Trisaccharid Raffinose und Salicin (Saligenin- $\beta$ -D-glucopyranosid) sowie der synthetische Zucker Sucralose (Trichlorgalactosaccharose) getestet. Bei ZmSUT1-injizierten Oozyten wurden die Messlösungen auf eine Konzentration von 100 mM, bei UmSRT1-injizierten Oozyten auf 1 mM des jeweiligen Zuckers eingestellt.

## Ergebnisse

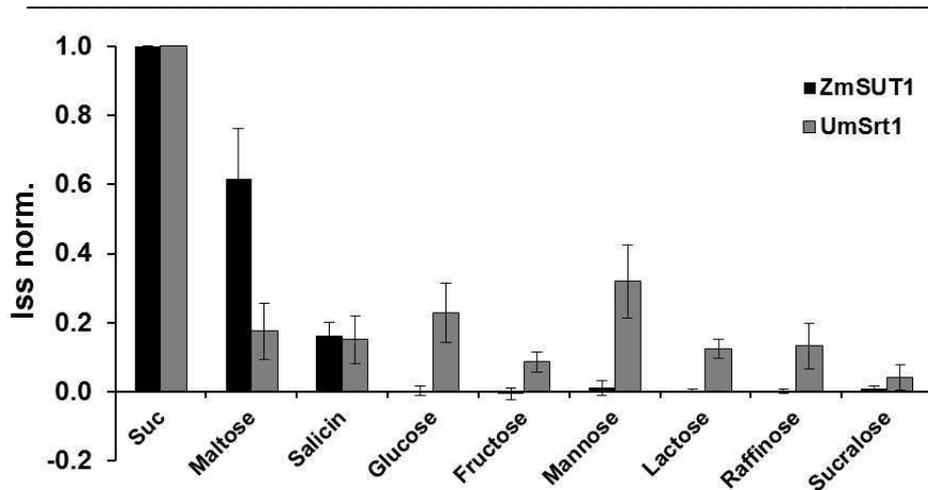


**Abbildung 3.13: Originalströme als Antwort auf Zugabe putativer Substrate**

Repräsentative I<sub>ss</sub> im zeitlichen Verlauf bilden die Antwort auf die Zugabe putativer Substrate bei -100 mV ab. a) I<sub>ss</sub> von ZmSUT1 als Antwort auf die Applikation verschiedener Zucker mit einer Konzentration von jeweils 100 mM. b) I<sub>ss</sub> von UmSrt1 als Antwort auf die Applikation verschiedener Zucker mit einer Konzentration von jeweils 1mM. (SUC=Saccharose, Fruc=Fructose, Gluc=Glucose, Lac=Lactose, Mal=Maltose, Man=Mannose, Sucral=Sucralose)

Der Vergleich der Substratspezifität von ZmSUT1 und UmSrt1 (Abbildung 3.13) weist auf unterschiedliche Substratspektren hin. ZmSUT1 wies für die Aufnahme von SUC die höchsten Transportströme auf und stellt damit das primäre Substrat dar. Geringere Transportaktivitäten konnten nur für Maltose und Salicin ermittelt werden. Gemessen an der Transportaktivität für SUC erreichten die Transportströme für Maltose eine Intensität von 61 %, für Salicin konnte eine Intensität von 17 % bestimmt werden. Keines der weiteren getesteten Substrate führte zu einer nennenswerten Transportaktivität (siehe auch Abbildung 3.13a), was auf ein enges Substratspektrum von ZmSUT1 hinweist. Diese SUC-Spezifität ist typisch für einen Vertreter der monokotylen Typ II SUT's (Reinders et al., 2006).

## Ergebnisse



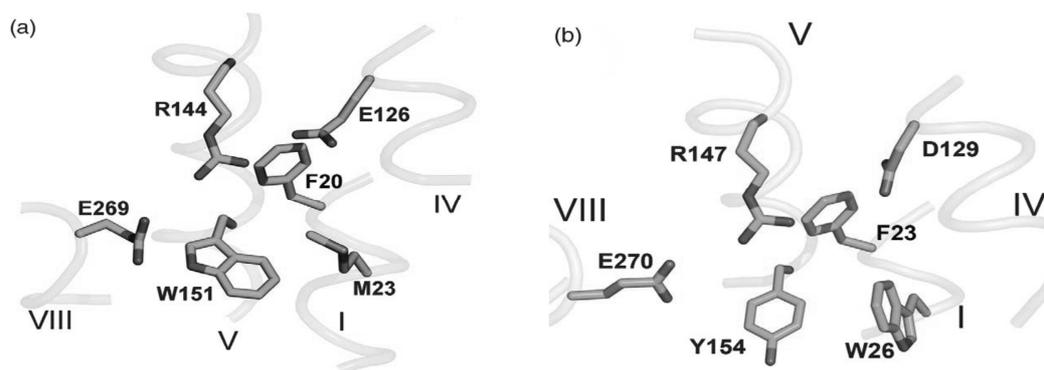
**Abbildung 3.14: Vergleich der Substratspezifität von ZmSUT1 und UmSrt1**

Aufgetragen sind die Zucker-induzierten, normalisierten Differenzströme bei -100 mV und pH 5,5. Bei ZmSUT1 (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) wurden die Substrate mit einer Konzentration von 100 mM getestet. Die Ströme von ZmSUT1 wurden auf den Wert in Anwesenheit von 100 mM SUC normalisiert. Für UmSrt1 (grau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=8) lagen die getesteten Substrate in einer Konzentration von 1 mM vor. Die Ströme wurden auf den Wert in Anwesenheit von 1 mM SUC normalisiert.

SUC stellt auch bei UmSrt1 das Hauptsubstrat mit der höchsten Transportrate dar (Abbildung 3.13b und Abbildung 3.14). Jedoch konnten bei UmSrt1 mit allen getesteten Substraten Transportströme detektiert werden. Gemessen an der Aufnahme von SUC konnte für Mannose eine Intensität der Transportströme von 32 % und für Glucose von 22 % detektiert werden. Die Transportströme der weiteren Substrate betragen für Maltose 17 %, Salicin 15 %, Raffinose 13 %, Lactose 12 %, Fructose 8 % und Sucralose 4 % bezogen auf die Transportrate für SUC. Damit weist UmSrt1 ein sehr breites Spektrum an Substanzen auf, die transloziert werden können, auch wenn diese lediglich mit geringer Intensität transportiert werden.

### 3.2 Identifizierung der ZmSUT1-Substratbindestelle

Die grundlegenden Charakteristika eines Transportproteins geben Aufschluss über dessen Funktion und Regulation. Um jedoch den Transportmechanismus und die molekulare Struktur von ZmSUT1 im Detail zu verstehen, sind Mutagenesestudien unabdingbar. Eine wichtige Station auf dem Weg zur molekularen Struktur von ZmSUT1 ist die Identifizierung der Substratbindestelle, also das Auffinden von AS-Seitenketten, die an der Bindung des Substrats SUC beteiligt sind. Intensive Struktur-Funktionsuntersuchungen mit Hilfe von Mutagenesestudien und schließlich die Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse führten zur Aufklärung der molekularen Struktur der Lactose Permease LacY, einem Mitglied der MFS-Familie aus *E.coli* (Abramson et al., 2003a; Abramson et al., 2003b).



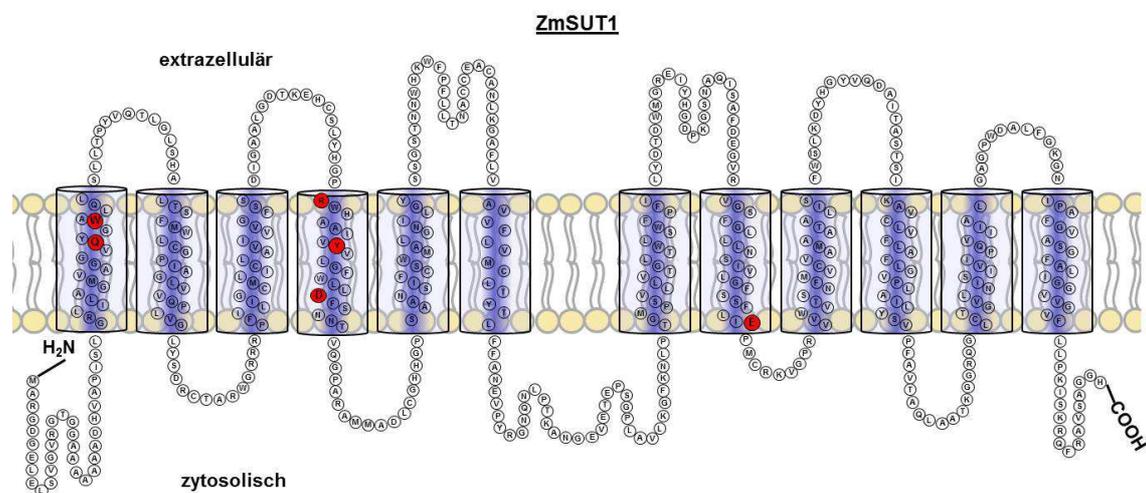
**Abbildung 3.15: Substratbindestellen von LacY und CsCb aus *E. coli***

Vergleich der Substratbindestellen von LacY (a) und CsCb (b) (Vadyvaloo et al., 2006).

Die Koordinierung des Substrats in LacY wird von sechs Aminosäureresten gebildet (F20, M23, E126, R144, W151 und E269), die sich in der Mitte der N-terminalen Transmembranen befinden (Abramson et al., 2003a). Mutagenesestudien mit dem *E.coli* SUC-Transporter CscB bestätigten den hohen Konservierungsgrad zwischen LacY und CsCb, da die Bindestellen beider Transporter an der gleichen Position gefunden wurde (Vadyvaloo et al., 2006). Lediglich der Charakter der Seitenketten unterscheidet sich an drei Positionen geringfügig (Abbildung 3.15).

## Ergebnisse

Hydrophobizitätsanalysen mit dem Programm TmHMM\_v2 ergaben die Anzahl und die Positionen der transmembranen Helixes von ZmSUT1 (Sonnhammer et al., 1998). Der Maistransporter besitzt zwölf transmembrane Domänen wobei die N- und C-terminalen Anhänge ins Zytosol ragen. Das 2D-Strukturmodell in Abbildung 3.16 wurde auf Basis der Hydrophobizitätsanalysen und vergleichenden Analysen von bekannten SUC-Transportern aus verschiedenen Pflanzen erstellt (TmHMM\_v2; <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>). So konnte die grobe Topologie des Proteins bildlich in einem 2-D Modell dargestellt werden.

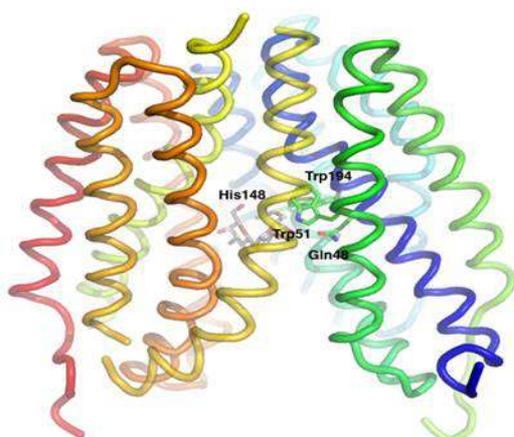


**Abbildung 3.16: 2-D Strukturmodell von ZmSUT1**

Vorhergesagte Topologie von ZmSUT1. Die rot markierten AS zeigen die Positionen der generierten Mutanten.

Um jedoch einen Eindruck über die dreidimensionale Struktur von ZmSUT1 zu erlangen, modellierte Prof. Thomas Müller (Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg) die AS-Sequenz von ZmSUT1 in die bekannte Kristallstruktur von LacY. Aufgrund der langen extrazellulären und zytosolischen Schleifen des pflanzlichen Proteins beschränkt sich das 3D-Modell in Abbildung 3.17 auf die transmembranen Bereiche von ZmSUT1.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.17: 3-D Modell von ZmSUT1**

3-D Strukturmodell der transmembranen Domänen von ZmSUT1 (QUANTA).

Die 2-D- und 3-D-Arbeitsmodelle wurden herangezogen, um Aminosäuren für die Mutagenesestudie zur Identifizierung der Substratbindestelle von ZmSUT1 auszuwählen. Es wurden AS-Reste zur Mutagenese ausgewählt, die an homologen Positionen zur Bindestelle in LacY bzw. CscB lagen und die ähnliche Eigenschaften wie die entsprechenden AS in LacY bzw. CscB aufwiesen (Tabelle 3.2). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die zu mutierenden AS innerhalb der SUC-Transporter Familie konserviert waren. In Abbildung 3.18 wurden die Mutagenesestellen in ein Aminosäurealignment zwischen 4 nahe verwandten pflanzlichen SUC-Transportern des Typ II (Reinders et al., 2006) eingezeichnet.

<b>LacY (<i>E.coli</i>)</b>	<b>CscB (<i>E.coli</i>)</b>	<b>ZmSUT1 (<i>Zea maize</i>)</b>
F20 (Helix I)	F23 (Helix I)	Q48C/Q48F (Helix I)
M23 (Helix I)	W26 (Helix I)	W51A (Helix I)
E126 (Helix IV)	D129 (Helix IV)	D161A (Helix IV)
R144 (Helix V)	R147 (Helix V)	R146A (Helix IV)
W151 (Helix V)	Y154 (Helix V)	Y153A/Y153W (Helix IV)
E269 (Helix VIII)	E270 (Helix VIII)	E362A (Helix VIII)

**Tabelle 3.2: Vergleichende Übersicht der ausgewählten Mutationstellen**

Verglichen wurden die bereits bekannten AS der Bindestellen von LacY und CscB. mit konservierten AS in homologen Positionen in ZmSUT1.

## Ergebnisse

---

Durch PCR-basierte Mutagenesen (siehe Kap. 2.2.4.4) wurde die Wildtyp-Sequenz von ZmSUT1 an den Positionen Q48, W51, R146, Y153, D161 und E362 mutiert (siehe markierte Positionen in Abbildung 3.16 und Abbildung 3.18).

Die verhältnismäßig großen hydrophoben aromatischen AS Tyrosin (Y) und Tryptophan (W), die hydrophilen AS Arginin (R; basisch; mit einer Aminogruppe), Asparaginsäure (D; mit einer Säuregruppe) und Glutaminsäure (E; mit einer Säuregruppe) sowie die ambivalente AS Glutamin (Q; mit einer Aminogruppe) wurden durch ein Alanin (A) ersetzt.

Der „ursprüngliche Charakter“ wurde hin zu einem „unpolaren Charakter“ mit einem verhältnismäßig kleinen AS-Rest in dieser Position verändert.

Weitere Veränderungen bestanden im Austausch der AS Glutamin (Q; mit einer Aminogruppe) mit einem verhältnismäßig kleinen AS-Rest durch die hydrophobe aromatische AS Phenylalanin (F) mit einer relativ großen Seitenkette.

Des Weiteren sollte mit dem Ersetzen der AS Tyrosin (Y) hin zu einem Tryptophan (W) untersucht werden, welche Auswirkungen der konservative Austausch zweier aromatischer AS „gleichen Charakters“ hat.

Die Erstellung der Mutanten ZmSUT1 Q48C, W51A, R146A, Y153A, D161A und E362A erfolgte im Rahmen meiner Diplomarbeit in der AG Hedrich, sowie deren erste elektrophysiologische Charakterisierung bezüglich der Funktionalität und Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte. Die bereits erhobenen Daten aus meiner Diplomarbeit konnten mit modifizierten experimentellen Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit reproduziert und um die Mutanten Q48F und Y153W erweitert werden. Somit ergaben sich die folgenden Mutanten: ZmSUT1 Q48C, Q48F, W51A, R146A, Y153A, Y153W, D161A und E362A.

Analysen zur Substratspezifität stellen ebenfalls ein sehr wichtiges Werkzeug bei der Aufklärung der Struktur und Funktion von Transportproteinen dar. Daten über Substratspezifitäten in Verbindung mit Unterschieden in den Proteinsequenzen können hilfreich bei der Suche nach den Positionen der AS sein, die an Bindung und Translokation des Substrats beteiligt sind. Die Informationen, welche AS beteiligt sind und wo ihre Position im Protein ist, hilft weiterhin, den genauen Mechanismus der Erkennung und den anschließenden Transport der SUC zu entschlüsseln.

## Ergebnisse

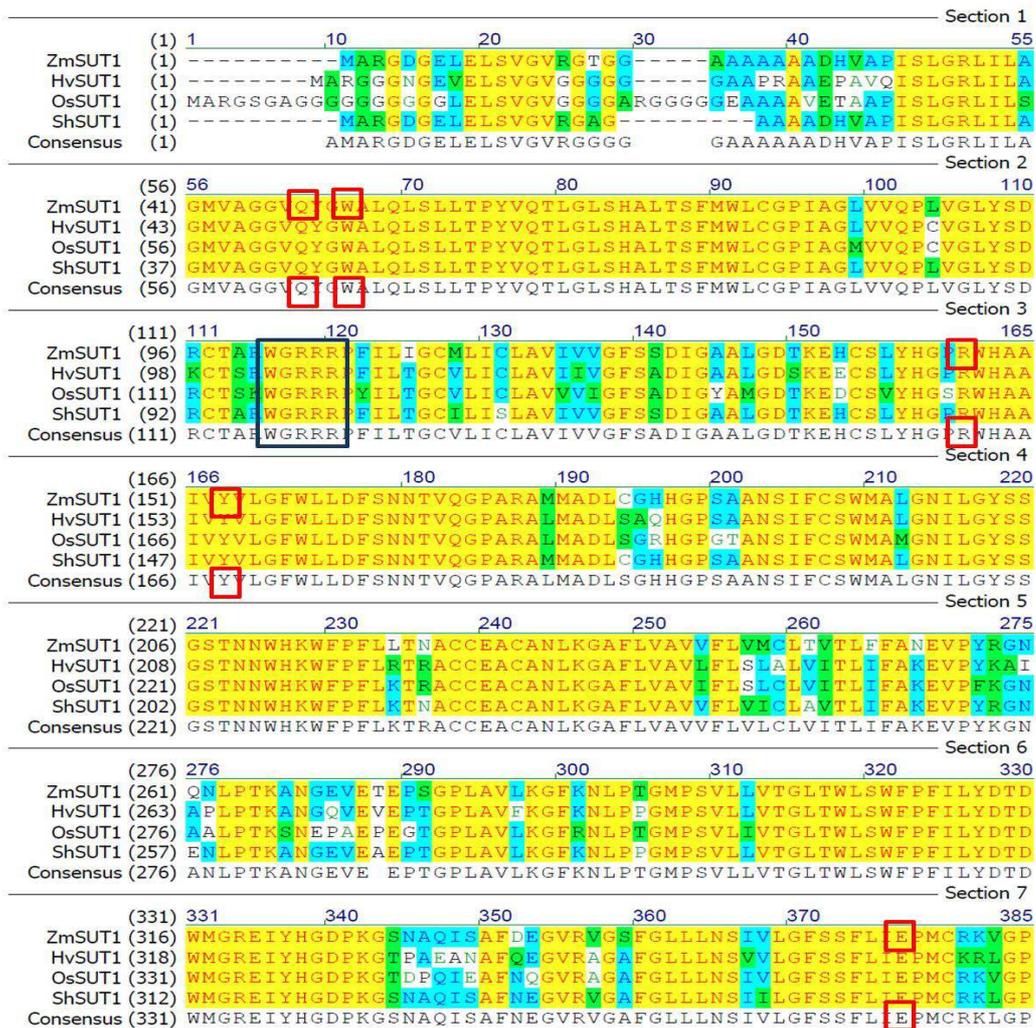


Abbildung 3.18: Sequenzvergleich von vier SUC-Transportern aus Monokotylen

Ausschnitt eines Sequenzvergleichs der N-terminalen Hälfte nahe verwandter SUC-Transporter aus Monokotyledonen der Typ-II Familie. Weisen alle SUC-Transporter an der gleichen Position identische AS auf, sind sie gelb markiert. Weisen mindestens zwei Transporter die gleiche AS auf, sind diese blau markiert. Grün markierte AS haben den gleichen „Charakter“. Die roten Kästchen markieren die mutierten AS; das dunkelblaue Kästchen markiert das SUC-Transporter „Erkennungsmotiv“.

Die Mutanten wurden analog zu den Bedingungen der oben beschriebenen Charakterisierung des ZmSUT1 WTs und demnach bezüglich ihrer Spannungs-, Substrat- und pH-Abhängigkeit, Substratspezifität hin untersucht. Der  $K_m^S$ -Wert von ZmSUT1 bei -100mV (7,2 mM) wurde im Folgenden als Referenzwert herangezogen, mit dem die  $K_m^S$ -Werte der generierten ZmSUT1-Mutanten verglichen wurden.

Falls eine Mutante in der Bindung von SUC gestört sein sollte, wäre eine Reduktion, oder sogar ein kompletter Verlust der Fähigkeit des SUC-Transports denkbar. Dies würde sich in der Reduktion oder sogar dem Verlust der Transportströme ablesen lassen. Bei Mutanten, die weiterhin aktiv sind, sollte sich dieser Effekt auf die Substrataffinität auswirken und wäre damit anhand veränderter  $K_m$ -Werte ablesbar. Um bei inaktiven Mutanten zu evaluieren, ob das Protein translatiert wird und richtig in der Membran exprimiert wird, wurde eine weitere elektrophysiologische Methode angewendet, die Messung der Membrankapazität ( $C_m$ ).

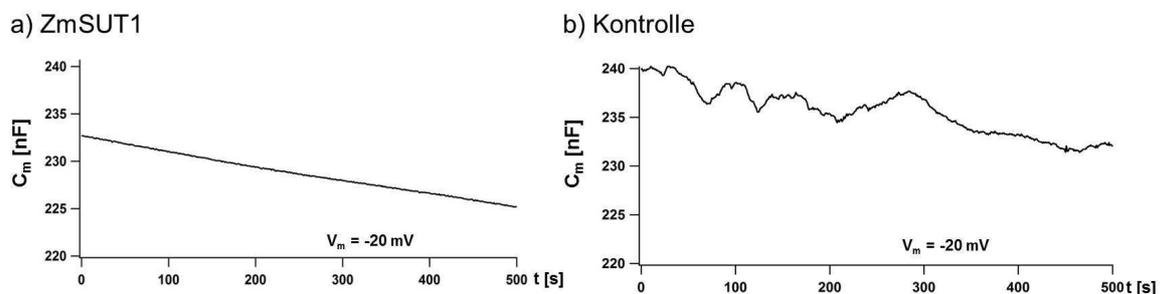
### 3.2.1 Kapazitätsänderungen ( $\Delta C_m$ ) von ZmSUT1 WT

Neben der Leitfähigkeit stellt die  $C_m$  einer Zelle ein wichtiges Charakteristikum dar. Vergleicht man die Zelle mit einem nahezu kugelförmigen Plattenkondensator, so stellen das Zytosol und die extrazelluläre Lösung die beiden Kondensatorpole und die sehr gut elektrisch isolierende Zellmembran die Schicht des Dielektrikums dar. Änderungen der Membrankapazität ( $\Delta C_m$ ) resultieren aus Ladungsverschiebungen im elektrischen Feld der Membran. Dies kann aufgrund von Endo- und Exozytoseprozessen geschehen, die Veränderungen an der Membranoberfläche bewirken. Auch das Binden und wieder Wegdiffundieren von Kationen in und aus dem elektrischen Feld der Membran/ des Dielektrikums beeinflusst die  $C_m$ .

Mittels der Patch Clamp Technik wurden die ersten  $\Delta C_m$ -Messungen an lebenden Zellen im Jahre 1978 an Axonen von Riesenkalmaren und Seeigeleiern durchgeführt (Jaffe, 1978; Gillespie, 1979). Durch weitere Arbeiten von E. Neher wurde es möglich, Kapazitätsänderungen in der Größenordnung von einigen Femtofarad (fF) zu erfassen (Neher & Sakmann, 1976; Neher & Marty, 1982). Im Jahre 2002 wurde eine Methode entwickelt, die mit der DEVC-Methode gekoppelte  $\Delta C_m$ -Messungen mit *Xenopus* Oozyten ermöglicht. Es ist eine unkomplizierte, aber präzise und hoch auflösende Methode, die eine simultane Aufzeichnung und unmittelbare Abbildung der  $\Delta C_m$  und weiteren elektrischen Parametern zulässt (Schmitt, 2002).

## Ergebnisse

Da die  $\Delta C_m$  das Binden von  $H^+$  im elektrischen Feld an den Transporter widerspiegeln (Carpaneto et al 2010), könnten die Mutanten, die keinen SUC-induzierten Strom mehr aufweisen, eventuell noch über die Messung der  $C_m$  charakterisiert werden.



**Abbildung 3.19: Messungen der  $\Delta C_m$  in Abwesenheit von SUC**

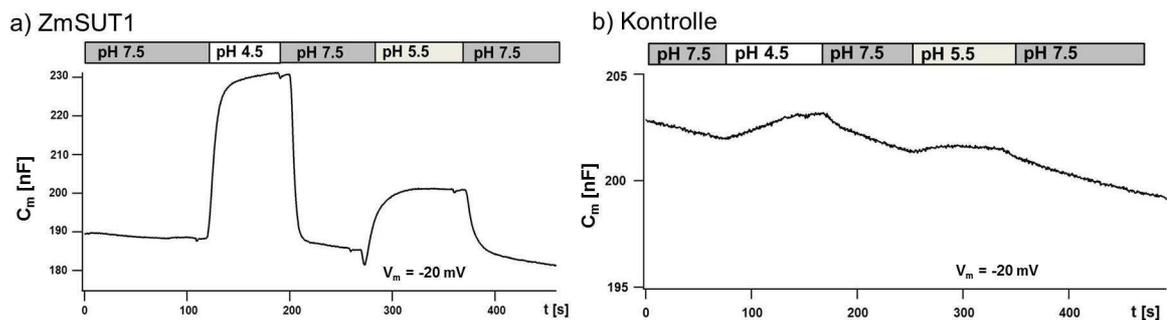
Abgebildet sind die zeitlichen Verläufe von  $C_m$ -Messungen bei einem Membranpotential von  $-20$  mV und einem pH-Wert von 5,5 in Abwesenheit von SUC. a) Messung einer ZmSUT1-injizierten Oozyte. b) Messung einer uninjizierten Kontrollloozyte.

Im Verlauf meist mehrerer Minuten andauernder kontinuierlicher Messungen der Membrankapazität ( $C_m$ ) war stets ein leichtes Abnehmen der kapazitiven Werte über die Zeit zu beobachten (Abbildung 3.19a). Dieser „rundown“ trat bei allen Messungen auf und korrelierte nicht mit der Expressionsstärke der Membranproteine, da dieser auch bei Messungen uninjizierter Kontrollloozyten auftrat (Abbildung 3.19b). Vermutlich ist dieser langsame Abfall der  $C_m$  auf endozytotische Prozesse zurückzuführen, die eine Reduktion der Membranoberfläche bewirken und sich somit auf die Kapazität der Membran niederschlagen. Während die Messungen ZmSUT1-injizierter Oozyten einen stabilen Verlauf der  $C_m$  aufwiesen (Abbildung 3.19a), war ein eher unruhiges „Zappeln“ im Verlauf der  $C_m$  sehr charakteristisch bei Messungen mit uninjizierten Kontrollloozyten (Abbildung 3.19b).

Die bereits veröffentlichten Daten von Geiger et al. (2010) beschreiben ein Abnehmen der  $C_m$  bei abnehmender  $H^+$ -Konzentration (Carpaneto et al., 2010). Das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment (Abbildung 3.20a) zeigt das Verhalten der  $C_m$  von ZmSUT1 bei ansteigenden  $H^+$ -Konzentrationen. Die kontinuierlichen Messungen der  $C_m$  bei einer Haltespannung von  $-20$  mV ergaben ausgehend von pH 7,5 beim Wechsel zu Lösungen

## Ergebnisse

mit steigender  $H^+$ -Konzentration ein Ansteigen der Werte. Die Erhöhung der  $H^+$ -Konzentration von pH 7,5 auf pH 4,5 führte zu einem Anstieg der  $C_m$ -Werte um 40 nF, der Wechsel von pH 7,5 auf pH 5,5 führte lediglich zu einem Anstieg um 20 nF. Die Kontrollloozyte zeigte, wie erwartet, keine nennenswerten  $\Delta C_m$  beim Wechsel zu Lösungen mit steigender  $H^+$ -Konzentration (Abbildung 3.20b).



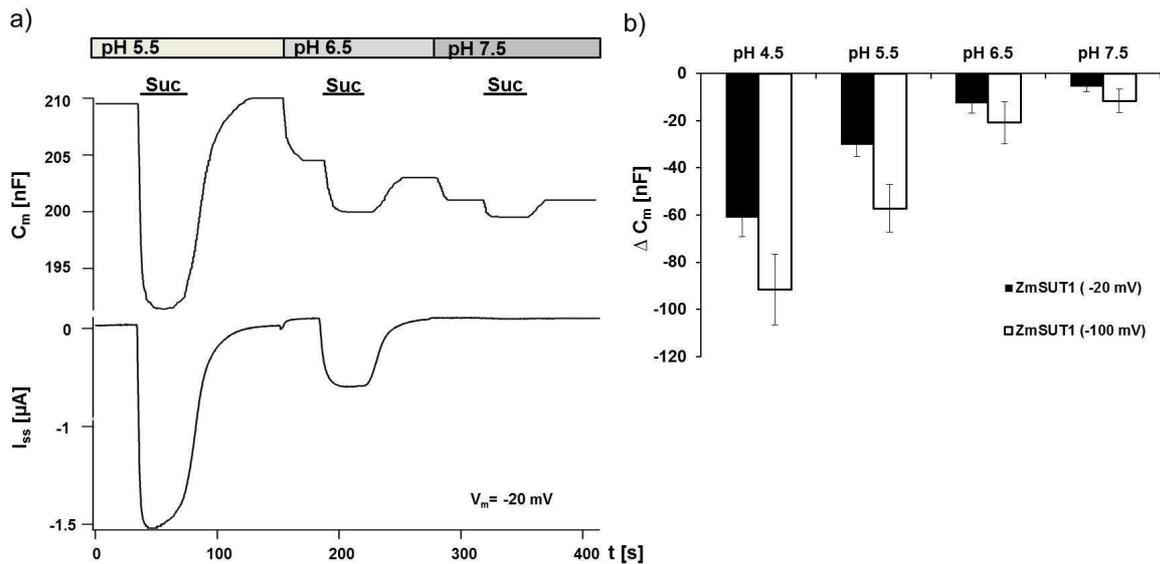
**Abbildung 3.20: Messungen der  $\Delta C_m$  bei verschiedenen  $H^+$ -Konzentrationen**

$C_m$ - Messungen mit wechselnden  $H^+$ -Konzentrationen. Der Wechsel der pH-Werte ist durch die verschiedenfarbigen Balken angezeigt. a) Messung einer ZmSUT1-injizierten Oozyte. d) Messung einer uninjizierten Kontrollloozyte.

Carpaneto et al. (2010) konnten zeigen, dass selbst in Abwesenheit von SUC extrazelluläre  $H^+$  im elektrischen Feld der Membran an den Transporter binden. Das Vorhandensein von geladenen Molekülen/Ionen im elektrischen Feld der Membran erhöht  $C_m$ . Deshalb nimmt  $C_m$  mit steigender Protonenkonzentration im extrazellulären Raum bei ZmSUT1-exprimierenden Oozyten zu.

In Anwesenheit von SUC findet dieses Binden der  $H^+$  an ZmSUT1 ebenfalls statt, jedoch werden die  $H^+$  nun im Symport mit SUC auf die andere Seite der Membran ins Zytosol transportiert und tragen deshalb nicht mehr zur  $C_m$  bei. Der Transport der  $H^+$  unterbricht also die Ladungstrennung durch die Membran und schlägt sich somit in einer Abnahme der kapazitiven Werte nieder.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.21:  $\Delta C_m$  bei SUC-Zugabe und verschiedenen pH-Werten**

a) Repräsentative Ganzzellströme mit paralleler Aufnahme der  $\Delta C_m$  einer ZmSUT1-injizierten Oozyte bei -20 mV als Antwort auf den Wechsel verschiedener  $H^+$ -Konzentrationen und SUC-Zugabe. Der Wechsel der Messlösungen ausgehend von pH 5,5 über pH 6,5 auf pH 7,5 ist mittels der verschiedenfarbigen Balken angezeigt. Die Zugabe von 100 mM SUC ist durch die schwarzen Balken angegeben. b)  $\Delta C_m$  bei den angegebenen pH-Werten nach Zugabe von 100 mM SUC bei den Haltespannungen -20 mV und -100 mV. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD n=8

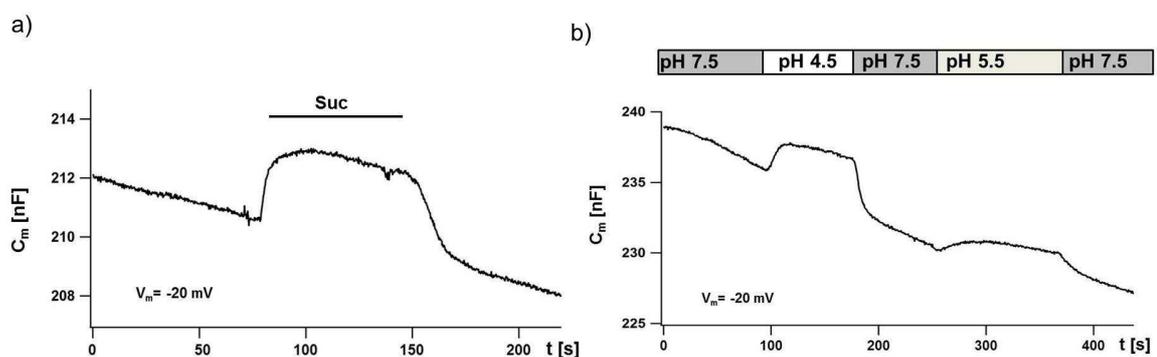
Abbildung 3.21a zeigt die kontinuierlichen Messungen der Kapazität ( $C_m$ ) bei stufenweisen Wechseln zu niedrigeren  $H^+$ -Konzentrationen bei einer Spannung von -20 mV. Ausgehend von pH 5,5 wurden Wechsel der pH-Werte über pH 6,5 auf pH 7,5 mit zusätzlicher SUC-Zugabe durchgeführt. Die Zugabe von SUC führte bei jedem pH-Wert zu einem reversiblen Absinken der  $C_m$ . Parallel dazu wurden die Transporter-vermittelten  $I_{ss}$  aufgezeichnet. Deutlich zu erkennen sind die großen SUC-induzierten  $I_{ss}$  von ZmSUT1 im  $\mu$ A-Bereich bei pH 5,5, die mit sinkender  $H^+$ -Konzentration auf pH 6,5 schon deutlich abnehmen und bei pH 7,5 nicht mehr detektiert werden konnten. Die SUC-induzierten Änderungen der Membrankapazität ( $\Delta C_m$ ) von ZmSUT1 (Abbildung 3.21b) zeigten sich abhängig von der umgebenden  $H^+$ -Konzentration sowie der angelegten Haltespannung. Die Intensität des Absinkens der  $C_m$  in Anwesenheit von SUC stieg für ZmSUT1 mit der umgebenden  $H^+$ -Konzentration kontinuierlich an. Die gemessenen Werte von  $\Delta C_m$  waren bei einer Haltespannung von -100 mV stets höher als bei -20 mV.

### 3.2.2 Transporteigenschaften der generierten Mutanten

Aufgrund der elektrophysiologischen Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten konnten die Mutanten eingeteilt werden in: 1) nicht-elektrogene Mutanten, 2) Wildtyp-ähnliche Mutanten und 3) Mutanten mit verminderter Affinität gegenüber SUC.

#### 3.2.2.1 nicht-elektrogene Mutanten

Die Mutanten W51A und D161A stellten sich als nicht-elektrogen heraus, da keine SUC-induzierten Ströme gemessen werden konnten. Es wurde ein völliger Verlust der SUC-Transportaktivität bei allen gemessenen pH-Werten festgestellt. Aus diesem Grund konnten keine Bestimmungen der Substratabhängigkeit, der Substrataffinität, der pH-Abhängigkeit, sowie der Substratspezifität durchgeführt werden. Während der WT bei Applikation von SUC bzw. der Veränderung der extrazellulären  $H^+$ -Konzentration mit einer Veränderung der  $C_m$  reagierte, war die Mutante D161A völlig insensitiv (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnten für die Mutante W51A  $\Delta C_m$  gemessen werden, lediglich die absoluten Werte der  $\Delta C_m$  waren bei W51A stets niedriger als beim WT (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22:  $\Delta C_m$  von W51A bei SUC-Zugabe und verschiedenen pH-Werten**

Die Änderungen der Kapazität ZmSUT1 W51A-injizierter Oozyten wurde bei -20 mV und pH 5,5 aufgezeichnet. a) Messung mit Zugabe von 100 mM SUC. b) Messung in Abwesenheit von SUC. Der Wechsel der  $H^+$ -Konzentrationen ist durch die verschiedenfarbigen Balken angezeigt.

## Ergebnisse

Die kontinuierlichen Messungen der  $C_m$  von W51A bei einer Haltespannung von -20mV ergaben nach Perfusion mit 100 mM SUC-haltiger Lösung einen leichten Anstieg der  $C_m$  (Abbildung 3.22a). In Abbildung 3.22b) sind die zeitlichen Änderungen der  $C_m$ , ausgehend von pH 7,5 beim Wechsel auf pH 5,5, bzw. pH 4,5 als deutliche reversible Anstiege der  $C_m$ -Werte abgebildet. Dieses Verhalten ist vergleichbar mit dem des WT aus Abbildung 3.20a. Die Mutante W51A reagierte mit  $\Delta C_m$  somit sensitiv auf SUC und die externe  $H^+$ -Konzentration. Die  $\Delta C_m$ -Analysen stellten sicher, dass das Protein exprimiert wurde und zeigten, dass ZmSUT1 W51A weiterhin in der Lage ist  $H^+$  zu binden während sie scheinbar in ihrer Fähigkeit SUC zu binden und zu transportieren gestört war. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Mutanten W51A und D161A mit den Werten des WT in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

	Strom	SUC-induz. $C_m$ - Änderung	$C_m$ -Änderung bei pH-Wechsel	$K_m$ -Wert (-100 mV)
ZmSUT1 WT	+	+	+	7,2 mM
W51A	-	vorhanden	vorhanden	-
D161A	-	-	-	-

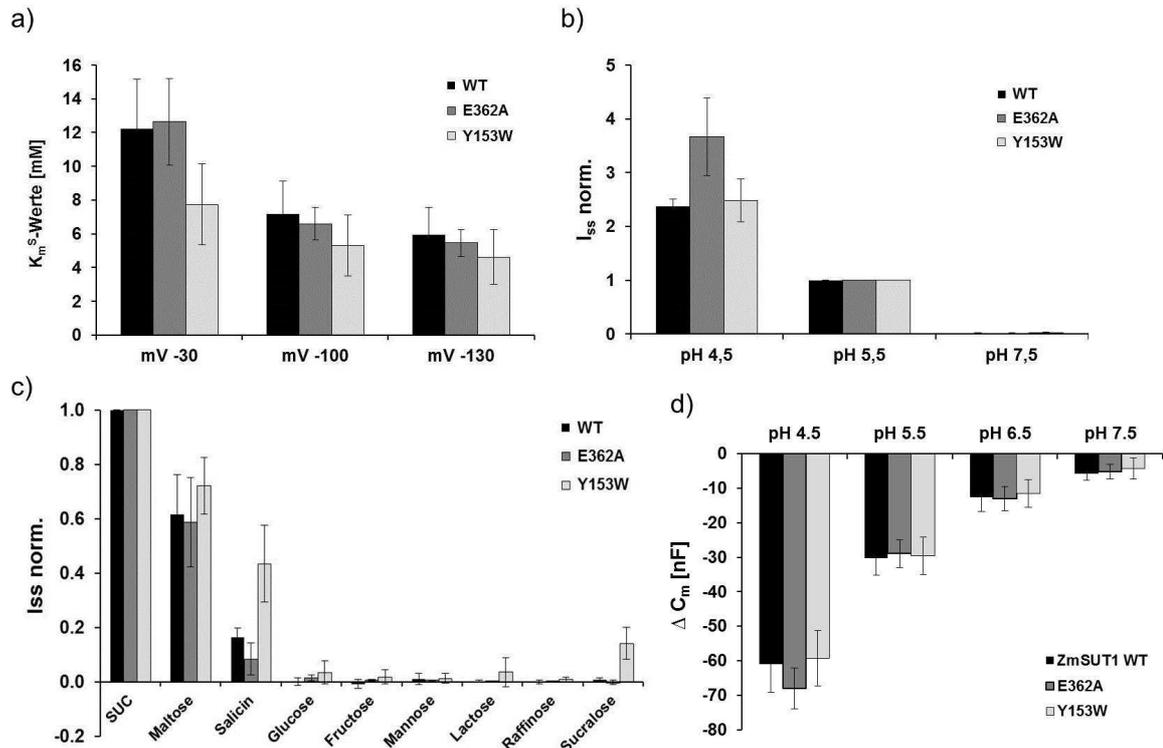
**Tabelle 3.3: Übersicht der Ergebnisse der Mutanten W51A, D161A und WT**

### 3.2.2.2 Wildtyp-ähnliche Mutanten

Die Analysen der Mutanten Y153W und E362A ergaben ein Wildtyp-ähnliches Profil der SUC-abhängigen  $I_{ss}$ . Bei den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 50 und 100 mM SUC ergaben sich vergleichbar hohe Protonenströme wie bei ZmSUT1 WT. Ab einer SUC-Konzentration von 50 mM trat keine weitere Erhöhung der  $I_{ss}$  auf, was auf eine sättigende Konzentration ab 50 mM SUC schließen lässt (Daten nicht gezeigt). Die Beschreibung SUC-abhängigen Transportströme mit der Michaelis-Menten Gleichung ergab für die Mutanten WT-ähnliche  $K_m^S$ -Werte bei verschiedenen Spannungen, die mit hyperpolarisierenden Spannungen anstiegen. Die Werte lagen im Bereich der  $K_m^S$ -Werte, die für ZmSUT1 WT bestimmt wurden (Abbildung 3.23a). Die  $H^+$ -abhängigkeit des

## Ergebnisse

Transports wurde über den physiologischen pH- Bereich von 4,5 bis pH 7,5 gemessen (Abbildung 3.23b). Es wurden erhöhte Aktivitäten bei pH 4,5 und ein Verlust der Aktivität bei pH 7,5 detektiert. Hier bewegte sich die pH-Sensitivität der Mutanten Y153W und E362A im Bereich des WT.



**Abbildung 3.23: Vergleichende Analysen von ZmSUT1 WT, E362A und Y153W**

a)  $K_m^S$ -Werte für ZmSUT1 WT (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=12) und die Mutanten E362A (dunkelgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) und Y153W (hellgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) bei den Spannungen -30, -100 und -130 mV bei pH 5,5. b) Differenzströme bei den pH-Werten 4,5, 5,5 und 7,5 in Anwesenheit von 100 mM SUC und einer Haltespannung von -100 mV. Die Ströme wurden auf die Werte in Anwesenheit von 100 mM SUC bei -100 mV und pH 5,5 normalisiert. (ZmSUT1 WT arithmetisches Mittel  $\pm$  SD n=6, E362A arithmetisches Mittel  $\pm$  SD n=7, Y153W arithmetisches Mittel  $\pm$  SD n=7). c) Die Substrat-induzierten Differenzströme wurden bei pH 5,5 und -100 mV gemessenen. Die verschiedenen Zucker lagen jeweils in einer Konzentration von 100 mM vor. Die Ströme vom WT (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) und der Mutanten E362A (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=5) und Y153W (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) wurden auf den Wert von 100 mM SUC normalisiert. d) Die  $\Delta C_m$  bei den pH-Werten 4,5, 5,5, 6,5 und 7,5 wurden nach Zugabe von 100 mM SUC bei einer Spannung von -20 mV ermittelt. ZmSUT1 WT (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=12) und die Mutanten E362A (dunkelgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) und Y153W (hellgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7).

## Ergebnisse

Im Vergleich der Substratspezifität (Abbildung 3.23c) glich das Profil der Mutante E362A vollständig dem des WT mit der höchsten Transportaktivität für SUC, als weiteres transportiertes Substrat Maltose mit etwa 60 % der Aktivität und eine geringe Aktivität beim Transport von Salicin. Für die Mutante Y153W wurde neben den Aktivitäten für SUC und Maltose jedoch eine bemerkenswert hohe Aktivität von 43 % bei Salicin und eine 14 %ige Aktivität des Transports für Sucralose gemessen. Auch in Anwesenheit von Lactose vermittelte ZmSUT1 Y153W messbare Aktivität von bis zu 5 %, im Vergleich zu den Differenzströmen in SUC-haltiger Lösung.

Sowohl das SUC-induzierte Absinken der  $C_m$  bei verschiedenen pH-Werten (Abbildung 3.23d), als auch die Änderungen als Reaktion auf die Wechsel der  $H^+$ -Konzentrationen (Daten nicht gezeigt) konnten für beide Mutanten als WT-ähnlich beschrieben werden.

Die Ergebnisse der Mutanten E362A und Y153W sind mit den Werten des WT in Tabelle 3.4 zusammengefasst und in einer Übersicht dargestellt.

	Strom	$K_m^S$ -Wert (-30 mV)	$K_m^S$ Wert (-100 mV)	$K_m^S$ -Wert (-130 mV)	pH-Profil	Substrat- spezifität	$\Delta C_m$ SUC-induz.	$\Delta C_m$ bei pH- Wechsel
WT	+	12,2 ± 2,9	7,2 ± 1,9	5,9 ± 1,6	+	WT- ähnlich	+	+
E362A	+	12,6 ± 2,6	6,6 ± 0,9	5,5 ± 0,8	leicht verändert	WT- ähnlich	WT- ähnlich	WT- ähnlich
Y153W	+	7,7 ± 2,4	5,3 ± 1,8	4,6 ± 1,6	WT- ähnlich	leicht verändert	WT- ähnlich	WT- ähnlich

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse der Mutanten E362A und Y153W im Vergleich zum WT

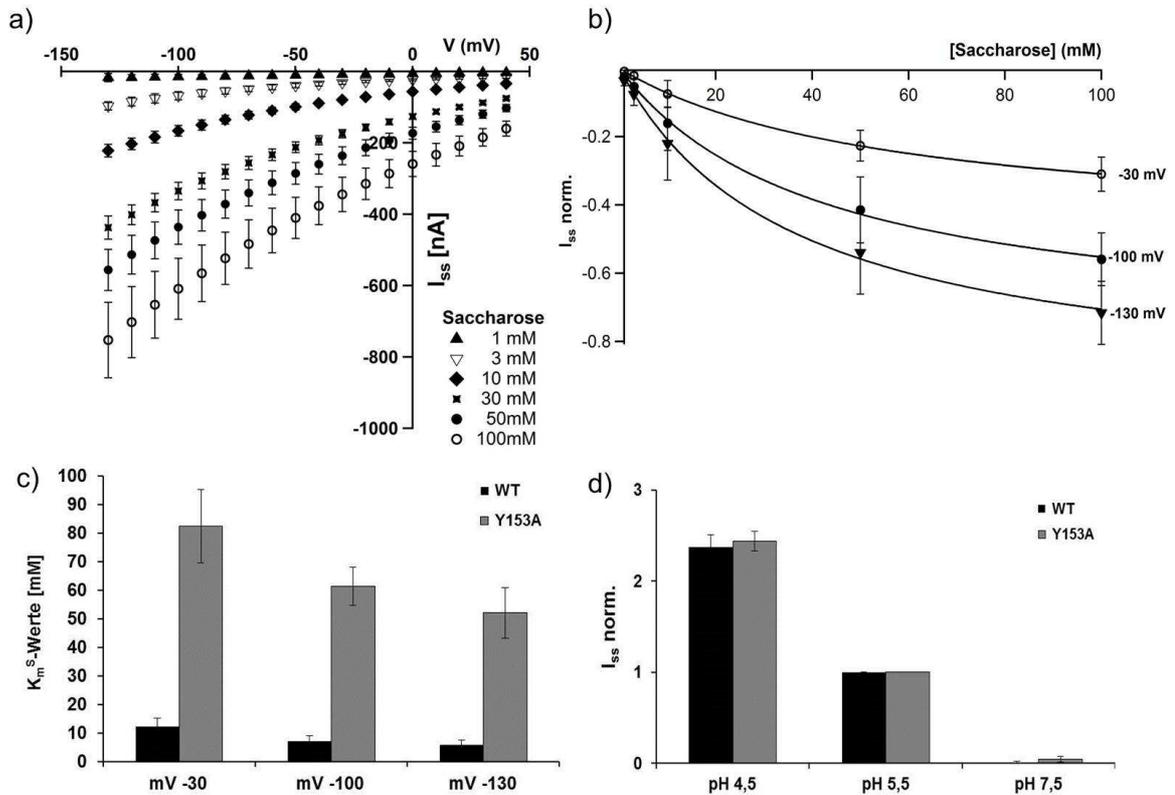
### 3.2.2.3 Mutanten mit verminderter Affinität gegenüber SUC

#### 3.2.2.3.1 Die Mutante Y153A

Die Differenzströme der Mutante Y153A bewegten sich ausschließlich im nA-Bereich. Im Gegensatz zum WT waren die SUC-induzierten Ströme bei der Mutante Y153A ab einer SUC-Konzentration von 30 mM nicht in Sättigung (Abbildung 3.24a).

## Ergebnisse

Die Ströme stiegen selbst bei einer SUC-Konzentration von 100 mM weiter an, was auf eine erniedrigte Affinität der Mutante gegenüber SUC hindeutet.



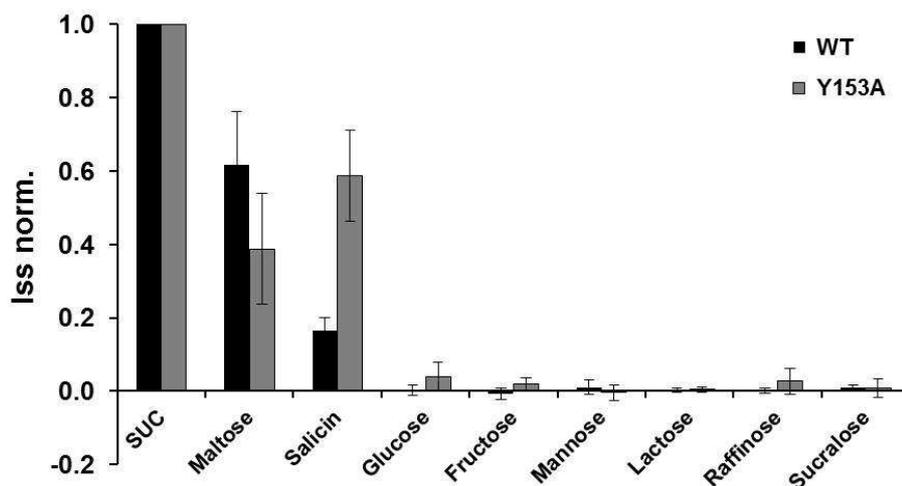
**Abbildung 3.24: Vergleichende Analysen von ZmSUT1 Y153A**

a) Die Substratabhängigkeit der Mutante ZmSUT1 Y153A wurde bei pH 5,5 bestimmt. Dazu wurden die Differenzströme bei den angegebenen SUC-Konzentrationen gegen die Membranspannung aufgetragen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ . b) Für die Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte wurden Y153A-vermittelte Differenzströme gegen die SUC-Konzentration bei den angegebenen Membranpotentialen aufgetragen und mit einer Michaelis-Menten Funktion gefittet (durchgezogene Linie). Normalisiert wurden die Ströme auf  $I_{max}$  bei 100 mM SUC und -130 mV (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ ). c) Die bei pH 5,5 errechneten  $K_m^S$ -Werte für ZmSUT1 WT (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=12$ ) und die Mutante Y153A (dunkelgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ ) wurden bei den Spannungen -30, -100 und -130 mV verglichen. d) Aufgetragen sind die Differenzströme bei den pH-Werten 4,5, 5,5 und 7,5 in Anwesenheit von 100 mM SUC und einer Haltespannung von -100 mV. Die Ströme wurden normalisiert auf die Werte in Anwesenheit von 100 mM SUC bei pH 5,5. (ZmSUT1 WT arithmetisches Mittel  $\pm$  SD  $n=6$ , Y153A arithmetisches Mittel  $\pm$  SD  $n=6$ ).

Für die Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte wurden die Differenzströme bei Membranpotentialen -30, -100 und -130 mV gegen die SUC-Konzentration aufgetragen

## Ergebnisse

(Abbildung 3.24b). Die Kurven wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben und ergaben für die Mutante Y153A  $K_m^S$ -Werte bei -30 mV von  $82,4 \pm 21,8$  mM, bei -100 mV von  $61,3 \pm 9,6$  mM und bei -130 mV von  $52,1 \pm 8,1$  mM SUC. Wie für den WT beschrieben, nahmen die  $K_m^S$ -Werte bei der Mutante Y153A mit Hyperpolarisation der Spannung ab, die absoluten Werte waren jedoch um ein 7- bis 8-faches höher (Abbildung 3.24c). Somit kann man die Mutante Y153A mit einer deutlich niedrigeren Affinität gegenüber SUC einstufen. Abbildung 3.24d zeigt die  $H^+$ -abhängige Transportaktivität der Mutante Y153A, welche nahezu identisch zu ZmSUT1 WT war. Die Substratspezifität in Abbildung 3.25 lässt Abweichungen zum WT erkennen. Die Aktivität des Transports von Maltose sank auf 38 %, dafür stieg die Aktivität des Transports von Salicin auf 59 %.



**Abbildung 3.25: Substratspezifität der Mutante ZmSUT1 Y153A**

Die Substratspezifität wurde anhand der Differenzströme bei -100 mV bei pH 5,5 bestimmt. Die Konzentration der Substrate betrug 100 mM. Die Ströme vom WT (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=7) und der Mutante Y153A (arithmetisches Mittel  $\pm$  SD, n=6) wurden auf den Wert von 100 mM SUC normalisiert.

Y153A zeigte ein WT-ähnliches Verhalten der  $\Delta C_m$  mit einem SUC-induzierten Absinken der  $C_m$ , sowie eine ansteigende  $C_m$  als Reaktion auf die Erhöhung der  $H^+$ -Konzentration (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

	Strom	$K_m^S$ -Wert (-30 mV)	$K_m^S$ Wert (-100 mV)	$K_m^S$ -Wert (-130 mV)	pH-Profil	Substrat- spezifität	$\Delta C_m$ SUC- induz.	$\Delta C_m$ bei pH- Wechsel
WT	+	12,2 ± 2,9	7,2 ± 1,9	5,9 ± 1,6	WT- ähnlich	WT-ähnlich	+	+
Y153A	+	82,4 ± 21,8	61,3 ± 9,6	52,1 ± 8,1	WT- ähnlich	leicht verändert	WT- ähnlich	WT- ähnlich

Tabelle 3.5: Übersicht über die Charakterisierung der Mutante Y153A

### 3.2.2.3.2 Analyse weiterer Mutanten mit verminderter SUC-Affinität

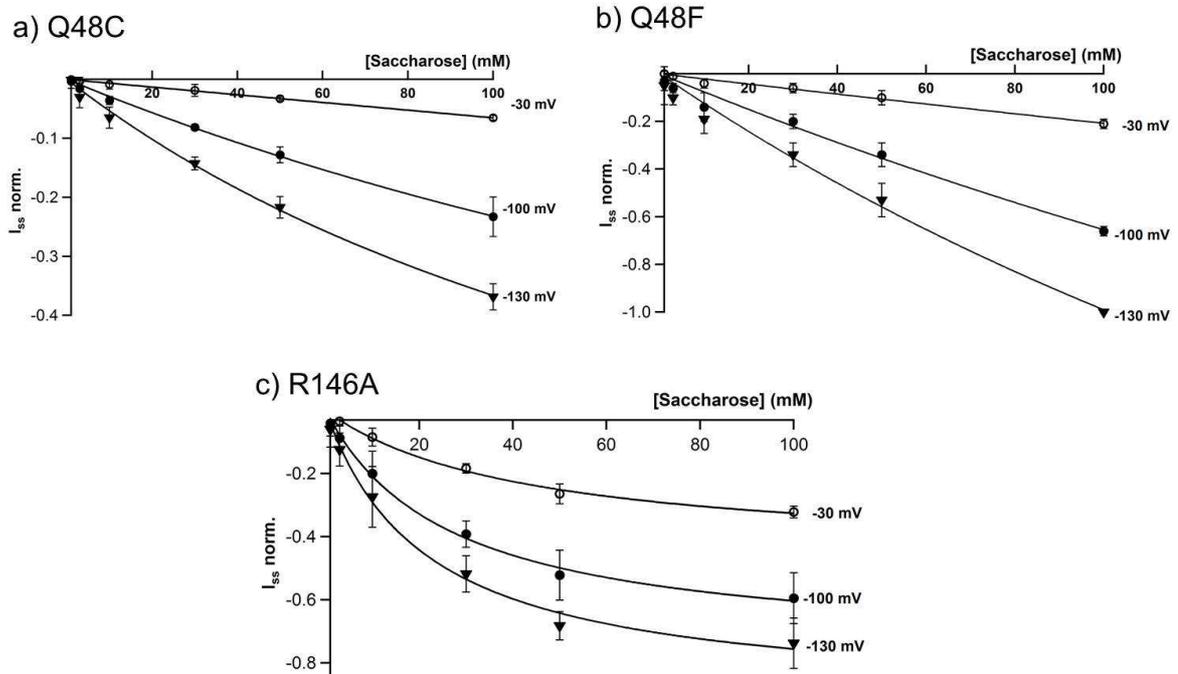


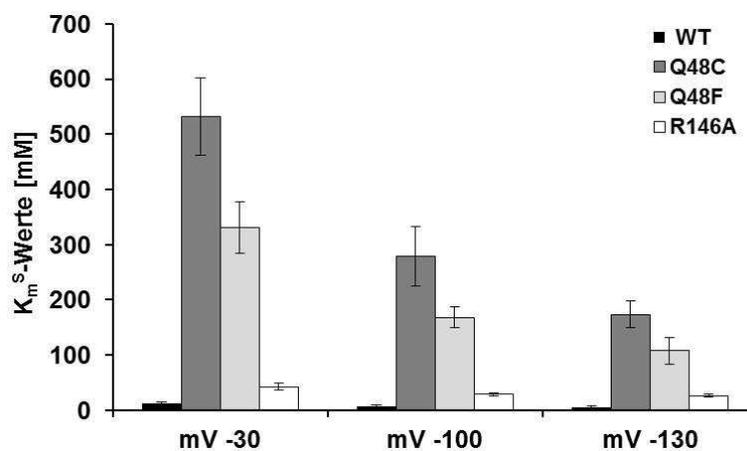
Abbildung 3.26: Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte der Mutanten Q48C, Q48F und R146A

Um die  $K_m^S$ -Werte der angezeigten Spannungen bestimmen zu können, wurden die Differenzströme der Mutanten Q48C, Q48F und R146A bei pH 5.5 gegen die SUC-Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 50 und 100 mM aufgetragen. Anschließend wurde ein Fit mit der Michaelis-Menten Funktion durchgeführt (durchgezogene Linie). Normalisiert wurden die Ströme auf  $I_{max}$  bei 100 mM SUC und -130 mV. a) Ströme von Q48C, arithmetisches Mittel ± SD n=6. b) Ströme von Q48F, arithmetisches Mittel ± SD n=6. c) Ströme von R146A, arithmetisches Mittel ± SD n=7.

Die Messungen zur Substratabhängigkeit ergaben für die Mutanten Q48C, Q48F und R146A SUC-induzierte  $I_{ss}$ , die vergleichbar mit denen der Mutante Y153A waren.

## Ergebnisse

Die Höhe der Ströme erreichte selten den  $\mu\text{A}$ -Bereich und blieb deshalb weitaus niedriger, als die Stromantworten des WT. Das Auftragen der Differenzströme gegen die SUC-Konzentration (Abbildung 3.26) lässt erkennen, dass im getesteten Bereich der SUC-Konzentrationen bis 100 mM keine Sättigung der Transportaktivität erreicht wurde. Für die Bestimmung der  $K_m^S$ -Werte wurden die Differenzströme der Haltespannungen bei -30, -100 und -130 mV gegen die SUC-Konzentration aufgetragen und anschließend mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben. Die Ergebnisse dieser  $K_m^S$ -Analysen lieferten für die Mutanten deutlich höhere  $K_m^S$ -Werte als für den WT (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27:**  $K_m^S$ -Werte von ZmSUT1 WT und Q48C, Q48F und R146A

a) Vergleich der  $K_m^S$ -Werte für ZmSUT1 WT (schwarz; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=12$ ) und die Mutanten Q48C (dunkelgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ ) und Q48F (hellgrau; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ ) und R146A (weiß; arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=7$ ) bei den Spannungen -30, -100 und -130 mV bei pH 5,5.

Im Vergleich zum WT, konnte bei -100 mV für R146A ein 4-fach höherer  $K_m^S$ -Wert ( $28,6 \pm 2,3$  mM) ermittelt werden: Bei den Mutanten Q48C und Q48F war der  $K_m^S$ -Wert noch deutlicher erhöht (Q48F  $168,2 \pm 18,3$  mM und Q48C  $278,4 \pm 53,7$  mM SUC). Diese starke Erhöhung der  $K_m^S$ -Werte könnte die relativ schwachen Stromantworten bei einer extrazellulären SUC-Konzentration von 100 mM erklären.

## Ergebnisse

	Strom	$K_m^S$ -Wert (-30 mV)	$K_m^S$ Wert (-100 mV)	$K_m^S$ -Wert (-130 mV)	$\Delta C_m$ SUC-induz.
WT	+	12,2 ± 2,9	7,2 ± 1,9	5,9 ± 1,6	+
Q48C	+	532,5 ± 70,1	278,4 ± 53,7	173,7 ± 24,2	WT-ähnlich
Q48F	+	330,2 ± 46,7	168,2 ± 18,3	107,8 ± 23,5	WT-ähnlich
R146A	+	42,6 ± 5,7	28,6 ± 2,3	26,4 ± 2,3	WT-ähnlich

**Tabelle 3.6: Übersicht der Ergebnisse der Mutanten Q48C/F, R146A und WT**

Für die elektrophysiologischen Analysen der Mutanten wurden AS ausgewählt, die sich zu den bereits in LacY und CsCb identifizierten AS der Substratbindestelle in homologen Positionen befinden. Die Analyse der Mutanten hat ergeben, dass vier der fünf AS in den ausgewählten Positionen die Transportaktivität des Proteins maßgeblich beeinflussen.

Für die Mutante E362A, die auf der Transmembrane VIII und damit auf der C-terminalen Hälfte des Proteins liegt, konnte lediglich ein WT-ähnliches Verhalten beobachtet werden. Veränderungen der AS in den vier anderen Positionen (Q48, W51, R146 und Y153) führten zu einer Erhöhung der  $K_m$ -Werte und damit zu einer niedrigeren Affinität gegenüber SUC sowie zum Teil zu leichten Veränderungen der Substratspezifitäten.

### 3.3 Posttranslationale Regulationsmechanismen

#### 3.3.1 Einfluss von Sucralose auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1

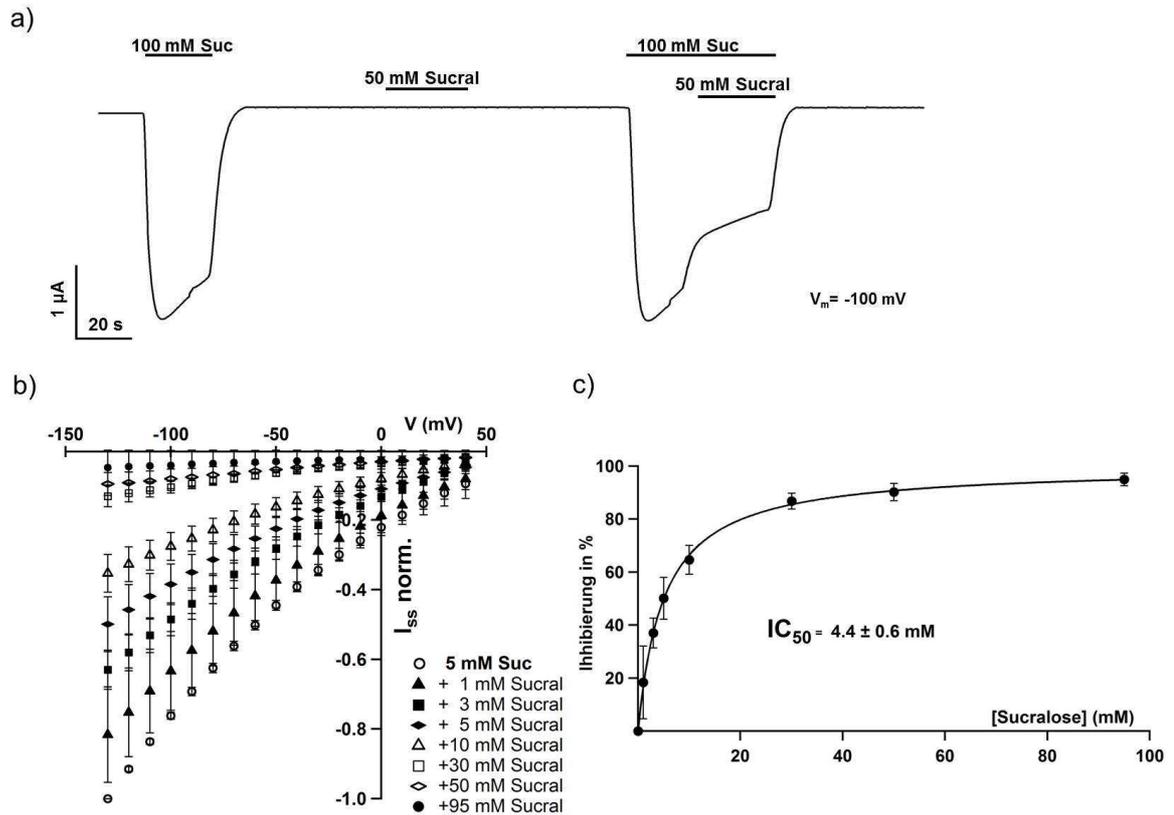
Sucralose ist eine chlororganische Verbindung (4,1,6-trichloro-4,1,6-trideoxygalactosaccharose), die durch Chlorierung von SUC als Süßstoff (ohne kalorischen Nährwert für Menschen) industriell hergestellt wird. Somit besteht eine große Ähnlichkeit der molekularen Struktur von Sucralose und SUC. Reinders et al. konnten 2012 für StSUT1(Typ I SUC-Transporter) den Transport von Sucralose belegen (Reinders et al., 2012). Die Typ I SUT's, die ausschließlich in der Plasmamembran des Phloems in Eudikotyledonen vorhanden sind, verfügen über eine breite Substratspezifität. Diese

zeigt sich neben dem Transport von SUC und Maltose im Transport einer Vielzahl pflanzlicher  $\beta$ -Glykoside, einschließlich Esculin und Salicin sowie Sucralose (Chandran et al., 2003; Sivitz et al., 2007; Reinders et al., 2012).

Die Typ II Transporter aus Monokotyledonen dagegen weisen eine eingeschränkte Substratspezifität auf, indem sie selektiv für SUC, Maltose, Salicin und synthetische  $\alpha$ -Phenylglykoside sind (Sivitz et al., 2005; Reinders et al., 2006). Sucralose gehört somit nicht zu den Substraten der Typ II SUT's (Reinders et al., 2006; Sun et al., 2010). Passend dazu konnte mit den in dieser Arbeit angefertigten Messungen zur Substratspezifität für ZmSUT1 (Typ II SUT) gezeigt werden, dass Sucralose nicht zu den von ZmSUT1 transportierten Substraten gehört (Abbildung 3.13a und Abbildung 3.14). Es wurde sogar ein inhibierender Effekt von Sucralose auf den SUC-Transporter ShSUT1 beschrieben (Reinders et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte der inhibierende Effekt von Sucralose auf die Transportaktivität von ZmSUT1 untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Single-Puls Messungen bei konstanter Membranspannung von -100 mV durchgeführt. Dabei wurden ZmSUT1-vermittelte  $I_{ss}$  in Höhe von 2.3  $\mu$ A nach 100 mM SUC-Zugabe detektiert. Wie bereits getestet, führte die Zugabe von 50 mM Sucralose zu keiner makroskopischen Stromantwort (Abbildung 3.28a). Die Zugabe von 50 mM Sucralose bei gleichzeitiger Applikation von 100 mM SUC minderte die gemessene SUC-induzierte Transportaktivität allerdings um 50 %. Um den inhibierenden Effekt auf die Transportaktivität genauer bestimmen zu können, wurden Messungen mit verschiedenen Sucralosekonzentrationen durchgeführt. Im Hintergrund einer konstanten SUC-Konzentration von 5 mM wurde den Messlösungen Sucralose in den Konzentrationen 1, 3, 5, 10, 30, 50 und 95 mM zugesetzt. In Abwesenheit von Sucralose (5 mM SUC) sowie in Anwesenheit der verschiedenen Sucralosekonzentrationen wurden Einzelspannungspuls-Protokolle appliziert. Das Auftragen der Differenzströme gegen das Membranpotential (Abbildung 3.28b) resultierte in abnehmenden Transportströmen mit steigenden Sucralosekonzentrationen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.28: Inhibition des SUC-Transports von ZmSUT1 durch Sucralose**

a) Abgebildet ist der zeitliche Verlauf ZmSUT1-vermittelter  $I_{ss}$  bei einer Haltespannung von -100 mV. Dabei ist die Zugabe von SUC bzw. einer SUC/Sucralose-Kombination durch schwarze Balken angezeigt. Zwischen der Applikation von SUC/Sucralose wurde mit Zucker-freier Lösung gespült b) Strom-Spannungskennlinien der Differenzströme von ZmSUT1. Im Hintergrund von 5 mM SUC wurde Sucralose in den angegebenen Konzentrationen zugefügt. Die Ströme wurden auf den Wert von 5 mM SUC bei -130 mV normalisiert. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD, n=6. c) Dosis-Wirkungs-Beziehung der  $I_{ss}$  in Abhängigkeit von Sucralose. Aufgetragen ist die Inhibition in Prozent als Funktion der Sucralosekonzentration bei -100 mV. Die Daten wurden mit der Michaelis-Menten Gleichung gefittet (durchgezogene Linie). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD, n=6.

Die Daten aus Abbildung 3.28b lieferten die Grundlage zur Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes für Sucralose. Dieser Wert bestimmt die halbmaximale Inhibition der SUC-Aufnahme und beträgt nach den Berechnungen mit einer Michaelis-Menten Gleichung für ZmSUT1 bei -100 mV und 5 mM SUC  $4,4 \pm 0,6$  mM Sucralose (Abbildung 3.28).

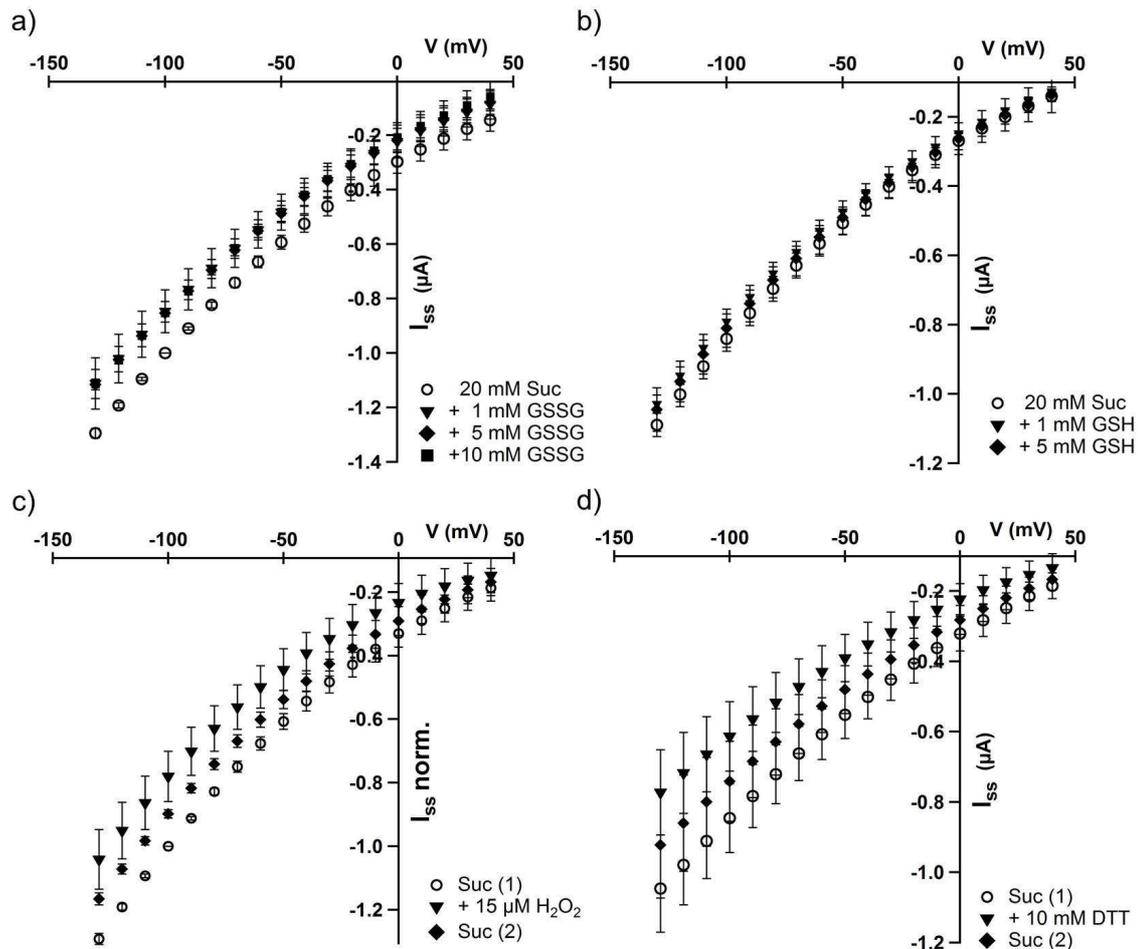
### 3.3.2 Einfluss von Redox-Reagenzien auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1

In frühen Arbeiten wurde bereits der Einfluss Redox-aktiver Reagenzien auf die biophysikalischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen untersucht. Nach Behandlung mit Substanzen, die den Redox-Status eines Proteins verändern können, indem sie Modifikationen an Sulfhydryl- und Thiolgruppen hervorrufen, wie z.B. pCMBS, NEM, DTE, konnte ein Einfluss auf die Aktivität der SUC-Aufnahme in Blattscheiben, Plasmamembranvesikeln und Hefen nachgewiesen werden (Lichtner et al., 1981; M'Batchi & Delrot, 1984; Bourquin et al., 1990). Nicht nur ein Effekt des Redox-Status auf die spezifische Aktivität, auch auf das Vorliegen eines Proteins als Mono- oder Dimer und sein exaktes Erreichen des Zielortes seiner Funktion (*targeting*) werden diskutiert (Veenhoff et al., 2002).

Weitere Ergebnisse über den Einfluss verschiedener Redox-Reagenzien wie Glutathion, L-Cystin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Aktivität pflanzlicher SUC-Transporter am Beispiel von StSUT1 und ZmSUT1 wurden bekannt (Krugel et al., 2008). Jedoch wurden diese Ergebnisse aufgrund technischer Fehler bei der Herstellung von Messlösungen zurückgezogen bzw. relativiert.

Um herauszufinden, ob und in wie weit die Transportaktivität von ZmSUT1 einer Redox-abhängigen Regulation unterliegt, wurde den Messlösungen Glutathion beigefügt, welches in zwei verschiedenen Redox-Zuständen vorliegen kann. GSSG, die oxidierte Form des Glutathions (Oxidationsmittel), liegt als Dimer vor und wurde in den Konzentrationen 1, 5 und 10 mM eingesetzt. Die reduzierte Form ist GSH (Reduktionsmittel) und wurde in den Konzentrationen 1 mM und 5 mM beigefügt. Des Weiteren wurden 0,015 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,05 %ige Lösung) als Oxidationsmittel und 10 mM DTT als Reduktionsmittel eingesetzt. Um sekundär Effekte durch unterschiedliche Protonenkonzentrationen nach der Zugabe der Redox-Substanzen auszuschließen, wurde der pH-Wert vor jeder Messung kontrolliert und bei Bedarf wieder auf 5,5 eingestellt. Im Hintergrund von 20 mM SUC wurden ZmSUT1-injizierte Oozyten den Messlösungen mit verschiedenen Glutathionkonzentrationen,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder DTT ausgesetzt und Einzelspannungspuls-Protokolle angelegt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.29: Einfluss Redox-aktiver Reagenzien auf die ZmSUT1-Transportaktivität**

Abgebildet sind Strom-Spannungskennlinien der Differenzströme ZmSUT1-vermittelter  $I_{ss}$  bei pH 5.5 im Hintergrund von 20 mM SUC und Zugabe von Redox-aktiven Substanzen. Die Ströme wurden normalisiert auf den Wert von 20 mM SUC bei -100 mV. a) Ströme bei Zugabe von 1, 5 und 10 mM oxidiertem Glutathion (GSSG); arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=6$ . b) Ströme bei Zugabe von 1 und 5 mM reduziertem Glutathion (GSH); arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=3$ . c) SUC-induzierte Ströme vorher (Suc(1)), in Anwesenheit von 15  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und SUC-induzierte Ströme nachher (Suc(2)); arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=4$ . d) SUC-induzierte Ströme vorher (Suc(1)), in Anwesenheit von 10 mM DTT und nachher (Suc(2)); arithmetisches Mittel  $\pm$  SD,  $n=10$ . (modifiziert nach Wippel et al. 2010).

Das Auftragen der berechneten Differenzströme gegen die Spannung resultierte in minimal geringeren Transportströmen in Anwesenheit der Redox-aktiven Substanzen, unabhängig, ob es sich um eine reduzierende oder oxidierende Substanz handelte (Abbildung 3.29a, c, d). Nur bei der Applikation von GSH in unterschiedlichen

## Ergebnisse

---

Konzentrationen war keine Veränderung der ZmSUT1 Aktivität im Vergleich zur Anwesenheit von nur 20 mM SUC (Abbildung 3.29b) erkennbar. Diese Ergebnisse stimmen mit Aufnahmeexperimenten mit StSUT1 im Expressionssystem der Hefen unter ähnlichen Bedingungen überein (Wippel et al., 2010). Aufgrund der schwachen Effekte auf die Transportaktivität von ZmSUT1 und der hohen Konzentrationen an getesteten Redox-aktiven Substanzen sollte diese Redox-Regulation keine physiologische Bedeutung für den Zuckertransport in der Pflanze besitzen.

### 4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die elektrophysiologischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Transporteigenschaften von ZmSUT1, die zur Aufklärung der Struktur und Funktion des Proteins beitragen. Dieser SUC/H<sup>+</sup>-Symporter aus *Zea mays* generiert außergewöhnlich hohe SUC-induzierte Protonenströme von bis zu 4  $\mu$ A (Carpaneto et al., 2005). Diese Voraussetzungen machen ZmSUT1 zu einem Modelltransporter für Struktur-Funktionsuntersuchungen an pflanzlichen SUC/H<sup>+</sup>-Symportern.

Parallel dazu wurde eine Basischarakterisierung von UmSrt1, einem SUC/H<sup>+</sup>-Symporter aus dem biotrophen Basidiomyceten *Ustilago maydis* (AG Sauer, Universität Erlangen) angefertigt. Unter Betrachtung des Pathosystems *Ustilago maydis/Zea mays*, nimmt der ebenfalls plasmamembranständige SUC-/H<sup>+</sup>-Symporter UmSrt1 die Position eines direkten Gegenspielers von ZmSUT1 ein. Beide Proteine konkurrieren um SUC, die sich im extrazellulären Raum des Apoplasten befindet (Wahl et al., 2010).

#### 4.1 Vergleichende Analysen von ZmSUT1 und UmSrt1

Kleine ungeladene Moleküle (<75 Da) können ungehindert durch Biomembranen diffundieren, während größere Moleküle (>75 Da) mit Hilfe integraler Membranproteine transloziert werden müssen. Hierbei generieren die unterschiedliche Teilchenkonzentration ( $\ln c_i^{II}/c_i^I$ ) und der Ladungsunterschied ( $F \cdot z_i \cdot E_i^{II} - E_i^I$ ) in den Kompartimenten das daraus resultierende elektrochemische Potenzial ( $\Delta \mu_i$ ) und stellen damit die Triebkräfte des Stofftransports dar (siehe Kap.2.5.7).

Elektrochemisches Potenzial

$$\Delta \mu_i = R \cdot T \cdot \ln \frac{c_i^{II}}{c_i^I} + F \cdot z_i \cdot (E_i^{II} - E_i^I)$$

R = Gaskonstante, T = Temperatur, F = Faraday-Konstante, z = Ladungszahl

Dissertation A. Wittek 2013

## Diskussion

---

Die Intensität und die Transportrichtung des SUC/H<sup>+</sup>-Symports wird vom elektrochemischen Potenzial ( $\Delta \mu_i$ ) der Protonen (protonenmotorische Kraft) aber auch vom SUC-Gradienten über der Plasmamembran bestimmt. Die Gradienten beider Substrate, einerseits SUC und andererseits Protonen (H<sup>+</sup>), schlagen sich also auf das chemische Potential nieder, welches in der Gleichung zur Berechnung des elektrochemischen Potentials als unterschiedliche Teilchenkonzentration ( $\ln c_i^{\text{II}}/c_i^{\text{I}}$ ) beschrieben wird. Der Ladungsunterschied ( $E_i^{\text{II}}-E_i^{\text{I}}$ ), also das elektrische Potential, wird maßgeblich durch den ständigen Rücktransport der H<sup>+</sup> durch die ATP-asen in den Apoplasten aufrechterhalten und bestimmt das Membranpotential. Angesichts dieser verschiedenen Triebkräfte ist es wichtig die Substrat-, pH- und Spannungsabhängigkeit der Transporter genau zu untersuchen, um abschätzen zu können, welcher der beiden konkurrierenden Transporter den Kampf um die Kohlenhydratressourcen für sich entscheiden kann.

Oftmals werden Transportproteine in unterschiedlichen Expressionssystemen charakterisiert. UmSrt1 z.B. wurde bereits im Expressionssystem der Hefen untersucht, während ZmSUT1 im Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten charakterisiert wurde (Carpaneto et al., 2005; Wippel et al., 2010). Diese Tatsache erschwert die Vergleichbarkeit der erhaltenen Transportcharakteristika der einzelnen Transporter, da sich die Rahmenbedingungen und Voraussetzungen je nach gewähltem heterologen Expressionssystem stark unterscheiden.

So ist bei Aufnahmeversuchen mit Transportern, die in der Hefe untersucht werden, keine Kontrolle der Membranspannung gewährleistet. Beispielsweise führt bei SUC-Transporter-exprimierenden Hefen die Applikation von SUC zur gleichzeitigen Aufnahme von SUC und H<sup>+</sup>. Die H<sup>+</sup>-Aufnahme hat aber gleichzeitig zur Folge, dass das Membranpotential stark depolarisiert. Das beeinflusst wiederum die Transportkapazität und die Substrataffinität des Transporters. Aufnahmeexperimente ohne die Kontrolle des Membranpotentials sind also nur bedingt zur Quantifizierung von Transportprozessen geeignet. Ebenso kritisch sind die Selektivitätsanalysen mit der Hilfe von Wettbewerbsversuchen zu sehen – sie lassen keine Aussage zu, ob das kompetitierende Substrat transportiert wird oder ob es nur den Transport des

Hauptsubstrats inhibiert, aber selbst nicht transportiert wird. Elektrophysiologische Experimente mit elektrogenen Transportern, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden, laufen unter kontrollierten Membranspannungen ab. Zudem umgeht man durch die Messung der Substrat-induzierten  $H^+$ -Ströme Wettbewerbsversuche und kann die Selektivität des Transporters durch die Applikation der einzelnen Substrate und die damit verbundenen Transportströme bestimmen.

Ein heterologes Expressionssystem, das durch elektrophysiologische Techniken zugänglich ist und die Möglichkeit einer Spannungskontrolle bietet, ist besonders im Hinblick auf die Untersuchung der spannungsabhängigen Aktivität und Affinität zu bevorzugen.

Angesichts dieser Tatsache, wurden die elektrophysiologischen Messungen mit der DEVC-Methode mit ZmSUT1 und UmSrt1 unter gleichen Bedingungen durchgeführt, um eine vollständige Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Funktionelle Expressionsstudien mono- und dicotyler SUC-Transportproteine in Oozyten ergaben SUC-induzierte Transportströme ( $I_{ss}$ ) im nA-Bereich (<500 nA), z.B. bei AtSUC2 und AtSUC9, OsSUT1 und OsSUT5, ShSUT1 und LjSUT4 (Chandran et al., 2003; Reinders et al., 2006; Reinders et al., 2008; Sun et al., 2010). Für ZmSUT1 konnte bereits eine funktionelle Expression in der Plasmamembran von Oozyten mit vergleichsweise sehr hohen SUC-induzierten Strömen gezeigt werden (Carpaneto et al., 2005; Carpaneto et al., 2010). Für UmSrt1 lagen lediglich Daten aus dem Expressionssystem der Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) vor (Wahl et al., 2010; Wippel et al., 2010).

Zur Überprüfung der funktionellen Expression der Transportproteine ZmSUT1 und UmSrt1 wurden im Rahmen dieser Arbeit DEVC Messungen durchgeführt, die durchschnittliche SUC-induzierte Transportströme von >2  $\mu A$  für ZmSUT1 und 100 nA für UmSrt1 bei einer Membranspannung von -100 mV erbrachten (Abbildung 3.2d). Der Grund für diese starken Unterschiede in der Stromamplitude bleibt jedoch ungeklärt.

Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Transportaktivität von ZmSUT1 und UmSrt1 zeigten, dass die Aktivität beider Transporter mit hyperpolarisierenden Spannungen zunahm (Abbildung 3.3).

Während die Aktivität von ZmSUT1 mit zunehmend hyperpolarisierenden Spannungen linear zunahm, zeigte sich für UmSrt1 eine nicht-lineare, hyperbolische Aktivitätssteigerung. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieses ungewöhnliche Verhalten UmSrt1-exprimierender Oozyten der schwachen Stromantwort geschuldet ist und nicht dem tatsächlichen Strom/Spannungsverlauf entspricht. Bereits geringe spannungsabhängige Veränderungen Oozyten-endogener Kanäle und/oder Transporter könnten bei der Berechnung der Differenzströme die Spannungsabhängigkeit der Transportströme beeinflussen.

### 4.1.1 Untersuchungen zur Substratabhängigkeit

Der pilzliche SUC-Transporter UmSrt1 wurde bereits anhand radioaktiver [ $^{14}\text{C}$ ]-SUC-Aufnahmeexperimente in Hefe als hochaffiner SUC-Transporter mit einem  $K_m^S$ -Wert von 26  $\mu\text{M}$  bei pH 5,0 beschrieben (Wahl et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der hochaffine Charakter von UmSrt1 bestätigt werden (Tabelle 3.1). Der  $K_m^S$ -Wert für UmSrt1 im Oozytensystem bei pH 5,5 und -100 mV lag bei 90  $\mu\text{M}$  und damit um ein 3-faches höher als in der Hefe. Diese Varianz kann sehr gut über die fehlende Spannungskontrolle im Hefesystem im Vergleich zum Oozytensystem erklärt werden. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen  $K_m$ -Werten, die in Hefe oder in Oozyten erfasst wurden, konnte bei ShSUT1 (Rae et al., 2005; Reinders et al., 2006) und AtSUC2 (Sauer & Stolz, 1994; Chandran et al., 2003) festgestellt werden. Interessanterweise ergaben Bestimmungen von  $K_m$ -Werten im Hefesystem stets höhere Substrataffinitäten als im heterologen Expressionssystem der Oozyten.

Der Gradient der Protonen ( $\text{H}^+$ ) über der Plasmamembran pflanzlicher Zellen bildet unter physiologischen Bedingungen die wichtigste Triebkraft für den sekundär aktiven SUC/ $\text{H}^+$ -Symport. Die enge Kopplung des SUC- und  $\text{H}^+$ -Transports ermöglichen dabei die starke Akkumulation von SUC im Phloem. Das bedeutet, neben SUC müssen auch  $\text{H}^+$  „als Substrat“ an den SUC-Transporter binden. Deshalb wurde auch die Affinität der beiden

Transporter gegenüber  $H^+$  bestimmt (Abbildung 3.12). Auch hier weist UmSrt1 eine deutlich höhere Affinität als ZmSUT1 auf.

Für UmSrt1 wurde bereits eine pH-abhängige Transportaktivität mit einem Optimum im sauren Bereich bei pH 5 bis 5,5 in Hefen ermittelt (Wahl et al., 2010; Wippel et al., 2010). Die erhobenen Daten zur pH-Abhängigkeit im Rahmen dieser Arbeit decken sich mit den Analysen von Wahl et al. und Wippel et al. (Abbildung 3.11). Das Optimum der gemessenen Transportaktivität von UmSrt1 lag ebenfalls bei pH 5,5, die Aktivität blieb aber über den gesamten Bereich von pH 3,5 bis 8,5 erhalten. Dieses Verhalten bildet für UmSrt1 eine relativ  $H^+$ -unabhängige Transportaktivität ab, während die Aktivität von ZmSUT1 dagegen stark  $H^+$ -abhängig und auf den sauren Bereich verlagert ist

Die weitest gehende pH-Unabhängigkeit des SUC-Transports von UmSrt1 spiegelt sich auch in der schwachen pH-Abhängigkeit der  $K_m^S$ -Werte wieder (Tabelle 3.1). Während der  $K_m^S$ -Wert für UmSrt1 bei pH 6,5 und -100 mV bei 130  $\mu$ M lag und damit nicht einmal doppelt so hoch wie bei pH 5,5 liegt, ergab sich bei ZmSUT1 eine drastischere Erhöhung des pH-abhängigen  $K_m^S$ -Wertes. Der  $K_m^S$ -Wert von ZmSUT1 bei pH 6,5 und -100 mV lag bei 25 mM und ist damit um ein 3,5-faches höher als bei pH 5,5.

Bedenkt man die physiologischen Hintergründe, hängt der gesamte Lebenszyklus von *Ustilago maydis* von einem schnellen Import an Kohlenstoffverbindungen für sein eigenes Wachstum ab. Der UmSrt1-vermittelte Kohlenstoffimport beginnt jedoch erst etwa 4-8 Tage nach einer erfolgreichen Infektion der Wirtspflanze mit einem maximalen Expressionsniveau von UmSrt1 (Wahl et al., 2010). Mit Ausbildung einer Interaktionszone zwischen Pilz/Pflanze übernimmt UmSrt1 den Import von SUC aus dem Apoplasten in den Pilz, während ZmSUT1 den Transport in die Phloemzellen katalysiert. Für den UmSrt1-vermittelten Transport ist keine extrazelluläre Hydrolyse von SUC in Glucose und Fructose von Nöten. Somit umgeht *Ustilago maydis* ein mögliches Signal in der pflanzlichen Pathogenabwehr, da die Bildung extrazellulärer Glucose und damit verbundene Schwankungen der extrazellulären Glucose-Konzentration als Auslöser pflanzlicher Abwehrreaktionen gelten (Herbers et al., 1996b; Ehness et al., 1997; Kocal et al., 2008). *Ustilago maydis* bleibt in diesem Punkt mit direktem SUC-Transport für die

Pflanze „unbemerkt“. Die extrazelluläre SUC-Konzentration im Apoplasten der Blätter wurde mit 2 bis 7 mM in Mais gemessen (Livingston & Henson, 1998; Lohaus et al., 2000), jedoch ist die apoplastische Konzentration direkt in der Interaktionszone zwischen Pflanze und Pilz nicht bekannt. Die hohe Affinität von UmSrt1 verschafft der Aufnahme von SUC in den Pilz einen klaren Vorteil, da der pilzliche Transporter bereits bei einem Bruchteil der von ZmSUT1 benötigten SUC-Konzentration mit höchster Aktivität arbeitet. UmSrt1 besitzt als hochaffiner Transporter im Vergleich zu ZmSUT1 eine 80-fach höhere Affinität gegenüber SUC und eine 68-fach höhere Affinität gegenüber  $H^+$ . Deshalb ist UmSrt1 als „*high affinity/low capacity*“ Transporter zu sehen, während ZmSUT1 als „*low affinity/high capacity*“ Transporter einzuordnen ist. Daher würde ZmSUT1 bei einer extrazellulären SUC-Konzentration von ca. 5 mM nur die Hälfte seiner möglichen Aktivität erreichen. Das Szenario bei der Pflanze/Pilz Interaktion lässt vermuten, dass an den Kontaktstellen zwischen Pflanze und Pilz, wo sich beide Organismen den gleichen extrazellulären Raum teilen, die SUC-Konzentration sehr gering ist. Unter diesen Umständen besitzt UmSrt1 aufgrund seiner hohen Affinität einen deutlichen Vorteil bei der Aufnahme von SUC.

Der physiologische pH-Wert im Apoplasten von Maiswurzeln wurde mit Werten zwischen 5,1 und 5,6 bestimmt (Peters & Felle, 1999). Weitere Schwankungen über diesen Bereich hinaus können auf Grund bestimmter Stressfaktoren wie Wassermangel, Lichtintensität und die  $CO_2$ -Konzentration hervorgerufen werden. Solche Schwankungen im apoplastischen pH-Wert werden als mögliche Signale für die Aktivierung von Kanalproteinen (Blatt, 1992), bei Trockenstress (Wilkinson & Davies, 1997; Wilkinson, 1999) und die Ausschüttung an ABA in den Apoplasten diskutiert (Hartung et al., 1988). UmSrt1 hat das Optimum seiner Transportaktivität im physiologischen pH-Wert Bereich des Apoplasten, kann darüber hinaus aber auch noch bei neutralen und leicht alkalischen pH-Werten SUC aufnehmen. Veränderungen des herrschenden apoplastischen pH-Werts begegnet UmSrt1, verglichen mit ZmSUT1, also mit einer relativen pH-Insensitivität des Transports. Das Optimum der Transportaktivität wurde in dieser Arbeit bei pH 5,5 ermittelt, eine SUC-Transportaktivität wurde jedoch über den

gesamten pH-Wert Bereich von 3,5 bis 8 beobachtet (Abbildung 3.11). Somit scheint es *Ustilago maydis* möglich, mittels UmSrt1 eine konstante und von der Wirtspflanze „unbemerkt“ Aufnahme von SUC über ein überraschend weites pH-Spektrum bewerkstelligen zu können.

Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, dass der bestehende  $H^+$ -Gradient den SUC/ $H^+$ -Symport ab einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 nicht mehr als Triebkraft begünstigt. Im Zytoplasma der Oozyte herrscht ein pH-Wert von 7,5 und der extrazelluläre pH-Wert der SUC-haltigen Messlösungen betrug im äußersten Fall pH 8,5. Die beobachtete Transportaktivität bei pH 8,5 wirft nun die Frage auf, ob es unter thermodynamischen Gesichtspunkten überhaupt möglich ist, dass ein  $H^+$ -gekoppelter SUC-Transporter bei einem solch extrem basischen pH-Wert von 8,5 überhaupt noch  $H^+$ -Ströme generiert?

Die dabei im Gegensatz zum Zytoplasma der Oozyte 10-fach geringere  $H^+$ -Konzentration außen bildet einen nach außen gerichteten  $H^+$ -Gradienten, was mit einer elektrischen Potentialdifferenz von 59 mV bei Standardbedingungen ausgedrückt werden kann (nach Nernst Gleichung). Unter thermodynamischen Gesichtspunkten wirken diese Bedingungen einem SUC/ $H^+$ -Symport eher entgegen und es würde kein  $H^+$ -Einstrom in die Oozyte detektiert werden. Da die Experimente jedoch einer Kontrolle der Membranspannung unterlagen, herrschte bei diesen Untersuchungen eine konstante Spannung von -100 mV. Diese negative Spannung generierte einen nach innen gerichteten elektrischen Gradienten über der Membran, der mit der gleichzeitigen Anwesenheit von SUC in der externen Lösung einen SUC/ $H^+$ -Symport ermöglichte. Zusätzlich zum elektrischen Gradienten, spielt auch der SUC-Gradient bei der Energetisierung des Transports eine ebenso große Rolle wie der  $H^+$ -Gradient und der elektrische Gradient.

Der SUC-Gradient war bei den Experimenten in der Oozyte steil nach innen gerichtet, da Oozyten keine SUC im Zytosol beinhalten und mit ihrer Größe ein sehr großes Volumen aufweisen. Im Pilz könnte man sich vorstellen, dass die aufgenommene SUC sofort metabolisiert wird und damit ein beständiger SUC-Gradient für den Umsrt1-vermittelten Transport erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu muss ZmSUT1 gegen einen steilen SUC-

Gradienten arbeiten, da in Phloemzellen SUC-Konzentrationen von etwa ein Mol vorherrschen können (Lohaus et al., 2000; Lohaus & Fischer, 2004). Auch dieser Umstand favorisiert den Transport über die Plasmamembran des Pilzes.

Die Tatsache, dass UmSrt1 relativ pH-unabhängig arbeitet, ermöglicht es *U. maydis* auch unter Stressbedingungen der Pflanze und damit resultierenden Schwankungen der H<sup>+</sup>-Konzentrationen den SUC-Import sicher zu stellen. Zusätzlich wäre ein negatives Membranpotential in den Pilzhyphen ein Vorteil bei der Konkurrenz um die apoplastischen Zuckerressourcen zwischen Pflanze und Pilz. Um diese Annahme belegen zu können wären zukünftige Messungen des Membranpotentials von *U. maydis*-Hyphen interessant. Solche Einstich-Messungen könnten das vorherrschende physiologische Membranpotential in den Pilzhyphen abbilden. Der SUC/H<sup>+</sup>-Symport könnte mit diesen Messungen direkt belegt werden, da bei der SUC-Aufnahme mit gleichzeitigem Influx von H<sup>+</sup> eine Depolarisation des Membranpotentials zu erwarten wäre.

### 4.1.2 Untersuchungen zur Substratspezifität

Informationen über die Substratspezifität bereits klonierter pflanzlicher SUC-Transporter begannen bereits in den 80er Jahren. Die Experimente beschränkten sich jedoch oft auf Aufnahmeexperimente in Hefe ohne die Membranspannung zu berücksichtigen (Hitz et al., 1986). Die dabei mögliche Variabilität in der Membranspannung kann zu unterschiedlichen Ergebnissen in verschiedenen Expressionssystemen führen.

Somit sind für die Ermittlung der Substratspezifität eines Proteins Experimente unter Spannungsklemmbedingungen sinnvoll. Inzwischen liegen Daten mono- und dicotyler SUC-Transporter aus dem Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten unter konstanten Spannungsklemmen-Bedingungen von z.B. den SUC-Transportern AtSUC2 und AtSUC9 aus *Arabidopsis thaliana* (Chandran et al., 2003; Sivitz et al., 2007), OsSUT1 aus Reis (*Oryza sativa*) (Sun et al., 2010), HvSUT1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) (Sivitz et al., 2005) und ShSUT1 aus Zuckerrohr (*Saccharum hybrid*) (Reinders et al., 2006) vor. HvSUT1 und ShSUT1 wurden mit einer engen Spezifität beschrieben, die sich nur mit

Transportaktivitäten bei SUC, Maltose und dem  $\beta$ -Glycosid Salicin äußerte. Diese SUC-Transporter des Typ-II aus Monokotylen transportieren beispielsweise kein Esculin und Fraxin (Reinders et al., 2012). ZmSUT1 kann aufgrund seines Profils eindeutig den Vertretern des Typs II aus Monokotylen zugeordnet werden (Abbildung 3.14). Das primäre Substrat SUC wird mit höchster Aktivität transportiert, gefolgt von einer deutlichen Aktivität bei Maltose und einer geringeren Aktivität bei Salicin.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit belegen für UmSrt1 eher ein breites Spektrum an transportierten Substanzen. UmSrt1 zeigt neben SUC als primärem Substrat dagegen ein unspezifisches Transportverhalten mit geringen, aber dennoch deutlichen Transportaktivitäten bei allen angebotenen Mono-, Di- und Trisacchariden, Salicin, sowie dem synthetischen SUC-Analogon Sucralose. Die von Wahl et al. präsentierten Ergebnissen zur Substratspezifität von UmSrt1, die mittels Wettbewerbsanalysen in Hefen angefertigt wurden, liefern Übereinstimmungen bezüglich einer geringen Transportaktivität von Maltose und Raffinose (Wahl et al., 2010). Die Autoren beschreiben trotz erkennbarer Transportaktivitäten bei Maltose und Raffinose eine enge Spezifität für SUC und UmSrt1 wird als SUC-spezifisch beschrieben. Anhand der in dieser Arbeit angefertigten Ergebnisse kann diese beschriebene SUC-Spezifität nicht bestätigt werden.

Da der biotrophe Pilz *U. maydis* auf den Import von Kohlenstoffverbindungen seiner Wirtspflanze angewiesen ist, stellt es durchaus einen Vorteil dar, ein breites Spektrum an Substraten zu transportieren. Sollte es aufgrund pflanzlicher Zellwandinvertasen zur Hydrolyse von SUC kommen, ist UmSrt1 in der Lage, die Ressource SUC auch in Form von Monosacchariden aufzunehmen. Mit dieser breiten Spezifität kann UmSrt1 gleichzeitig das Signal für die mögliche Auslösung einer pflanzlichen Abwehrreaktion durch die Existenz extrazellulärer Glucose schnellstmöglich abtransportieren und als eigenen Nährstoff verwenden. Phylogenetischen Analysen zufolge sind ZmSUT1 und UmSrt1 beide Vertreter der MFS Superfamilie, gehören jedoch verschiedenen Untergruppen an. Während ZmSUT1 der Gruppe der SUTs zugeordnet wird, kann UmSrt1 eine engere Verwandtschaft zu pflanzlichen und pilzlichen Monosaccharidtransportern (MSTs) und weiter zu den *sugar transport proteins* (STPs) belegt werden (Wahl et al., 2010). Die

Tatsache, dass UmSrt1 in der Lage ist auch Monosaccharide zu transportieren, scheint erklärlich, wenn man die beschriebenen verwandtschaftlichen Beziehungen betrachtet.

### 4.2 Posttranslationale Modifikationen von SUC-Transportern

Zellen besitzen eine große Vielfalt an Möglichkeiten, ihre Proteine zu modifizieren. Einige Modifikationsprozesse von Proteinen laufen konstitutiv ab, bei anderen müssen die Enzyme durch abiotische Faktoren erst funktionalisiert werden. Zu den wichtigsten bekannten posttranslationalen Modifikationen gehören z.B. die Proteinsynthese und –denaturierung (*turnover*) und die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen. Das Abspalten und Anhängen organischer Gruppen, die Bildung größerer Moleküle oder die Veränderung des Redox-Potentials können ebenfalls die Lebensdauer und die Aktivität von Proteinen regulieren.

#### 4.2.1 Einfluss von Redox-Reagenzien auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1

Werden einem Atom Elektronen entzogen (Oxidation), werden sie einem anderen Atom zugeführt (Reduktion). Das Oxidationsmittel ist die Substanz, die dem Reaktionspartner die Elektronen entzieht und dabei selbst reduziert wird. Umgekehrt wird das Reduktionsmittel demnach selbst oxidiert. Da es sich stets um eine Kopplung von Oxidation und Reduktion handelt, spricht man von Redox-Reaktionen.

Redox-Reaktionen sind ein zentrales Steuerelement im zellulären Stoffwechsel der Pflanzen. Entwicklungs- aber auch umgebungsbedingte Stimuli können den Redox-Status einer Zelle maßgeblich verändern (Wormuth et al., 2007). Die Bildung von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species; ROS*) erfolgt z. B. zum einen als Nebenprodukt des pflanzlichen Zellstoffwechsels, zum anderen im Falle von oxidativem Stress der Pflanze, ausgelöst beispielsweise durch Trockenheit, Schwermetallbelastung oder Pathogenbefall. Dabei können freie Radikale entstehen (das Superoxid-Anion  $O_2^{\cdot-}$ , hochreaktive Hydroxyl-Radikale  $OH^{\cdot}$ , Peroxylradikale  $ROO^{\cdot}$ , stabile Oxidanzien wie

Hydroperoxid ROOH und Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ozon O<sub>3</sub>, angeregter Sauerstoff <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sowie Hypochlorit-Anionen OCl<sup>-</sup>). Diese übernehmen wichtige Funktionen in Kaskaden der Signalübertragung, kommen allerdings auch direkt als Auslöser (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pflanzenartspezifischer und pathogenabhängiger Abwehrmechanismen zum Einsatz (Jones & Dangl, 2006; Torres et al., 2006; Wormuth et al., 2007; Dietz, 2008; Stroher & Dietz, 2008). Das Wissen über Redox-abhängige Signaltransduktionsketten und daraus resultierende Veränderungen im Zellstoffwechsel ist jedoch begrenzt.

Seit den 80er Jahren wurde bereits der Einfluss Redox-aktiver Reagenzien auf die biophysikalischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen untersucht (Lichtner et al., 1981). Experimente mit Ackerbohnen (*Vicia faba*) konnten für die Sulfhydrylgruppen-modifizierenden Substanzen N-ethylmaleimid (NEM) und p-Chloromercuribenzenesulfonat (PCMBS) eine Inhibierung der SUC-Aufnahme ins Phloem belegen (Giaquinta, 1980; M'Batchi & Delrot, 1984). Mit Thiolgruppen-reduzierenden Substanzen wie Dithioerythritol (DTE) und Cystein konnte eine vollständige Reversibilität der Inhibierung durch PCMBS belegt werden, für NEM-ausgelöste Inhibierungen konnte eine solche Reversibilität nicht gezeigt werden (M'Batchi & Delrot, 1984; Bourquin et al., 1990).

Im Jahre 2008 wurde eine Arbeit von Krügel et al. angefertigt, die einen Einfluss verschiedener Redox-Reagenzien auf die Aktivität der SUC-Aufnahme von StSUT1 aus Kartoffel zeigte. Die Autoren beschrieben eine Redox-abhängige Transportaktivität im heterologen Expressionssystem der Hefen. Hierfür wurde mit Glutathion gearbeitet, welches in reduzierter Form als Monomer (GSH) und in oxidiert Form als Dimer (GSSG) vorliegt. Die Anwesenheit oxidiert organischer Agenzien wie L-Cystin und GSSG führten zu einer bis zu 10-fach gesteigerten SUC-Aufnahme, während die Anwesenheit reduzierter Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT) und GSH zu einer Abnahme der Transportrate führten (Krugel et al., 2008). Einen weiteren Beleg für die gesteigerte SUC-Aufnahme pflanzlicher SUC-Transporter unter Anwesenheit oxidiert Reagenzien führten die Autoren mit einem elektrophysiologischen Experiment mit ZmSUT1-exprimierenden *Xenopus* Oozyten durch. Die Anwesenheit von 1 mM GSSG führte bei

pH 5,5 nahezu zu einer Verdopplung der aufgezeichneten Ströme, weshalb für ZmSUT1 ebenfalls eine Regulation durch oxidierende und reduzierende Substanzen vorgeschlagen wurde.

Die Zugabe der verwendeten Redox-aktiven Substanzen zu einer Messlösung führt zu einer starken Verschiebung des pH-Wertes der entsprechenden Lösung. So säuern GSSG und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Messlösung an, während die reduzierenden Substanzen GSH und DTT den pH-Wert ins Alkalische verschieben. Die dramatische Auswirkung des Redox-Status der Messlösung ließ die Vermutung aufkommen, dass die elektrophysiologischen Experimente von Krügel et al. nicht unter kontrollierten pH-Bedingungen stattfanden. Deshalb wurden die entsprechenden Experimente im Rahmen dieser Arbeit mit ZmSUT1-exprimierenden Oozyten wiederholt. Die erhöhte Transportaktivität von ZmSUT1 in Anwesenheit von 1 mM GSSG lag eindeutig an der Ansäuerung der Messlösung und nicht am Redox-Potential. Unter kontrollierten pH-Bedingungen konnte ein leichter Rückgang in der Transportaktivität verzeichnet werden. Dies galt für oxidierende (GSSG und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und reduzierende (GSH und DTT) Substanzen gleichermaßen (Abbildung 3.29). Diese Befunde wurden in der Arbeit von Wippel et al. (2010) richtig gestellt.

Auch Sun et al. untersuchten etwa zur gleichen Zeit die Redox-Abhängigkeit der Transportaktivität von OsSUT1 und OsSUT5. Sie belegten in elektrophysiologischen Experimenten für die beiden Transporter aus Reis sowie zusätzlich für ZmSUT1 und HvSUT1 ebenfalls nur minimale, nicht signifikante Effekte auf die Transportaktivitäten der exprimierenden Oozyten in Anwesenheit von 1 mM GSSG und 1 mM GSH (Sun et al., 2010).

### **4.2.2 Einfluss von Sucralose auf die SUC-Aufnahme von ZmSUT1**

Für biophysikalische aber auch physiologische Untersuchungen zur Funktion eines Proteins ist es sehr hilfreich, einen Inhibitor nutzen zu können. Mithilfe eines spezifischen Inhibitors für SUC-Transporter wäre es möglich, die Generierung von Verlustmutanten zu umgehen. Dies führt im Falle der *Zea mays sut1*-Mutante zu einem

markanten und dramatischen Phänotyp (Slewiniski et al., 2009). Bei Untersuchungen *in planta* könnten z.B. Experimente mit der Applikation eines spezifischen und effektiven Inhibitors zur weiteren Aufklärung der Kohlenstoffverteilung in der Pflanze beitragen. Auch der Beginn der Inhibierung der Proteine wäre frei wählbar.

Das SUC-Analogon Sucralose wurde durch die Firma Tate & Lyle und Forschern des Queen Elizabeth College, University of London, im Jahre 1976 entdeckt ([www.tateandlyle.com/AboutUs/history](http://www.tateandlyle.com/AboutUs/history)). In Deutschland wurde Sucralose im Jahre 2005 gemäß der Zusatzstoffzulassungsverordnung zugelassen und ist bereits in vielen Lebensmitteln als Süßstoff enthalten, da Sucralose im Gegensatz zu anderen Süßstoffen keinen bitteren Nachgeschmack erzeugt. Diese synthetische Verbindung besitzt keinen nennenswerten physiologischen Brennwert, da sie von den Enzymen der Kohlenhydratverdauung nicht aufgespalten werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sucralose nicht zu den transportierten Substraten von ZmSUT1 zählt (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14). Diese Daten bestätigen die bereits veröffentlichten Arbeiten zur Substratspezifität monokotyler SUC-Transporter z.B. OsSUT1, OsSUT5 (Sun et al., 2010) oder ShSUT1 (Reinders et al., 2006). Während SUC-Transporter des Typ-I Sucralose transportieren (Sivitz et al., 2007), zählt Sucralose bei den SUC-Transportern des Typ-II nicht zu den transportierten Substraten. Es wurde sogar eine kompetitiven Hemmung von Sucralose auf den SUC-Transport von ShSUT1 beschrieben (Reinders et al., 2006). Eine Inhibierung der SUC-Transportaktivität konnte in dieser Arbeit für ZmSUT1 ebenfalls mit einem  $IC_{50}$ -Wert für Sucralose von 4,4 mM belegt werden. Diese Daten bestätigen neben dem typischen Profil der Substratspezifität (Abbildung 3.14) die Einteilung von ZmSUT1 in die Gruppe der Typ-II SUT's. Die Ergebnisse dieser Arbeit bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen von Derrer et al. (2013) zur Inhibierung von Sucralose. Da es sich bei Sucralose um einen kompetitiven Inhibitor handelt (Derrer et al., 2013), passt Sucralose in die Substratbindetasche des ZmSUT1-Proteins. Darüber hinaus konnten Derrer et al. mit Hilfe von Experimenten mit der Methode der Spannungsklemmen-Fluorometrie zeigen, dass Sucralose an die auswärts gerichtete Konformation von ZmSUT1 bindet und den Transporter in dieser Konformation arretiert.

Verharrt ZmSUT1 aufgrund der kompetitiven Hemmung durch Sucralose in der nach außen gerichteten Konformation, sind die H<sup>+</sup>-Bindestellen ebenfalls nach außen zur externen Lösung zugänglich. Die H<sup>+</sup> können ungehindert in das elektrische Feld der Membran diffundieren und spannungsabhängig und kurzweilig an das Protein binden. Da es jedoch nicht zum Transport des Substrats und der H<sup>+</sup> kommt, bleibt die Erhöhung der C<sub>m</sub> in Anwesenheit von Sucralose erhalten. Im Gegensatz dazu sinkt die C<sub>m</sub> in Anwesenheit von SUC stark ab (Carpaneto et al 2010).

### 4.3 Identifizierung der ZmSUT1-Substratbindestelle

Um die genaue Funktion und Regulation eines Proteins bestimmen zu können, ist es sehr hilfreich dessen Struktur zu kennen. Mutagenesestudien sind ein nützliches Werkzeug, um Informationen über Struktur und Funktion von Transportproteinen zu erlangen. Das Vorgehen zur Identifikation der Substratbindestelle bei LacY basierte auf der Cysteinscanning-Mutagenesestudie (Frillingos et al., 1998) in Verbindung mit gerichteter Alkylierung mittels eines Sulfhydrylgruppen-spezifischen Reagenz (Frillingos et al., 1998; Sahin-Toth & Kaback, 2000; Venkatesan et al., 2000; Vadyvaloo et al., 2006; Kaback et al., 2007).

Bei Cysteinscanning-Mutagenesestudien werden zu untersuchende AS durch ein Cystein (C) ersetzt, sodass die generierten Mutanten jeweils nur ein Cystein an einer bestimmten Stelle im Protein enthalten. Diese Cystein-Mutanten werden mit Sulfhydrylgruppen-spezifischen Reagenzien behandelt. Das membrangängige Fluorophor N-ethylmaleimid (NEM), welches an die Sulfhydrylgruppe des Cysteins kovalent bindet, kann z. B. für diese Zwecke eingesetzt werden. Um ein unspezifisches Binden des Fluorophors an native Cysteine ausschließen zu können, muss zunächst eine funktionelle Cysteinfreie-Mutante des zu untersuchenden Proteins hergestellt werden. Mit anschließenden Aktivitäts- und Bindungsstudien können dann Erkenntnisse über die Zugänglichkeit und Lage der AS im Protein (extrazelluläre oder zytosolische Seite des Proteins) und der Einfluss auf die Substratbindung untersucht werden (Sahin-Toth et al.,

1999, Zhang et al., 2003; Abramson et al., 2003a; Abramson et al., 2003b). Bei der Lactose Permease aus *E. coli* wurden mit dieser Vorgehensweise einzelne Transmembrane Helices Aminosäure für Aminosäure untersucht und Rückschlüsse auf die Struktur-Funktions-Beziehungen im LacY-Protein gezogen. Diese Ergebnisse konnten später durch die Kristallisation von LacY auf atomarer Ebene zum größten Teil bestätigt werden (Abramson et al., 2003a). Ein weiterer Vertreter der MFS-Familie ist der SUC/H<sup>+</sup>-Symporter CscB aus *E.coli*, der SUC mit hoher Spezifität transloziert (Sahin-Toth et al. 1995). Anhand von Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene zeigte sich, dass für die Transportfunktion essentielle Aminosäurereste von LacY auch in CscB konserviert zu finden sind (Vadyvaloo et al., 2006). Anhand der LacY-Kristallstruktur als Vorlage und gerichteten Mutagenesestudien an CscB konnten auch hier die AS identifiziert werden, die für die Substratbindung verantwortlich sind. Interessanteweise liegen die homologen AS in den Transportproteinen LacY und CsCb exakt an der gleichen dreidimensionalen Position und unterscheiden sich nur in den Charakteristika ihrer Seitenketten (Vadyvaloo et al., 2006).

Die Inkubation von ZmSUT1 WT-exprimierenden Oozyten mit NEM führte bereits zur Blockierung der Transportaktivität. Auch weitere Versuche Cystein-Mutanten zu erzeugen, die NEM-insentive Transportströme aufwiesen, scheiterten (persönliche Kommunikation mit Dr. Carmen Derrer). Somit war es mit ZmSUT1 nicht möglich, Cysteinscanning-Studien durchzuführen, um die Lage und Zugänglichkeit von einzelnen AS-Seitenketten zu bestimmen.

Daher galt es, sich auf die bestehende Homologie in den Aminosäuresequenzen von ZmSUT1 und LacY zu konzentrieren. Diese basiert nur aus 11 % identischen und 27 % konservierten AS und wird daher als gering eingestuft. Dennoch diente die 3D-Struktur von LacY als Matrize zur Generierung eines groben 2D-Modells von ZmSUT1. Anhand der von Prof. Thomas Müller erstellten Modelle (2-D Modell Abbildung 3.16 und 3-D Modell Abbildung 3.17) wurden AS in den homologen Positionen zu denen in LacY und CsCb zur Mutagenese ausgewählt. Essentielle AS für die Substratbindung in LacY und CscB (Abramson et al., 2003b) befinden sich vor allem auf den TMs TM I – VIII (Tabelle 3.2).

Die Mutationen sollten der ursprünglichen AS im Protein entweder einen „veränderten Charakter“ verleihen, oder den Austausch zweier aromatischer AS „gleichen Charakters“ untersuchen.

Die zentralen Fragen zur Identifikation der Substratbindestelle von ZmSUT1 lauteten also:

Welchen Einfluss haben die einzelnen Mutationen auf die Substratbindung und woran erkennt man, dass die AS an der Substratbindung beteiligt ist?

Die Transporteigenschaften der generierten ZmSUT1-Mutanten wurden mittels elektrophysiologischer Messungen unter denselben Bedingungen wie der WT charakterisiert. Sollte eine Mutation im ZmSUT1-Protein eine Aminosäure betreffen, die an der SUC-Bindung beteiligt ist, würde man eine Reduktion der Substrataffinität oder den kompletten Verlust von SUC-induzierten Transportströmen erwarten.

### **Mutationen auf Helix I:**

Auf Helix I in LacY befinden sich die AS F20 und M23, in CscB sind es F23 und W26, die an der Substratbindung beteiligt sind. Auf der Helix I in ZmSUT1 wurden die AS Q48 und W51 als homologe AS in adäquaten Positionen für die Mutagenesestudie ausgewählt. Die Mutanten in den Positionen Q48 und W51 wiesen bedeutende Veränderungen in ihren Transporteigenschaften auf:

W51A zeigte einen dramatischen Phänotyp mit dem kompletten Verlust der Transportaktivität. In diesem Fall konnten die Messungen der Membrankapazitäten ( $C_m$ ), die das Binden der  $H^+$  abbilden (Carpaneto et al., 2010) noch wichtige Informationen liefern. Sobald Veränderungen der Membrankapazitäten ( $\Delta C_m$ ) auf Änderungen der  $H^+$ -Konzentration hin beobachtet werden können ist zumindest sichergestellt, dass das Protein korrekt exprimiert wurde. W51A reagierte noch mit WT-ähnlichen  $\Delta C_m$  auf veränderte  $H^+$ -Konzentrationen. Dies weist daraufhin, dass zum einen die Mutante exprimiert wird, dass das Targeting zur Membran unbeeinflusst ist und dass die Bindung von  $H^+$  nach wie vor SUC-abhängig funktioniert.

Die Mutanten Q48C/F zeigten eine verminderte Aktivität im Transport von SUC und stachen durch extrem erhöhte  $K_m^S$ -Werte hervor. Diese Einbußen in der Affinität

gegenüber SUC sind wahrscheinlich auf eine gestörte Bindung der SUC zurückzuführen. Da auch bei diesen Mutanten die  $\Delta C_m$  als Antwort auf Spannungssprünge und der Anwesenheit von SUC ähnlich zum ZmSUT1 WT verlief, scheint die Bindung der  $H^+$  an den Transporter von der Mutation unbeeinflusst zu sein. Durch die starke Verschiebung des  $K_m^S$ -Wertes zu hohen SUC-Konzentrationen und die dreidimensionale Lage in der homologen Position von M23 bei LacY bzw. W26 bei CscB, erscheint eine Beteiligung von Q48 an der Substratbindung wahrscheinlich.

### **Mutationen auf Helix IV:**

Die Veränderung der Positionen R146 und Y153 führten zu ähnlichen Beeinträchtigungen des SUC-Transports wie bei den Mutanten Q48C/F. Verglichen mit dem ZmSUT1 WT, wiesen R146A und Y153A eine verminderte Aktivität im Transport von SUC auf und die erhöhten  $K_m^S$ -Werte ließen auf eine verringerte Affinität gegenüber SUC schließen. Beide AS befinden sich nach dem 3D-Modell von ZmSUT1 auf Helix IV. Die zu R146 in ZmSUT1 entsprechenden AS in LacY (R144) und in CscB (R147) befinden sich jeweils auf Helix V und sind essentiell an der Substratbindung beteiligt. Auf der gleichen Helix V sind die essentiellen AS W151 in LacY und Y154 in CscB zu finden. Beide sind an der Substratbindung beteiligt und könnten die korrespondierende AS zu Y153 in ZmSUT1 darstellen. Neben dem Effekt auf die Affinität, veränderte sich bei der Mutante Y153A das Profil der Substratspezifität, die sich in einer deutlichen Erhöhung der Transportaktivität für Salicin ausdrückte.

Y153W wurde mit WT-ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Substratspezifität eingeordnet und wies keine weiteren Besonderheiten auf. Die konservative Mutation an der Position 153 von Tyrosin (Y) zu einer ebenfalls aromatischen AS Tryptophan (W) hatte keine besonderen Auswirkungen auf die Transportaktivität. Lediglich eine bemerkenswerte Änderung in der Substratspezifität mit einer Erhöhung für den Transport von Salicin war für diese Mutante zu verzeichnen, genau wie es bei der Mutation Y153A der Fall war. Somit spielt vermutlich auch die AS an Position 153 eine Rolle in der Bindung der SUC und scheint die Substratspezifität zu beeinflussen.

Damit die Aufklärung der Struktur von ZmSUT1 voranschreiten kann und die AS, die an der Substratbindung beteiligt sind aufgedeckt werden, muss zweifelsfrei geklärt werden, dass die identifizierten Aminosäuren tatsächlich an der Substratbindung beteiligt sind und darüber hinaus weitere ZmSUT1 Mutanten erzeugt werden, um weitere an der Substratbindung beteiligten Seitenketten bestimmen zu können.

Reinders et al. 2012 beschrieben mit Hilfe einer Mutagenesestudie die Entdeckung fünf wichtiger AS in OsSUT1 und ShSUT1, die an der Substratspezifität beteiligt sind. Bei entsprechendem Austausch dieser fünf AS wurde der Typ-II Transporter OsSUT1 (enge Substratspezifität) zu einem Typ-I Transporter mit einer breiten Substratspezifität konvertiert. Allerdings folgerten die Autoren aus ihren Experimenten, dass diese AS zwar die Substratspezifität beeinflussen, jedoch stellen die mutierten Positionen nicht einen Teil der Substratbindestelle dar (Reinders et al 2012). Vielmehr verhindern diese AS die Translokation des Substrats. Diese Hypothese wurde von Derrer et al (2013) untermauert: Spannungsklemmen-Fluorometrie Experimente in Kombination mit elektro-physiologischen Untersuchungen des inhibitorischen Effekts von Sucralose und Palatinose zeigten, dass diese Typ-I permeablen Zucker die Konformationsänderungen von Typ-II Zuckertransportern blockieren. Die Bindung dieser Zucker an die Bindestelle von Typ-II Transportern findet zwar statt, da die Inhibition durch z.B. Sucralose auf eine Kompetition mit dem Substrat SUC zurückzuführen ist, es findet aber kein Transport statt.

Eine Substanz, die für die Identifikation der Substratbindestelle genutzt werden kann ist das fluoreszierende  $\beta$ -Glykosid Esculin. Ebenso wie Sucralose wird Esculin nicht transportiert und fungiert ebenfalls als kompetitiver Inhibitor (unveröffentlichte Daten AG Geiger). Da Esculin fluoresziert ist es vorstellbar, FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) Untersuchungen mit den vier hier identifizierten Substratbindungsmutanten durchzuführen, um zweifelsfrei deren Beteiligung an der Substratbindung zu beweisen. Um eine Energieübertragung mittels FRET messen zu können, bedarf es eines Donors und eines Akzeptors. Tryptophane (W), die putativ an der Bindestelle beteiligt sind,

nehmen die Position des Donors im FRET-System ein, da Tryptophane durch UV-Licht angeregt werden können (Creed, 1984; Chen et al., 2008). Der Akzeptor in diesem FRET-System stellt dann der fluoreszierende Zucker Esculin dar. Die Idee ist folglich, dass Esculin durch die Tryptophan-Fluoreszenz angeregt wird, sobald der Abstand zwischen Aminosäure und Zucker gering genug für eine Energieübertragung ist. Somit könnte die Bindung des fluoreszierenden Zuckers an die potentiell beteiligten Tryptophane visualisiert werden. Um das System zu überprüfen, sollte durch die Zerstörung der Substratbindestelle mittels gerichteter Mutagenese kein FRET mehr messbar sein.

Diese Untersuchungen in Kombination mit dem „fine-tuning“ des 3D Modells von ZmSUT1 könnten in Zukunft erste Ansatzpunkte für die Aufklärung der Struktur von pflanzlichen SUC-Transportern liefern.

### 5 Zusammenfassung

Bei der Betrachtung des Pathosystems *Ustilago maydis/Zea mays* kommen sich Proteine unterschiedlicher Organismen sehr nahe. Die derzeitige Hypothese zur lokalen Szenerie in der ausgebildeten Interaktionszone von Pflanze und Pilz spricht zwei SUC-Transportern dabei wichtige Rollen in der Pflanze/Pilz Interaktion zu. UmSrt1, der erste beschriebene pilzliche SUC-Transporter aus dem Maispathogen *Ustilago maydis* (Wahl et al., 2010) und ZmSUT1, der aus *Zea mays* stammende *low affinity* SUC-Transporter (Carpaneto et al., 2005) werden als Gegenspieler im Konkurrenzkampf um die extrazelluläre SUC beschrieben (Wahl et al., 2010).

ZmSUT1 ist in der Plasmamembran der Geleitzellen lokalisiert und dort für die Beladung des Phloems mit SUC aus dem Apoplasten zuständig. UmSrt1, für den eine Lokalisation in der Plasmamembran in Hefen gezeigt werden konnte, sorgt als „*high affinity*“ Transporter mit dem Import extrazellulärer SUC für die Kohlenhydratversorgung der pilzlichen Entwicklung und Ernährung (Wahl et al., 2010).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren vergleichende elektrophysiologische Charakterisierungen der SUC-Transporteigenschaften von ZmSUT1 und UmSrt1. Durch heterologe Expression der Proteine in *Xenopus* Oozyten und anschließende Messungen unter Verwendung der DEVC-Technik wurden die Eigenschaften des SUC-Transports beider SUC-Transporter im Hinblick auf ihre Konzentrations-, pH-, Spannungsabhängigkeit, sowie auf die Substratspezifität hin untersucht. Diese vergleichenden Studien zur Charakterisierung beider Transportproteine ergaben ihren physiologischen Aufgaben entsprechende Unterschiede. ZmSUT1 konnte ein Verhalten als „*low affinity/high capacity*“ Transporter mit Affinitäten gegenüber SUC im millimolaren Bereich mit einer spannungsunabhängigen Transportaktivität bestätigt werden. Zudem konnte die Transportaktivität als stark H<sup>+</sup>-abhängig beschrieben werden (Carpaneto et al., 2005), deren Optimum nahe des physiologischen Bereichs des Apoplasten bestimmt werden konnte. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur

## Zusammenfassung

---

Substratspezifität angefertigt, die ZmSUT1 eindeutig eine Typ-II SUT Zugehörigkeit (Sivitz et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sun et al., 2010) mit einem engen Substratspektrum belegen.

Für UmSrt1 dagegen wurde ein Transportverhalten als „*high affinity/low capacity*“ Transporter mit höheren Affinitäten gegenüber SUC im mikromolaren Bereich ermittelt (Wahl et al., 2010). Darüber hinaus beschreiben die Ergebnisse dieser Arbeit eine weitestgehend H<sup>+</sup>-unabhängige Transportaktivität in einem weiten pH-Wert Bereich. Im Profil der Substratspezifität zeigte sich neben SUC als primärem Substrat ein eher unspezifischer Transport weiterer Mono-, Di- und Trisaccharide. Die postulierte SUC-Spezifität von UmSrt1 (Wahl et al., 2010) konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Mit einem effektivem Import von SUC mittels UmSrt1 in den Pilz umgeht *U. maydis* die Hydrolyse von SUC im pflanzlichen Apoplasten und damit die Bildung extrazellulärer Glukose, die ein Signal in der pflanzlichen Pathogenabwehr darstellt (Herbers et al., 1996b; Ehness et al., 1997; Kocal et al., 2008). Somit scheint es für *Ustilago maydis* möglich zu sein, eine von der Wirtspflanze *Zea mays* weitestgehend „unbemerkt“ Aufnahme von Kohlenhydraten über einen breiten pH-Wert Bereich bewerkstelligen zu können. Die vielfach höheren Affinitäten gegenüber SUC und H<sup>+</sup> verschaffen UmSrt1 im Konkurrenzkampf um die extrazelluläre SUC einen klaren Vorteil gegenüber ZmSUT1. Diese Daten deuten darauf hin, dass *U. maydis* auch unter Stressbedingungen der Pflanze und damit resultierenden Schwankungen der H<sup>+</sup>-Konzentrationen in der Lage ist, den SUC-Import für seine eigene Ernährung sicher zu stellen.

Das Gebiet posttranslationaler Modifikationen von SUC-Transportern ist weitestgehend unerforscht. *In planta* Versuche deuteten darauf hin, dass Redox-aktive Substanzen den Zuckertransport beeinflussen. Im Oozytensystem wurde deshalb die Aktivität von ZmSUT1 in Anwesenheit der Redox-aktiven Substanzen GSH, GSSG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DTT getestet. Der geringfügige Einfluss dieser Substanzen auf SUC-induzierte Ströme von ZmSUT1 deuten jedoch darauf hin, dass SUC-Transporter nicht ein direktes Ziel von Redox-Veränderungen darstellen.

Um die Struktur des pflanzlichen SUC-Transporters ZmSUT1 näher zu beleuchten und die an der Bindung von SUC involvierten Aminosäuren zu identifizieren, wurde auf der Basis der bereits bekannten Struktur von LacY aus *E.coli*, ebenfalls einem Vertreter der MFS, ein 3D-Modell für ZmSUT1 erstellt. Die AS, die in LacY an der Bindung des Substrats beteiligt sind, wurden bereits identifiziert (Vadyvaloo et al., 2006). Darauf aufbauend wurden im Rahmen einer Mutagenesestudie gezielt AS im Protein ZmSUT1 ausgewählt, die in verwandten SUC-Transportern konserviert und in homologen Positionen zu den in LacY bereits identifizierten AS vorliegen. In diesen ausgewählten Positionen wurden mittels gerichteter Mutagenese acht Mutanten generiert. Die elektrophysiologische Charakterisierung dieser ZmSUT1-Mutanten identifizierte zwei Mutanten, die in der SUC-/H<sup>+</sup>-Translokation gestört waren sowie zwei WT-ähnliche. Es konnten vier Mutanten mit erniedrigten Affinitäten gegenüber SUC identifiziert werden, von denen zwei zusätzlich Veränderungen in ihrer Substratspezifität aufweisen. Diese vier AS werden als mögliche Kandidaten angesehen, an der Bindung und/oder Translokation von SUC beteiligt zu sein.

### 6 Summary

Within the *Ustilago maydis/Zea mays* pathosystem suc transport proteins of different organisms are coming close to each other and compete for sugar in the plant apoplast. It could be shown that two suc transport proteins play an important role in the plant/fungal interaction-zone. UmSrt1, the first described fungal suc-transporter of *Ustilago maydis* (Wahl et al., 2010), and ZmSUT1, a low affinity transporter from *Zea mays* (Carpaneto et al., 2005) are thought to have the role of opposing players in extracellular suc-transport (Wahl et al., 2010).

ZmSUT1 is localized in the plasma membrane of companion cells and there it is responsible for loading the phloem with suc from the apoplast. The high affinity transporter UmSrt1, whose localization in the yeast plasma membrane has been shown, ensures the carbohydrate supply needed for fungal growth and development by importing extracellular suc (Wahl et al., 2010).

The topic of this dissertation is an electrophysiological characterization of the suc-transport performance of ZmSUT1 and UmSrt1 in terms of concentration-, pH- and voltage-dependence as well as substrate specificity. These characterizations have been measured by the heterologous expression of the proteins in *Xenopus* oocytes and subsequent measurements via DEVC-technique. The results of these comparative studies characterize both transport proteins and present differences originating from their physiological responsibilities. ZmSUT1 was shown to be a „low affinity/high capacity“ transporter with affinities for suc and H<sup>+</sup> in millimolar ranges and a voltage-independent transport activity. A strong H<sup>+</sup>-dependent transport activity had been shown by Carpaneto et al. (2005). This dissertation adds the finding that the optimum corresponds with the physiological environment of the apoplast. Further experiments regarding substrate specificity of ZmSUT1 have been conducted and show clearly that this protein belongs to the type-II SUT's (Sivitz et al., 2005; Reinders et al., 2006; Sun et al., 2010; Sun et al., 2012) with a narrow spectrum of selectivity.

## Summary

---

On the other hand, for UmSrt1 a „high affinity/low capacity“ performance with values for suc affinity in micromolar ranges could be confirmed (Wahl et al., 2010). Furthermore the results of this dissertation show a H<sup>+</sup>-independent transport activity over a broad pH range. In addition to suc as the primary substrate, a broad substrate specificity involving mono-, di, and trisaccharides was shown for UmSrt1. The postulated high suc specificity for UmSrt1 (Wahl et al.) could not be confirmed. Efficient import of suc into the fungus, *U. maydis* seem to avoid extracellular glucose production by suc hydrolysis and therewith plant defence responses (Herbers et al., 1996b; Ehness et al., 1997; Kocal et al., 2008). For *U. maydis* it seems to be possible to import carbohydrates in an undetected way by UmSrt1 over a broad pH range. UmSrt1 exhibits high affinities for suc and H<sup>+</sup>, which leads to a more efficient transport of sugar compared to ZmSUT1. Thus *U. maydis* is able to import suc for its own feeding even under stress conditions when oscillating apoplastic H<sup>+</sup>-concentrations may occur.

Up to now the posttranslational modifications of suc-transporters are nearly unexplored. *In planta* it was shown that redox-active substances reduce the sugar import markedly. To test whether suc-transporters are regulated by redox-active substances, such as GSH, GSSG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DTT, we expressed ZmSUT1 in oocytes and monitored its activity in response to the latter substances. Since ZmSUT1 activity was only weakly influenced by redox-active substances, the redox-status of plant cells seem not to regulate SUC-transporter directly.

In order to examine the structure of the plant suc-transporter ZmSUT1 and further characterize the suc bindingsite by identification of involved amino acids, a 3-D model was prepared. The basis of the 3-D model was the known structure of LacY from *E. coli*, which also is an MFS-member. The amino acids, which in LacY are responsible for substrate binding, have already been identified (Vadyvaloo et al., 2006). According to the model, amino acids in homologous positions to those identified in LacY were selected for a mutagenesis study of ZmSUT1. Mutations were introduced in selected positions by targeted mutagenesis and eight mutants were generated. The results of

## Summary

---

electrophysiological characterization of the mutants showed two mutants with disturbance in suc-/H<sup>+</sup>-translocation and two others with a WT-like transport profile. Furthermore four mutants with modified affinity for suc have been identified. Whilst all of these four mutants show a lower affinity for suc, two of them additionally showed a modified profile in their substrate specificity. These four mutants are considered to be possible candidates regarding the involvement of these amino acids in binding and translocation of suc.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturliste

- Abramson, J., Iwata, S. & Kaback, H. R. 2004.** Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins (Review). *Mol Membr Biol*, 21, 227-36.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S. & Kaback, H. R. 2003a.** The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett*, 555, 96-101.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R. & Iwata, S. 2003b.** Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, 301, 610-5.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- Aoki, H.; Hirose, T.; Furbank, R. 2012.** *Sucrose transport in higher plants: from source to sink*, New York, (Springer).
- Aoki, N., Hirose, T., Scofield, G. N., Whitfeld, P. R. & Furbank, R. T. 2003.** The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol*, 44, 223-32.
- Aoki, N., Hirose, T., Takahashi, S., Ono, K., Ishimaru, K. & Ohsugi, R. 1999.** Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol*, 40, 1072-8.
- Ausubel, F. M. 2005.** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, 6, 973-9.
- Baker, R. F., Leach, K. A. & Braun, D. M. 2012.** SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Mol Plant*, 5, 766-8.
- Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., . . . Frommer, W. B. 2000.** SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 12, 1153-64.
- Barratt, D. H., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., . . . Smith, A. M. 2009.** Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13124-9.

- Blatt, M. R. 1992.** K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *J Gen Physiol*, 99, 615-44.
- Boorer, K. J., Loo, D. D., Frommer, W. B. & Wright, E. M. 1996.** Transport mechanism of the cloned potato H<sup>+</sup>/sucrose cotransporter StSUT1. *J Biol Chem*, 271, 25139-44.
- Boorer, K. J., Loo, D. D. & Wright, E. M. 1994.** Steady-state and presteady-state kinetics of the H<sup>+</sup>/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 269, 20417-24.
- Bouche-Pillon, S., Fleurat-Lessard, P., Fromont, J. C., Serrano, R. & Bonnemain, J. L. 1994.** Immunolocalization of the Plasma Membrane H<sup>+</sup> -ATPase in Minor Veins of *Vicia faba* in Relation to Phloem Loading. *Plant Physiol*, 105, 691-697.
- Bourquin, S., Bonnemain, J. L. & Delrot, S. 1990.** Inhibition of Loading of C Assimilates by p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid : Localization of the Apoplastic Pathway in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 92, 97-102.
- Bowles, D. 1998.** Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353, 1495-510.
- Braun, D. M. & Slewinski, T. L. 2009.** Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiol*, 149, 71-81.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. & Kahmann, R. 2009.** *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 423-45.
- Burkle, L., Hibberd, J. M., Quick, W. P., Kuhn, C., Hirner, B. & Frommer, W. B. 1998.** The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol*, 118, 59-68.
- Bush, D. R. 1990.** Electrogenicity, pH-Dependence, and Stoichiometry of the Proton-Sucrose Symport. *Plant Physiol*, 93, 1590-6.
- Buttner, M. & Sauer, N. 2000.** Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys 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. *J Biol Chem*, 280, 21437-43.
- Carpaneto, A., Koepsell, H., Bamberg, E., Hedrich, R. & Geiger, D. 2010.** Sucrose- and H<sup>+</sup>-dependent charge movements associated with the gating of sucrose transporter ZmSUT1. *PLoS One*, 5, e12605.

- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. & Schaad, M. C. 1996.** Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell*, 8, 1669-1681.
- Chandran, D., Reinders, A. & Ward, J. M. 2003.** Substrate specificity of the Arabidopsis thaliana sucrose transporter AtSUC2. *J Biol Chem*, 278, 44320-5.
- Chang, A. B., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C. V. & Saier, M. H., Jr. 2004.** Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol Membr Biol*, 21, 171-81.
- Chen, J., Topygin, D., Brand, L. & King, J. 2008.** Mechanism of the efficient tryptophan fluorescence quenching in human gammaD-crystallin studied by time-resolved fluorescence. *Biochemistry*, 47, 10705-21.
- Chen, L. & Bush, D. R. 1997.** LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in arabidopsis. *Plant Physiol*, 115, 1127-34.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., . . . 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.
- Chincinska, I. A., Liesche, J., Krugel, U., Michalska, J., Geigenberger, P., Grimm, B. & Kuhn, C. 2008.** Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol*, 146, 515-28.
- Christeller, J. T., Farley, P. C., Ramsay, R. J., Sullivan, P. A. & Laing, W. A. 1998.** Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur J Biochem*, 254, 160-7.
- Creed, D. 1984.** The photophysics and photochemistry of the near- UV absorbing amino acids-I. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochem. Photobiol.*, 39, 537-562.
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. 1997.** Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 355-381.
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-33.
- De Witt, J. C. 1991.** The role of technology in removing barriers. *Milbank Q*, 69 Suppl 1-2, 313-32.
- Delrot, S. 1981.** Proton Fluxes Associated with Sugar Uptake in Vicia faba Leaf Tissues. *Plant Physiol*, 68, 706-11.

- Delrot, S. & Bonnemain, J. L. 1981.** Involvement of Protons as a Substrate for the Sucrose Carrier during Phloem Loading in *Vicia faba* Leaves. *Plant Physiol*, 67, 560-4.
- Derrer, C., Wittek, A., Bamberg, E., Carpaneto, A., Dreyer, I. & Geiger, D. 2013.** Conformational Changes Represent the Rate-Limiting Step in the Transport Cycle of Maize SUCROSE TRANSPORTER1. *Plant Cell*.
- Dietz, K. J. 2008.** Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. *Physiol Plant*, 133, 459-68.
- Dinges, J. R., Colleoni, C., James, M. G. & Myers, A. M. 2003.** Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell*, 15, 666-80.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R. P., Kamper, J. & Kahmann, R. 2008.** Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol*, 165, 29-40.
- Doering-Saad, C., Newbury, H. J., Bale, J. S. & Pritchard, J. 2002.** Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot*, 53, 631-7.
- Dreyer, I. & Uozumi, N. 2011.** Potassium channels in plant cells. *FEBS J*, 278, 4293-303.
- Dunn, G., Hardie, D. G. & Manners, D. J. 1973.** Observations of the action of limit dextrinases on amylopectin-like polysaccharides. *Biochem J*, 133, 413-6.
- Ehlers, K. & van Bel, A. J. 2010.** Dynamics of plasmodesmal connectivity in successive interfaces of the cambial zone. *Planta*, 231, 371-85.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E. & Roitsch, T. 1997.** Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *Plant Cell*, 9, 1825-1841.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S. W., . . . Schmidt, U. G. 2006.** Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis mesophyll* cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol*, 141, 196-207.
- Eom, J. S., Cho, J. I., Reinders, A., Lee, S. W., Yoo, Y., Tuan, P. Q., . . . Jeon, J. S. 2011.** Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiol*, 157, 109-19.

- Fesce, R., Giovannardi, S., Binda, F., Bossi, E. & Peres, A. 2002.** The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1. *J Physiol*, 545, 739-50.
- Fisher, D. B. 1990.** Measurement of Phloem transport rates by an indicator-dilution technique. *Plant Physiol*, 94, 455-62.
- Fondy, B. R. & Geiger, D. R. 1977.** Sugar Selectivity and Other Characteristics of Phloem Loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol*, 59, 953-60.
- Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J. & Kaback, H. R. 1998.** Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J*, 12, 1281-99.
- Frommer, W. B., Hummel, S., Unseld, M. & Ninnemann, O. 1995.** Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 12036-40.
- Gahrtz, M., Stolz, J. & Sauer, N. 1994.** A phloem-specific sucrose-H<sup>+</sup> symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J*, 6, 697-706.
- Geibel, S., Kaplan, J. H., Bamberg, E. & Friedrich, T. 2003.** Conformational dynamics of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase probed by voltage clamp fluorometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 964-9.
- Geiger, D. R., Giaquinta, R. T., Sovonick, S. A. & Fellows, R. J. 1973.** Solute distribution in sugar beet leaves in relation to Phloem loading and translocation. *Plant Physiol*, 52, 585-9.
- Gerrits, N., Turk, S. C., van Dun, K. P., Hulleman, S. H., Visser, R. G., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. 2001.** Sucrose metabolism in plastids. *Plant Physiol*, 125, 926-34.
- Giaquinta, R. T. 1980.** Mechanism and control of phloem loading of sucrose. *Berichte d. Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 93, 187-201.
- Giaquinta, R. T. 1983.** Phloem Loading of Sucrose. *Annual Review of Plant Physiology*, 34: 347-387
- Gillespie, J.T. 1979.** The effect of repetitive stimulation on the passive electrical properties of the presynaptic terminal of the squid giant synapse *Proceedings of the Royal Society Lond B*, 206, 293-306.
- Golecki, B., Schulz, A. & Thompson, G. A. 1999.** Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell*, 11, 127-40.

- Gomez, G., Torres, H. & Pallas, V. 2005.** Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J*, 41, 107-16.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13979-84.
- Grennan, A. K. & Gragg, J. 2009.** How sweet it is: identification of vacuolar sucrose transporters. *Plant Physiol*, 150, 1109-10.
- Gundersen, C. B., Miledi, R. & Parker, I. 1983a.** Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 219, 103-9.
- Gundersen, C. B., Miledi, R. & Parker, I. 1983b.** Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 220, 131-40.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. & Marbaix, G. 1971.** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233, 177-82.
- Hafke, J. B., van Amerongen, J. K., Kelling, F., Furch, A. C., Gaupels, F. & van Bel, A. J. 2005.** Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant Physiol*, 138, 1527-37.
- Hahn, M. & Mendgen, K. 2001.** Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 322-7.
- Hahn, M.; Mendgen, K. 2001.** Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 322-327.
- Haritatos, E., Ayre, B. G. & Turgeon, R. 2000a.** Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiol*, 123, 929-37.
- Haritatos, E., Medville, R. & Turgeon, R. 2000b.** Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211, 105-11.
- Hartung, W., Radin, J. W. & Hendrix, D. L. 1988.** Abscisic Acid Movement into the Apoplastic solution of Water-Stressed Cotton Leaves: Role of Apoplastic pH. *Plant Physiol*, 86, 908-13.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L. & Hedges, S. B. 2001.** Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293, 1129-33.

- Hedrich, R., Neimanis, S., Savchenko, G., Felle, H. H., Kaiser, W. M. & Heber, U. 2001.** Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO<sub>2</sub>, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta*, 213, 594-601.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P. & Sonnewald, U. 1996a.** Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell*, 8, 793-803.
- Herbers, K., Meuwly, P., Metraux, J. P. & Sonnewald, U. 1996b.** Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett*, 397, 239-44.
- Hitz, W. D., Card, P. J. & Ripp, K. G. 1986.** Substrate recognition by a sucrose transporting protein. *J Biol Chem*, 261, 11986-91.
- Hoischen, C., Levin, J., Pitaknarongphorn, S., Reizer, J. & Saier, M. H., Jr. 1996.** Involvement of the central loop of the lactose permease of *Escherichia coli* in its allosteric regulation by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 178, 6082-6.
- Jaffe, L.A.; Hagiwara, S.; Kado, R.T. 1978.** The time course of cortical vesicle fusion in sea urchin eggs observed as membrane capacitance changes. *Developmental Biology*, 67, 243–248.
- Jamai, A., Chollet, J. F. & Delrot, S. 1994.** Proton-Peptide Co-Transport in Broad Bean Leaf Tissues. *Plant Physiol*, 106, 1023-1031.
- Jones, J. D. & Dangl, J. L. 2006.** The plant immune system. *Nature*, 444, 323-9.
- Kaback, H. R., Dunten, R., Frillingos, S., Venkatesan, P., Kwaw, I., Zhang, W. & Ermolova, N. 2007.** Site-directed alkylation and the alternating access model for LacY. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 491-4.
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., . . . Birren, B. W. 2006.** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444, 97-101.
- Kandler, O., Hopf, H. 1982.** Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides). *Encyclopedia of Plant Physiology* 13A, 348–383.
- Kehr, J. & Buhtz, A. 2008.** Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot*, 59, 85-92.
- Keller, F., Pharr, D.M. 1996.** *Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides.* , Marcel Dekker, New York.

- Kjolberg, O. & Manners, D. J. 1963.** Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. 9. The action of isoamylase on amylose. *Biochem J*, 86, 258-62.
- Knoblauch, M.; van Bel, A. J. E. 1998.** Sieve tubes in action. *The Plant cell*, 10, 35-55.
- Knop, C., Stadler, R., Sauer, N. & Lohaus, G. 2004.** AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiol*, 134, 204-14.
- Kocal, N., Sonnewald, U. & Sonnewald, S. 2008.** Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiol*, 148, 1523-36.
- Komor, E. & Tanner, W. 1971.** Characterization of the active hexose transport system of *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta*, 241, 170-9.
- Komor, E. & Tanner, W. 1974.** The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*. Specificity, stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake. *Eur J Biochem*, 44, 219-23.
- Komor, E. & Tanner, W. 1976.** The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport. *Eur J Biochem*, 70, 197-204.
- Kosegarten, H. U., Hoffmann, B. & Mengel, K. 1999.** Apoplastic pH and Fe(3+) reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol*, 121, 1069-80.
- Krugel, U., Veenhoff, L. M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., . . . Kuhn, C. 2008.** Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *Plant Cell*, 20, 2497-513.
- Kuhn, C., Franceschi, V. R., Schulz, A., Lemoine, R. & Frommer, W. B. 1997.** Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*, 275, 1298-300.
- Kuhn, C. & Grof, C. P. 2010.** Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, 13, 288-98.
- Kuhn, C., Hajirezaei, M. R., Fernie, A. R., Roessner-Tunali, U., Czechowski, T., Hirner, B. & Frommer, W. B. 2003.** The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol*, 131, 102-13.
- Law, C. J., Maloney, P. C. & Wang, D. N. 2008.** Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol*, 62, 289-305.

- Leisner, S. M. & Turgeon, R. 1993.** Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *Bioessays*, 15, 741-8.
- Lemoine, R. 2000.** Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta*, 1465, 246-62.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dedaldechamp, F., Allario, T., Pourtau, N., . . . Durand, M. 2013.** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci*, 4, 272.
- Li, Z. C. & Bush, D. R. 1990.** DeltapH-Dependent Amino Acid Transport into Plasma Membrane Vesicles Isolated from Sugar Beet Leaves: I. Evidence for Carrier-Mediated, Electrogenic Flux through Multiple Transport Systems. *Plant Physiol*, 94, 268-77.
- Lichtner, F. T., Lucas, W. J. & Spanswick, R. M. 1981.** Effect of Sulfhydryl Reagents on the Biophysical Properties of the Plasmalemma of *Chara corallina*. *Plant Physiol*, 68, 899-904.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. & Preiss, J. 1988a.** Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity. *Plant Physiol*, 86, 1131-5.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. R. & Preiss, J. 1988b.** A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant Physiol*, 88, 1175-81.
- Livingston, D. H. & Henson, C.A. 1998.** Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening.
- Lloyd, J. R., Kossmann, J. & Ritte, G. 2005.** Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci*, 10, 130-7.
- Lohaus, G., Hussmann, M., Pennewiss, K., Schneider, H., Zhu, J. J. & Sattelmacher, B. 2000.** Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J Exp Bot*, 51, 1721-32.
- Lohaus, G. & Moellers, C. 2000.** Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta*, 211, 833-40.
- Lohaus, Gertrud & Fischer, Karsten 2004. Intracellular And Intercellular Transport Of Nitrogen And Carbon  
Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. *In: FOYER, C. & NOCTOR, G. (eds.)*. Springer Netherlands.

- Loo, D. D., Hirayama, B. A., Gallardo, E. M., Lam, J. T., Turk, E. & Wright, E. M. 1998.** Conformational changes couple Na<sup>+</sup> and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7789-94.
- Lu, Y. & Sharkey, T. D. 2006.** The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ*, 29, 353-66.
- Lucas, W. J., Balachandran, S., Park, J. & Wolf, S. 1996.** Plasmodesmal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and phloem transport: insights gained from viral movement proteins. *J Exp Bot*, 47 Spec No, 1119-28.
- Ludewig, U., Neuhauser, B. & Dynowski, M. 2007.** Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Lett*, 581, 2301-8.
- Lunn, J. E. 2002.** Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol*, 128, 1490-500.
- M'Batchi, B. & Delrot, S. 1984.** Parachloromercuribenzenesulfonic Acid : a potential tool for differential labeling of the sucrose transporter. *Plant Physiol*, 75, 154-60.
- Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M. & Isacoff, E. Y. 1996.** Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*, 271, 213-6.
- Marger, M. D. & Saier, M. H., Jr. 1993.** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*, 18, 13-20.
- Mayer, A. M. 1989.** Plant-Fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. *Phytochemistry*, 28, pp. 311-317.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. & Browse, J. 1997.** Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5473-7.
- Mendgen, K. & Hahn, M. 2002.** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci*, 7, 352-6.
- Meyer, H.; Vitavska, O.; Wiczorek, H. 2011.** Identification of an animal sucrose transporter.
- Micallef, Barry J., Haskins, Kirk A., Vanderveer, Peter J., Roh, Kwang-Soo, Shewmaker, Christine K. & Sharkey, Thomas D. 1995.** Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. *Planta*, 196, 327-334.
- Miledi, R., Parker, I. & Sumikawa, K. 1983.** Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 218, 481-4.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- Münch, E. 1930.** Die Stoffbewegungen in der Pflanze. (*Fischer*).
- Neher, E. & Marty, A. 1982.** Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6712-6.
- Neher, E. & Sakmann, B. 1976.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- Neuhauser, B., Dynowski, M., Mayer, M. & Ludewig, U. 2007.** Regulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol*, 143, 1651-9.
- Norholm, M. H. 2010.** A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol*, 10, 21.
- Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Norholm, M. H., Jensen, J. K. & Halkier, B. A. 2006.** Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res*, 34, e122.
- Nurnberger, T. & Scheel, D. 2001.** Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, 6, 372-9.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. 1998.** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1-34.
- Park, J. Y., Canam, T., Kang, K. Y., Ellis, D. D. & Mansfield, S. D. 2008.** Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic Res*, 17, 181-92.
- Pate, J. S.; Gunning, B. E. S. 1969.** Vascular transfer cells in angiosperm leaves. Ataxonomic and morphological survey. *Protoplasma* 68, 135–156.
- Peters, W. S. & Felle, H. H. 1999.** The Correlation of Profiles of Surface pH and Elongation Growth in Maize Roots. *Plant Physiol*, 121, 905-912.
- Rae, A. L., Perroux, J. M. & Grof, C. P. 2005.** Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta*, 220, 817-25.
- Reidel, E. J., Rennie, E. A., Amiard, V., Cheng, L. & Turgeon, R. 2009.** Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol*, 149, 1601-8.

- Reinders, A., Sivitz, A. B., Hsi, A., Grof, C. P., Perroux, J. M. & Ward, J. M. 2006.** Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. *Plant Cell Environ*, 29, 1871-80.
- 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 Mol Biol*, 68, 289-99.
- Reinders, A., Sun, Y., Karvonen, K. L. & Ward, J. M. 2012.** Identification of amino acids important for substrate specificity in sucrose transporters using gene shuffling. *J Biol Chem*, 287, 30296-304.
- Rennie, E. A. & Turgeon, R. 2009.** A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14162-7.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. & Frommer, W. B. 1995.** NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 370, 264-8.
- Rhodes, J.D., Thain, J.F., Wildon, D.C. 1996.** The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant. *Planta*, 200, 50-57.
- Riens, B., Lohaus, G., Heineke, D. & Heldt, H. W. 1991.** Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol*, 97, 227-33.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. & Frommer, W. B. 1992.** Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*, 11, 4705-13.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. & Frommer, W. B. 1994.** Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J*, 13, 1-7.
- Roblin, G., Sakr, S., Bonmort, J. & Delrot, S. 1998.** Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Lett*, 424, 165-8.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A. K. 2003.** Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot*, 54, 513-24.
- Roitsch, T. & Gonzalez, M. C. 2004.** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci*, 9, 606-13.
- Rosti, S. & Denyer, K. 2007.** Two paralogous genes encoding small subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize, Bt2 and L2, replace the single alternatively spliced gene found in other cereal species. *J Mol Evol*, 65, 316-27.

- Rosti, S., Rudi, H., Rudi, K., Opsahl-Sorteberg, H. G., Fahy, B. & Denyer, K. 2006.** The gene encoding the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley endosperm also encodes the major plastidial small subunit in the leaves. *J Exp Bot*, 57, 3619-26.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B. & Lucas, W. J. 2001.** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 202-9.
- Russin, W. A., Evert, R. F., Vanderveer, P. J., Sharkey, T. D. & Briggs, S. P. 1996.** Modification of a Specific Class of Plasmodesmata and Loss of Sucrose Export Ability in the sucrose export defective1 Maize Mutant. *Plant Cell*, 8, 645-658.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. & Hunt, M. D. 1996.** Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Ryan, C. A. & Pearce, G. 1998.** Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 1-17.
- Sahin-Toth, M. & Kaback, H. R. 2000.** Functional conservation in the putative substrate binding site of the sucrose permease from Escherichia coli. *Biochemistry*, 39, 6170-5.
- Sahin-Toth, M., le Coutre, J., Kharabi, D., le Maire, G., Lee, J. C. & Kaback, H. R. 1999.** Characterization of Glu126 and Arg144, two residues that are indispensable for substrate binding in the lactose permease of Escherichia coli. *Biochemistry*, 38, 813-9.
- Saier, M. H., Jr. 1996.** Phylogenetic approaches to the identification and characterization of protein families and superfamilies. *Microb Comp Genomics*, 1, 129-50.
- Saier, M. H., Jr., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., . . . Virk, P. S. 1999.** The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1, 257-79.
- Saier, M. H., Jr., Tran, C. V. & Barabote, R. D. 2006.** TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res*, 34, D181-6.
- Salerno, G. L. & Curatti, L. 2003.** Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? *Trends Plant Sci*, 8, 63-9.
- Sanger, F.; Nickeln, S.; Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Sauer, N. 2007.** Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett*, 581, 2309-17.

- 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. *Plant J*, 6, 67-77.
- Schmitt, B.M.; Koepsell, H. 2002.** An Improved Method For Real-Time Monitoring of Membrane Capacitance in *Xenopus laevis* Oocytes. *Biophys J*, 82, 1345-1357.
- Schneider, S.; Hulpke, S.; Schulz, A., Hedrich, R.; Sauer, N. 2011.** Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., . . . Hedrich, R. 2011.** Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J*, 68, 129-36.
- Schussler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M. & Wipf, D. 2006.** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*, 444, 933-6.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., Johnson, M. E., Krentz, A. D., Grof, C. P., 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 Physiol*, 143, 188-98.
- Sivitz, A. B., Reinders, A. & Ward, J. M. 2005.** Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant Cell Physiol*, 46, 1666-73.
- Sjolund, R. D. 1997.** The Phloem Sieve Element: A River Runs through It. *Plant Cell*, 9, 1137-1146.
- Slewinski, T. L., Meeley, R. & Braun, D. M. 2009.** Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *J Exp Bot*, 60, 881-92.
- Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M. & Willmitzer, L. 1991.** Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J*, 1, 95-106.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G. & Krogh, A. 1998.** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 6, 175-82.
- Srivastava, A. C., Ganesan, S., Ismail, I. O. & Ayre, B. G. 2008.** Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 Sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol*, 148, 200-11.

- Stadler, R., Lauterbach, C. & Sauer, N. 2005a.** Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos. *Plant Physiol*, 139, 701-12.
- Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., . . . Sauer, N. 2005b.** Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J*, 41, 319-31.
- Stroher, E. & Dietz, K. J. 2008.** The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the Arabidopsis thaliana chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol Plant*, 133, 566-83.
- Sturm, A. & Tang, G. Q. 1999.** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci*, 4, 401-407.
- Sun, Y., Lin, Z., Reinders, A. & Ward, J. M. 2012.** Functionally important amino acids in rice sucrose transporter OsSUT1. *Biochemistry*, 51, 3284-91.
- Sun, Y., Reinders, A., LaFleur, K. R., Mori, T. & Ward, J. M. 2010.** Transport activity of rice sucrose transporters OsSUT1 and OsSUT5. *Plant Cell Physiol*, 51, 114-22.
- Szarka, A., Horemans, N., Passarella, S., Tarcsay, A., Orsi, F., Salgo, A. & Banhegyi, G. 2008.** Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Planta*, 228, 765-75.
- Sze, H., Li, X. & Palmgren, M. G. 1999.** Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, 11, 677-90.
- Talbot, N. J. 2010.** Living the sweet life: how does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *PLoS Biol*, 8, e1000308.
- Tetlow, I.J.; Farrar, J.F. 1993.** Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *J. Experimental Botany*, 44, 929-936
- Torres, M. A., Jones, J. D. & Dangl, J. L. 2006.** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*, 141, 373-8.
- Truernit, E. & Sauer, N. 1995.** The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, 196, 564-70.
- Tucker, S. L. & Talbot, N. J. 2001.** Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 39, 385-417.

- Turgeon, R. 2010.** The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiol*, 152, 1817-23.
- Turgeon, R. & Gowan, E. 1990.** Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiol*, 94, 1244-9.
- Turgeon, R. & Medville, R. 1998.** The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12055-60.
- Turgeon, R. & Wolf, S. 2009.** Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 207-21.
- Turgeon, R.; Beebe, D. U.; Gowan, E. 1993.** The intermediary cell: minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta Med*, 193, 446-456.
- Vadyvaloo, V., Smirnova, I. N., Kasho, V. N. & Kaback, H. R. 2006.** Conservation of residues involved in sugar/H(+) symport by the sucrose permease of *Escherichia coli* relative to lactose permease. *J Mol Biol*, 358, 1051-9.
- van Bel, A. J. 1993.** Strategies of phloem loading. *Plant Physiology* 44, 253–281.
- van Bel, A. J. 2003a.** The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, cell & environment* 26, 125-149.
- van Bel, A. J. 2003b.** Transport phloem: low profile, high impact. *Plant Physiol*, 131, 1509-10.
- van Bel, A. J. & Hess, P. H. 2008.** Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *J Exp Bot*, 59, 261-72.
- van Bel, A.J.; Gaupels, F. 2004.** Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Mol Plant Pathol*, 5, 495-504.
- van Kesteren, W. J., van der Schoot, C. & van Bel, A. J. 1988.** Symplastic Transfer of Fluorescent Dyes from Mesophyll to Sieve Tube in Stripped Leaf Tissue and Partly Isolated Minor Veins of *Commelina benghalensis*. *Plant Physiol*, 88, 667-70.
- Veenhoff, L. M., Heuberger, E. H. & Poolman, B. 2002.** Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem Sci*, 27, 242-9.
- Venkatesan, P., Liu, Z., Hu, Y. & Kaback, H. R. 2000.** Site-directed sulfhydryl labeling of the lactose permease of *Escherichia coli*: N-ethylmaleimide-sensitive face of helix II. *Biochemistry*, 39, 10649-55.
- von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U. & Willmitzer, L. 1990.** Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of

photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J*, 9, 3033-44.

**Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kamper, J. & Sauer, N. 2010.** A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol*, 8, e1000303.

**Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J. & Kehr, J. 2004.** Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*, 65, 1795-804.

**Webb, K. L. & Burley, J. W. 1962.** Sorbitol Translocation in Apple. *Science*, 137, 766.

**Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. & Wobus, U. 1997.** A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell*, 9, 895-908.

**Weber, H. & Roitsch, T. 2000.** Invertases and life beyond sucrose cleavage. *Trends Plant Sci*, 5, 47-8.

**Weise, A., Barker, L., Kuhn, 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. *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. *Plant J*, 21, 455-67.

**Wilkinson, S. 1999.** pH as a stress signal. *Plant Growth Regulation*, 29, 87-99.

**Wilkinson, S. & Davies, W. J. 1997.** Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast. *Plant Physiol*, 113, 559-573.

**Wind, J., Smeekens, S. & Hanson, J. 2010.** Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71, 1610-4.

**Winter, H., Lohaus, G. & Heldt, H. W. 1992.** Phloem Transport of Amino Acids in Relation to their Cytosolic Levels in Barley Leaves. *Plant Physiol*, 99, 996-1004.

**Wippel, K., Wittek, A., Hedrich, R. & Sauer, N. 2010.** Inverse pH regulation of plant and fungal sucrose transporters: a mechanism to regulate competition for sucrose at the host/pathogen interface? *PLoS One*, 5, e12429.

**Wormuth, D., Heiber, I., Shaikali, J., Kandlbinder, A., Baier, M. & Dietz, K. J. 2007.** Redox regulation and antioxidative defence in Arabidopsis leaves viewed from a systems biology perspective. *J Biotechnol*, 129, 229-48.

- Wright, K. M., Roberts, A. G., Martens, H. J., Sauer, N. & Oparka, K. J. 2003.** Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiol*, 131, 1555-65.
- Zhang, C. & Turgeon, R. 2009.** Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18849-54.
- Zhang, W., Hu, Y. & Kaback, H. R. 2003.** Site-directed sulfhydryl labeling of helix IX in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 42, 4904-8.
- Zhou, J., Theodoulou, F., Sauer, N., Sanders, D. & Miller, A. J. 1997.** A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol*, 159, 113-25.
- Zhou, Y., Qu, H., Dibley, K. E., Offler, C. E. & Patrick, J. W. 2007.** A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant J*, 49, 750-64.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Chemische Formel des Disaccharids Saccharose. ....	5
Abbildung 1.2: Transportweg eines SUC-Moleküls vom <i>Source</i> - zum <i>Sink</i> -Gewebe .....	6
Abbildung 1.3: Strategien zur Beladung des Phloems.....	13
Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher SUC-Transporter.....	21
Abbildung 1.5: Infektion von <i>Zea mays</i> durch <i>Ustilago maydis</i> .....	28
Abbildung 1.6: Schema der Pilz/Pflanze- Interaktionszone.....	31
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der DEVC-Technik .....	49
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung verschiedener Puls-Protokolle.....	52
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Kapazitäten-Protokolls .....	53
Abbildung 3.1: Ausschnitt eines Sequenzvergleichs von ZmSUT1 und UmSrt1 .....	63
Abbildung 3.2: Transporter-vermittelte Originalströme nach SUC-Zugabe .....	65
Abbildung 3.3: Stromantworten auf Einzelspannungspulse bei pH 5,5 .....	67
Abbildung 3.4: Bestimmung SUC-abhängiger Transportströme bei pH 5.5.....	68
Abbildung 3.5: SUC-abhängige Ströme von UmSRT1 bei pH 5,5 und pH 6,5 .....	69
Abbildung 3.6: Bestimmung der $K_m$ -Werte bei verschiedenen Spannungen.....	71
Abbildung 3.7: Vergleich der $K_m^S$ -Werte bei pH 5,5 .....	71
Abbildung 3.8: $K_m^S$ -Werte von UmSrt1 bei pH 5,5 und pH 6,5.....	73
Abbildung 3.9: SUC-induzierte Originalströme bei verschiedenen pH-Werten .....	75
Abbildung 3.10: Strom-Spannungskennlinien zur pH-Abhängigkeit .....	76
Abbildung 3.11: Vergleich der Transportaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten.....	77
Abbildung 3.12: $K_m^{H^+}$ -Werte von ZmSUT1 und UmSRT1 .....	79
Abbildung 3.13: Originalströme als Antwort auf Zugabe putativer Substrate.....	80
Abbildung 3.14: Vergleich der Substratspezifität von ZmSUT1 und UmSrt1 .....	81
Abbildung 3.15: Substratbindestellen von LacY und CsCb aus <i>E. coli</i> .....	82
Abbildung 3.16: 2-D Strukturmodell von ZmSUT1.....	83
Abbildung 3.17: 3-D Modell von ZmSUT1.....	84
Abbildung 3.18: Sequenzvergleich von vier SUC-Transportern aus Monokotylen.....	86
Abbildung 3.19: Messungen der $\Delta C_m$ in Abwesenheit von SUC.....	88
Abbildung 3.20: Messungen der $\Delta C_m$ bei verschiedenen $H^+$ -Konzentrationen .....	89

## Anhang

---

Abbildung 3.21: $\Delta C_m$ bei SUC-Zugabe und verschiedenen pH-Werten .....	90
Abbildung 3.22: $\Delta C_m$ von W51A bei SUC-Zugabe und verschiedenen pH-Werten .....	91
Abbildung 3.23: Vergleichende Analysen von ZmSUT1 WT, E362A und Y153W .....	93
Abbildung 3.24: Vergleichende Analysen von ZmSUT1 Y153A.....	95
Abbildung 3.25: Substratspezifität der Mutante ZmSUT1 Y153A .....	96
Abbildung 3.26: Bestimmung der $K_m^S$ -Werte der Mutanten Q48C, Q48F und R146A.....	97
Abbildung 3.27: $K_m^S$ -Werte von ZmSUT1 WT und Q48C, Q48F und R146A .....	98
Abbildung 3.28: Inhibierung des SUC-Transports von ZmSUT1 durch Sucralose.....	101
Abbildung 3.29: Einfluss Redox-aktiver Reagenzien auf die ZmSUT1-Transportaktivität .....	103

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Ansatz einer IVT-PCR mit Gesamtvolumen 50 $\mu$ l.....	38
Tabelle 2.2: PCR-Cycler Programm einer IVT-PCR .....	38
Tabelle 2.3: Standardansatz einer USER-Reaktion .....	40
Tabelle 2.4: Ansatz einer <i>in vitro</i> -Transkription nach AmpliCap-Max™ .....	44
Tabelle 3.1: Übersichtstabelle der $K_m^S$ -Werte .....	73
Tabelle 3.2: Vergleichende Übersicht der ausgewählten Mutationstellen.....	84
Tabelle 3.3: Übersicht der Ergebnisse der Mutanten W51A, D161A und WT.....	92
Tabelle 3.4: Ergebnisse der Mutanten E362A und Y153W im Vergleich zum WT.....	94
Tabelle 3.5: Übersicht über die Charakterisierung der Mutante Y153A .....	97
Tabelle 3.6: Übersicht der Ergebnisse der Mutanten Q48C/F, R146A und WT .....	99

### 7.4 Abkürzungsverzeichnis

3D / 2D	dreidimensional / zweidimensional
A	Ampere (Einheit des Stroms)
A	Alanin (Ala)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cystein (Cys)
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDS	kodierende Sequenz ( <i>coding sequence</i> )
cRNA	komplementäre RNA ( <i>complementary RNA</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
D	Aspartat (Asp)
Da	Dalton (Einheit der relativen Atom- und Molekülmasse)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVC	<i>double-electrode-voltage-clamp technik</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy Nucleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat (Glu)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

## Anhang

---

ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alteres ( <i>lat.: und andere</i> )
F	Farad (Einheit der Kapazität)
F	Phenylalanin (Phe)
Fruc	Fructose
fwd	Vorwärts ( <i>forward</i> )
g	Gramm (Einheit des Gewichts)
G	Glycin (Gly)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
Galac	Galactose
GFP	Green Fluorescent Protein
Gluc	Glucose
H	Histidin (His)
H <sup>+</sup>	Protonen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
I	Isoleucin (Ile)
Kan	Kanamycin
k	kilo (10 <sup>3</sup> )
K	Lysin (Lys)
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
L	Liter (Einheit des Volumens)
L	Leucin (Leu)
Lac	Lactose
LaCl <sub>3</sub>	Lanthanchlorid
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LED	Leuchtdiode ( <i>Light Emitting Diode</i> )
LSM	Laser Scanning Mikroskop
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )

## Anhang

---

M	Mol (Einheit der Stoffmenge)
M	Methionin (Met)
Mal	Maltose
Man	Mannose
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
min	Minute (Einheit der Zeit)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
mosmol/L	Milli-Osmol pro Liter (Einheit der Osmolarität)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
N	Asparagin (Asn)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
p	piko (10 <sup>-12</sup> )
P	Prolin (Pro)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPU's	Poren-Plasmodesmen-Einheiten ( <i>pore plasmodesm unit</i> )
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
rev	Rückwärts ( <i>reverse</i> )
RFO's	Raffinose-Familie-Oligosaccharide
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleinacid</i> )
RNase	Ribonuklease
®	Warenkennzeichen ( <i>restricted</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
S	Serin (Ser)
Sal	Salicin

## Anhang

---

sek	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Std.	Stunde (Einheit der Zeit)
SUC	Saccharose
Sucral	Sucralose
T	Threonin (Thr)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
™	Warenkennzeichen ( <i>Trade Mark</i> )
TM	Transmembrane
TENS	TE-NaOH-SDS-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt (Einheit der Spannung)
V	Valin V(al)
VCF	Spannungsklemm-Fluorometrie ( <i>voltage clamp fluorometry</i> )
W	Tryptophan (Trp)
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin (Tyr)

---

## 7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken, die neben mir am Entstehen und Gelingen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Gelegenheit, das Thema der vorliegenden Arbeit am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik in seiner Arbeitsgruppe untersuchen zu können sowie die fachliche Unterstützung und Anregung.

Herrn Prof. Dr. Hermann Koepsell für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Geiger für die Betreuung dieser Arbeit „mit Rat und Tat“. Danke auch für die bewiesene Geduld, Gelassenheit und Ausdauer beim Klären von Fragen und Zusammenhängen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die Erstellung der ZmSUT1 Struktur-Modelle.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Botanik I für die freundschaftliche Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und unterhaltsamen Mittagspausen. Spezieller Dank gilt „den Geigers“ für echten Teamgeist, tolle Gespräche und gemeinsame Aktionen und die große Hilfsbereitschaft, nicht nur in fachlichen Angelegenheiten.

Ein besonderer Dank „für Alles“ gilt meiner lieben Freundin Carmen, die hoffentlich auch weiterhin eine große und wichtige Rolle in meinem Leben spielen wird!

Ganz herzlichen Dank möchte ich mich meiner Familie aussprechen, die mir Vertrauen schenkt, an mich glaubt und mich während der ganzen Jahre in jedweder Hinsicht unterstützt und motiviert hat.

Lieber Andreas, danke für die Ruhe und den wichtigen Rückhalt im Hintergrund.

---

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

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

Ich habe die Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Fassung in anderen Prüfungsverfahren oder an anderen Fakultäten vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Titisee-Neustadt, den 21.November 2013

Anke Wittek