

**Die Nährstoffresorption in den Fallen
von *Dionaea muscipula* weist Parallelen zur Nährsalzaufnahme
in Wurzeln auf**



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

vorgelegt von
Jennifer Böhm
aus Fulda

Würzburg 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Dietrich

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Die Nährstoffresorption in den Fallen
von *Dionaea muscipula* weist Parallelen zur Nährsalzaufnahme
in Wurzeln auf**



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

vorgelegt von
Jennifer Böhm
aus Fulda

Würzburg 2015

Zusammenfassung

Die Venusfliegenfalle, *Dionaea muscipula*, weckte aufgrund ihrer karnivoren Lebensweise schon sehr früh das Interesse vieler Wissenschaftler. Die mit der Karnivorie einhergehenden hoch spezialisierten Eigenschaften ermöglichen dieser Pflanze Nährstoff-arme Habitats zu besiedeln und die benötigten Nährstoffe aus ihrer Beute zu beziehen. Die zu einer Klappfalle umgeformten Blätter dienen dem Beutefang. Mechanosensoren in Form von Triggerhaaren sowie eine große Anzahl von Drüsen kleiden das Falleninnere aus. Bei der Berührung der Triggerhaare durch ein Beutetier wird der mechanische Reiz in ein elektrisches Signal (Aktionspotential) übersetzt, welches sich über die gesamte Falle ausbreitet und letztendlich in einem schnellen Fallenschluss resultiert. Die anhaltende mechanische Stimulation durch das gefangene Insekt führt zur hermetischen Abriegelung der beiden Fallenspreiten, wodurch ein „externer Magen“ gebildet wird. Anschließend beginnt die Verdauung des Beutetiers mit der Sekretion von Verdauungssäften aus Drüsenkomplexen auf der Fallenseite. So wird das Beutetier in seine Bestandteile zersetzt. Interessanterweise dienen diese Drüsenzellen nicht nur zur Sekretion, sondern sind ebenfalls für die Nährstoffaufnahme verantwortlich.

Für karnivore Pflanzen, die auf Nährstoff-armen Böden wachsen, spielen Insekten als Beute und somit als Nährstofflieferant eine entscheidende Rolle. So können die Pflanzen durch die Verdauung der Beute mit wichtigen Makro- und Mikronährstoffen, wie Stickstoff, Phosphat, Kalium oder Natrium versorgt werden. Aus diesem Grund sollte im Rahmen meiner Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die molekularen Mechanismen der Kationenaufnahme während der Nährstoffresorption gerichtet werden. Insbesondere die aus dem Insekt stammenden Nährstoffe Kalium und Natrium waren dabei von großem Interesse.

Im Allgemeinen sind Kaliumionen für Pflanzen eine essentielle anorganische Substanz und von großer physiologischer Bedeutung für die Entwicklung, den Metabolismus, die Osmoregulation, das Membranpotential und viele zelluläre Prozesse. Analysen der Kaliumaufnahme an Wurzeln von Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und Reis zeigten, dass die Aufnahme von K^+ ein Zusammenspiel von hoch-affinen K^+ -Transportern der HAK5-Familie und nieder-affinen Kaliumkanälen (AKT1/AtKC1) erfordert, die in ein komplexes (De-)Phosphorylierungsnetzwerk eingebunden sind. In der vorliegenden Arbeit war es mir möglich das Netzwerk zur Kaliumaufnahme in den Drüsen der Venusfliegenfalle zu entschlüsseln. Es konnten Orthologe zum Kaliumtransporter HAK5 aus *Arabidopsis* (DmHAK5) und zum Kaliumkanal AKT1 (DmKT1) identifiziert und im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten elektrophysiologisch charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass DmKT1 durch einen Ca^{2+} -Sensor/Kinase-Komplex aus der CBL/CIPK-Familie phosphoryliert und somit aktiviert wird. Phylogenetische Analysen von DmKT1 bestätigten die Eingruppierung dieses Kaliumkanals in die Gruppe der pflanzlichen *Shaker*-

Kaliumkanäle des AKT1-Typs. Die Transporteigenschaften zeigten zudem, dass DmKT1 bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen aktiviert wird und einen K^+ -selektiven Einwärtsstrom vermittelt. In Oozyten konnte eine Kaliumaufnahme bis zu einer externen Konzentration von ≥ 1 mM beobachtet werden. DmKT1 repräsentiert also einen Kaliumkanal mit einer hohen Transportkapazität, der die nieder-affine Kaliumaufnahme in die Drüsenzellen der Venusfliegenfalle vermitteln kann.

Unterhalb einer externen Kaliumkonzentration von 1 mM würde der anliegende elektrochemische Kaliumgradient einen Kaliumausstrom und somit einen Verlust von Kalium favorisieren. Hoch-affine K^+/H^+ -Symporter können durch die Ausnutzung des Protonengradienten eine Kaliumaufnahme im mikromolaren Bereich gewährleisten. In Wurzelhaaren von *Arabidopsis* vermittelt der Transporter AtHAK5 die Kaliumaufnahme unter Kaliummangelbedingungen. DmHAK5, ein Ortholog zu AtHAK5, ist in *Dionaea* Drüsen exprimiert und konnte zum ersten Mal im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten im Detail charakterisiert werden. Interessanterweise zeigte sich, dass DmHAK5 wie der K^+ -Kanal DmKT1 durch denselben CBL/CIPK-Komplex posttranslational reguliert und aktiviert wird. Die Transporteigenschaften von DmHAK5 wiesen auf einen Transporter mit einer breiten Substratspezifität hin, sodass sich DmHAK5 neben Kalium auch für Ammonium permeabel zeigte. Affinitätsuntersuchungen von DmHAK5 zu seinem Substrat Kalium klassifizierten das Protein als einen hoch-affinen Kaliumtransporter, der im Symport mit Protonen die Kaliumaufnahme im mikromolaren Konzentrationsbereich vermitteln kann.

Das Kaliumtransportmodul besteht also aus dem K^+ -selektiven Kanal DmKT1 und dem K^+/H^+ -Symporter DmHAK5, die die hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahme in den Drüsenzellen während der Beuteverdauung in *Dionaea muscipula* Fallen ermöglichen. Beide Transportmodule werden Kalzium-abhängig durch die Kinase CIPK23 und den Ca^{2+} -Sensor CBL9 auf posttranslationaler Ebene reguliert.

Die Hämolymphe von Insekten enthält neben den für Pflanzen essentiellen Kaliumionen auch das für Pflanzen toxisch wirkende Natrium. Es stellte sich deshalb die Frage, wie die Venusfliegenfalle mit dem während der Beuteverdauung freigesetzten Natrium umgeht. Transkriptomdaten identifizierten im Fallengewebe den Natriumkanal DmHKT1 der TrK/Ktr/HKT1-Familie. Die phylogenetische Klassifizierung von DmHKT1 und die elektrophysiologischen Charakteristiken des Proteins gruppierten DmHKT1 in die Unterfamilie I der Na^+ -selektiven Kanäle ein. Des Weiteren weisen die Expression des Kanals in den Drüsen und seine Transporteigenschaften auf eine Beteiligung von DmHKT1 an der Natriumaufnahme während der Verdauungs- und Resorptionsphase im „externen Magen“ hin. Das aus dem Insekt stammende Natrium scheint in die Drüsenzellen aufgenommen und anschließend in die Vakuolen der Parenchymzellen verteilt zu werden. Somit zieht *Dionaea*

muscipula selbst aus der rückstandslosen Natriumaufnahme ihre Vorteile zur Aufrechterhaltung des osmotischen Potentials und des Turgors.

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit Einblicke in die Kationenaufnahme während der Nährstoffresorptionsphase der Venusfliegenfalle, *Dionaea muscipula*, zu gewinnen. Dabei wurde klar, dass *Dionaea muscipula* im Laufe ihrer Evolution zu einer karnivoren Pflanze, nicht neue Transportmodule zur Nährstoffresorption aus der Beute entwickelte, sondern bekannte aus Wurzeln stammende Transportmodule umfunktionierte. Auf molekularer Ebene konnten die biophysikalischen Charakteristika der K^+ - und Na^+ -Transportproteine, sowie ihre Regulation entschlüsselt werden. Diese Erkenntnisse wurden schließlich in den Kontext des Beutefangs der Venusfliegenfalle gebracht und diskutiert.

Summary

The Venus flytrap, *Dionaea muscipula*, is one of the most exciting carnivorous plants. Since the time of Charles Darwin, scientists are interested in the highly specialized mechanisms, which enable *Dionaea* plants to grow on nutrient-poor habitats. These *Dionaea* plants have the possibility to catch insects and to purchase the necessary nutrients from their prey. For catching the prey, the Venus flytrap evolved morphological adaptations in form of bilobed leaf traps. Trigger hairs are arranged inside the traps and by touching these mechano-sensory organs an electrical signal spreading over the lobes leads to the fast trap-closure. By continual mechanical stimulation of the trigger hairs by the caught insect, the edges of the lobes are sealed hermetically and an “external stomach” is formed. The prey digestion starts with the secretion of lytic enzymes from the glands. These glands, which are covering the inner surface of the trap-lobes, are also responsible for the nutrient-uptake.

Insects represent an important nutrient-provider for carnivorous plants. The capture of prey mainly contributes to the nutrient-supply like nitrogen, phosphorous, potassium and sodium. Within the scope of this work, my focus was on the molecular uptake mechanism of prey-derived cations, such as potassium and sodium.

Potassium is an essential macronutrient for plants in general. Studies on the K⁺ uptake systems in roots revealed a complex potassium uptake network consisting of high-affinity uptake carriers such as HAK5 and low-affinity potassium channels such as the AKT1/AtKC1 module. In glands of *Dionaea muscipula* a HAK5-like potassium transporter (DmHAK5) and an orthologue of AKT1 (DmKT1) were identified within the framework of my Ph.D.-thesis. Following the heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes, electrophysiological measurements revealed that DmKT1 is activated by phosphorylation through a Ca²⁺-sensor-protein kinase complex of the CBL/CIPK family. Its transport properties and structural homology to the *Arabidopsis* AKT1 K⁺ channel classified DmKT1 as a member of the hyperpolarisation-activated, inwardly rectifying plant *Shaker* potassium channel family. Due to the electrochemical gradient for K⁺ ions across the gland plasma membrane, the K⁺ selective channel DmKT1 can acquire external K⁺ down to concentrations of 1 mM. Thus, the peculiar electrophysiological properties assigned the low-affinity high-capacity potassium uptake system in *Dionaea* gland to DmKT1.

Below 1 mM, K⁺ fluxes reverse their direction and the plant would lose the essential macronutrient. In root hairs of *Arabidopsis* high-affinity transporters (HAK5) are expressed which are believed to facilitate K⁺ accumulation from potassium depleted soils. Interestingly an orthologue of HAK5 was shown to be expressed also in the trap lobes of *Dionaea*. Thus, DmHAK5 was cloned and for the first time a HAK5-like protein could be analysed in *Xenopus* oocytes. Interestingly, DmHAK5 K⁺/H⁺-co-transporter was post translationally activated by the

same CBL/CIPK complex just like the DmKT1 *Shaker* channel. Compared to DmKT1, DmHAK5 is of low selectivity and against all assumptions, the transporter is permeable for and not inhibited by NH_4^+ . A K_m value of 127 μM , describes DmHAK5 as a high-affinity transporter that is apparently the only system capable of operating at micromolar K^+ concentrations. To overcome the outward-directed chemical gradient at low external K^+ concentrations, DmHAK5 utilises the electrochemical gradient of protons and acts as a K^+/H^+ -co-transporter. The reported findings demonstrate the contribution of DmKT1 and DmHAK5 in the highly regulated potassium uptake network utilizing K^+ from captured insects. The high-capacity of DmKT1 and the high-affinity of DmHAK5 enable *Dionaea* glands to acquire potassium from high to very low levels during the digestion and resorption process.

Next to potassium, the haemolymph of captured insects contain sodium, a cation that is usually toxic for plant cells at higher concentrations. Therefore the question arose how *Dionaea* may cope with the prey-derived sodium. In search for the molecular mechanism how *Dionaea* may handle the prey-derived Na^+ , a TrK/Ktr/HKT-type protein, DmHKT1, was identified and electrophysiological characterised in *Xenopus* oocytes. The phylogenetic relationship to known TrK/Ktr/HKT-members and the transport properties of DmHKT1 classified the *Dionaea* sodium-selective channel as a member of the HKT subclass 1. The transport characteristics and the expression pattern of DmHKT1 indicated that sodium ions might be taken up by gland cells and later on distributed into the vacuoles of parenchyma cells. *Dionaea* seems to take advantage of the prey-derived sodium for maintaining its osmotic potential and turgor in the secreting gland cells.

Taken together, these studies elucidated the molecular origin and regulation of cation uptake during prey digestion and nutrient resorption of the Venus flytrap. For efficient potassium and sodium uptake into gland cells *Dionaea muscipula* co-opted root-derived transport modules and the associated regulatory components rather than inventing new uptake systems during its evolution to a carnivorous plant.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Karnivore Pflanzen.....	1
1.1.1 Phylogenie und konvergente Entwicklung von karnivoren Pflanzen.....	1
1.1.2 Ökologie von fleischfressenden Pflanzen	3
1.2 Die Venusfliegenfalle, <i>Dionaea muscipula</i>	5
1.2.1 Morphologie der Venusfliegenfalle.....	6
1.2.2 Erregbarkeit und Schließmechanismus der Klappfallen	8
1.2.3 Das Aktionspotential der <i>Dionaea muscipula</i>	11
1.2.4 Die Sekretion des Verdauungssaftes.....	12
1.2.5 Einfluss von chemischen Botenstoffen in die Prozesse des Beutefangs.....	15
1.2.6 Die Nährstoffaufnahme aus der Beute in den Fallen.....	17
1.3 Wurzelhaare sind für die Nährstoffresorption aus dem Boden verantwortlich.....	18
1.3.1 Funktionelle und strukturelle Vielfalt der pflanzlichen Kaliumtransportproteine ..	20
1.3.2 Hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahmesysteme in <i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzeln.....	22
1.4 Was passiert mit dem aus dem Insekt stammenden Natrium während des Verdauungsprozesses?	26
1.4.1 Pflanzen transportieren Natrium über HKTs	27
1.4.2 HKT1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
1.5 Zielsetzung	31
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 Isolierung von <i>Dionaea</i> mRNA und Generierung von cDNA.....	33
2.1.1 mRNA-Isolierung	33
2.1.2 Erst-Strang cDNA-Synthese	34
2.2 Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.2.1 RACE-PCR.....	37
2.2.2 Nested-RACE PCR.....	38
2.2.3 Amplifikation der kodierenden Sequenzen putativer Ionenkanäle	40
2.2.4 IVT-PCR.....	41
2.2.5 PCR zur gerichteten Mutagenese	42
2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.3.1 Durchführung und Analyse von DNA in Agarose-Gelen.....	43
2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	44
2.4.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	44
2.4.2 Aufreinigung einer PCR-Reaktion	44
2.5 Klonierungsverfahren	45

2.5.1 T/A-Klonierung.....	45
2.5.2 USER-Klonierung	46
2.5.3 Verwendete Vektoren zur USER-Klonierung	47
2.6 Molekularbiologische Methoden mit <i>E.coli</i>	48
2.6.1 Bakterien-Transformation durch Hitzeschock.....	48
2.6.2 Herstellung von Übernachtskulturen.....	49
2.6.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Bakterien	49
2.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	50
2.8 <i>In-vitro</i> Transkription	50
2.8.1 cRNA-Synthese	51
2.8.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	51
2.9 <i>Xenopus laevis</i> Oozyten als heterologes Expressionssystem	52
2.9.1 Gewinnung der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	53
2.9.2 Injektion von cRNA in die Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	53
2.10 Interaktionsstudien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.....	54
2.10.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	54
2.10.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	55
2.11 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik.....	55
2.11.1 Das Messprinzip	56
2.11.2 Der Messaufbau	57
2.11.3 Elektroden und Pipetten	57
2.11.4 Konventionen.....	58
2.11.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle	58
2.11.6 Messreihen und Messlösungen	60
2.12 Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse.....	62
2.12.1 Spannungsabhängigkeit	62
2.12.2 Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften eines Transportproteins mittels Umkehrpotentialen	64
2.12.3 Bestimmung der Kationen-abhängigen „cord conductance“	65
2.12.4 Der anormale Molfraktionseffekt, AMFE	67
2.12.5 Enzymkinetik – Die Michaelis-Menten-Theorie und die Bestimmung des K_m - Wertes.....	68
2.12.6 Q_{10} -Wert	69
3. ERGEBNISSE.....	71
3.1 Identifizierung und Klonierung von Transportproteinen der Venusfliegenfalle	71
3.1.1 Klonierung der Kationentransportproteine.....	71
3.2 Phylogenetische Einordnung der identifizierten putativen Kaliumtransportproteine ...	72
3.2.1 Eingruppierung von DmKT1 in die AKT1-Unterfamilie	72
3.2.2 Klassifizierung des Transporters DmHAK5 in die HAK/KUP/KT-Familie	74

3.3 Charakterisierung des Kaliumtransportmoduls DmKT1	76
3.3.1 Expressionsverhalten von DmKT1	76
3.3.2 Aktivierung des Kanals DmKT1	78
3.3.3 DmKT1, ein Spannungs-abhängiger Kaliumkanal.....	79
3.3.4 Der Einfluss von Protonen auf die Transporteigenschaften von DmKT1	82
3.3.5 K ⁺ -Konzentrationen im niederen mM Bereich lassen DmKT1 verstummen	84
3.4 Untersuchung der Transporteigenschaften von DmHAK5	88
3.4.1 Expressionsanalysen des <i>Dionaëa</i> Transporters DmHAK5	88
3.4.2 Ähnlich wie DmKT1 wird DmHAK5 durch den AtCBL9/AtCIPK23-Komplex aktiviert.....	89
3.4.3 DmHAK5 weist eine hohe Affinität zu Kaliumionen auf und besitzt ein breites Substratspektrum	91
3.4.4 DmHAK5 vermittelt keinen Na ⁺ -Transport, zeigt sich jedoch permeabel für NH ₄ ⁺	93
3.4.5 DmHAK5, ein K ⁺ /H ⁺ -gekoppelter Transport.....	95
3.5 Das Zusammenspiel von DmKT1 und DmHAK5	98
3.5.1 Biphasische K ⁺ -Aufnahme in Drüsenzellen wird vom DmKT1-DmHAK5 Kaliumtransportmodul bewerkstelligt	98
3.6 DmHKT1 repräsentiert ein Transportmodul zur Natriumaufnahme in <i>Dionaëa</i> Fallen	100
3.6.1 Aufnahme von Natrium in das Fallengewebe.....	100
3.6.2 Phylogenie und Expression von DmHKT1	101
3.6.3 DmHKT1 vermittelt Na ⁺ -abhängige Strom- und Membranspannungsantworten	103
3.6.4 DmHKT1 ist trotz seiner widersprüchlichen Namensgebung ein Kanal	106
3.6.5 Ein Glycin in der ersten Porendomäne führt zu einer Änderung der Selektivität	107
3.6.6 DmHKT1 S84A.....	110
3.6.7 Wird DmHKT1 posttranslational reguliert?	111
4. DISKUSSION	114
4.1 DmKT1 und DmHAK5 sind Repräsentanten des biphasischen Kaliumaufnahmesystems in <i>Dionaëa</i> Fallen.....	115
4.1.1 K ⁺ -Transportmodule in den Drüsen der Venusfliegenfalle unterliegen einer transkriptionalen und posttranslationalen Regulation.....	115
4.1.2 DmKT1 ist ein hoch-selektiver Kaliumkanal mit Spannungs- und pH- abhängigem Schaltverhalten	118
4.1.3 DmKT1 vermeidet einen Kaliumverlust bei geringen externen Kaliumkonzentrationen	120
4.1.4 DmHAK5 ist ein K ⁺ /H ⁺ -Kotransporter	121
4.1.5 Das hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahmesystem in den Drüsen der Venusfliegenfalle	125

4.2 Ein Fallen spezifischer Na ⁺ -Kanal ermöglicht die Bereitstellung des aus der Beute stammenden Natriums	126
4.2.1 DmHKT1 fungiert als Ionenkanal	127
4.2.2 Die erste Porendomäne bestimmt die Selektivität von DmHKT1	129
4.2.3 Ist DmHKT1 ebenfalls eine Komponente in einem regulatorischen Netzwerk?	132
4.3 Die Resorption von Nährsalzen in den Fallen von <i>Dionaea</i> zeigt Parallelen zur Wurzel vermittelten Nährstoffaufnahme	134
4.4 Die Nährstoffaufnahme im Zusammenhang mit dem Beutefang	135
6. LITERATURVERZEICHNIS	139
7. ANHANG	155
7.1 Anhang A: Auflistung der Genbank-Nummern der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Transportproteine	155
7.2 Anhang B: Sequenzvergleich der ersten Porendomäne verschiedener HKTs	159
7.3 Anhang C: Lösungen und Puffer	160
7.4 Anhang D: Primer	162
7.5 Anhang E: Abbildungsverzeichnis	164
7.6 Anhang F: Tabellenverzeichnis	166
7.7 Anhang G: Abkürzungsverzeichnis	167
8. LEBENSLAUF UND PUBLIKATIONSLISTE	169
8.1 Curriculum Vitae	169
8.2 Publikationsliste	171
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG UND DANKSAGUNG	172
9.1 Eidesstattliche Erklärung	172
9.2 Danksagung	173

1. Einleitung

1.1 Karnivore Pflanzen

Die Bedeutung des Wortes Karnivorie leitet sich vom lateinischen „carnivorus“ ab und findet seine Verwendung bei der Beschreibung einer fleischfressenden Lebensweise. Karnivore Pflanzen sind per Definition fleischfressende Pflanzen, die durch morphologische und physiologische Adaptionen in der Lage sind Beutetiere anzulocken, zu fangen, zu verdauen und die so gewonnenen Nährstoffe aufzunehmen und für ihren Stoffwechsel zur Verfügung zu stellen (Adamec, 1997). Givnish definierte, dass zur Beschreibung karnivorer Pflanzen zwei Bedingungen erfüllt werden müssen. Zum einen sollte die Pflanze in der Lage sein, Nährstoffe von toten Tieren zu resorbieren und diese für ihre eigene Fitness zu nutzen. Zum anderen sollten bestimmte morphologische Anpassungen vorhanden sein, dessen primäres Ziel die aktive Anlockung, das Fangen oder die Verdauung der Beute ist (Givnish et al., 1984).

1.1.1 Phylogenie und konvergente Entwicklung von karnivoren Pflanzen

Trotz einer Vielzahl an unterschiedlichen Definitionen zählen heute 583 Pflanzenarten zu den Karnivoren (Givnish, 2015), die sich innerhalb der Angiospermen mehrfach unabhängig voneinander entwickelten. Lange standen zwei Hypothesen zur Evolution und Diversifikation karnivore Pflanzen zur Disposition. Darwin führte die Spezialisierung von karnivoren Pflanzen auf die Konvergenz unabhängiger Ursprünge zurück (Darwin, 1875), wohingegen eine einmalige Entwicklung der Karnivorie innerhalb der Angiospermen ebenfalls diskutiert wurde (Croizat, 1960). Molekularbiologische Daten deuten heutzutage auf multiple, polyphyletische Ursprünge der fleischfressenden Pflanzen hin und unterstützen somit Darwins Hypothese (Ellison and Gotelli, 2001). Die fast 600 bekannten karnivoren Pflanzenarten finden sich in den vier Abstammungslinien der Angiospermen wieder (Abbildung 1-1) (Monokotyledonen, Kern-Eudikotyledonen, Rosiden und Asteriden) und gliedern sich in den Ordnungsklassen der Poales, Caryophyllales, Oxalidales, Ericales und Lamiales ein (Ellison and Gotelli, 2009; Givnish, 2015).

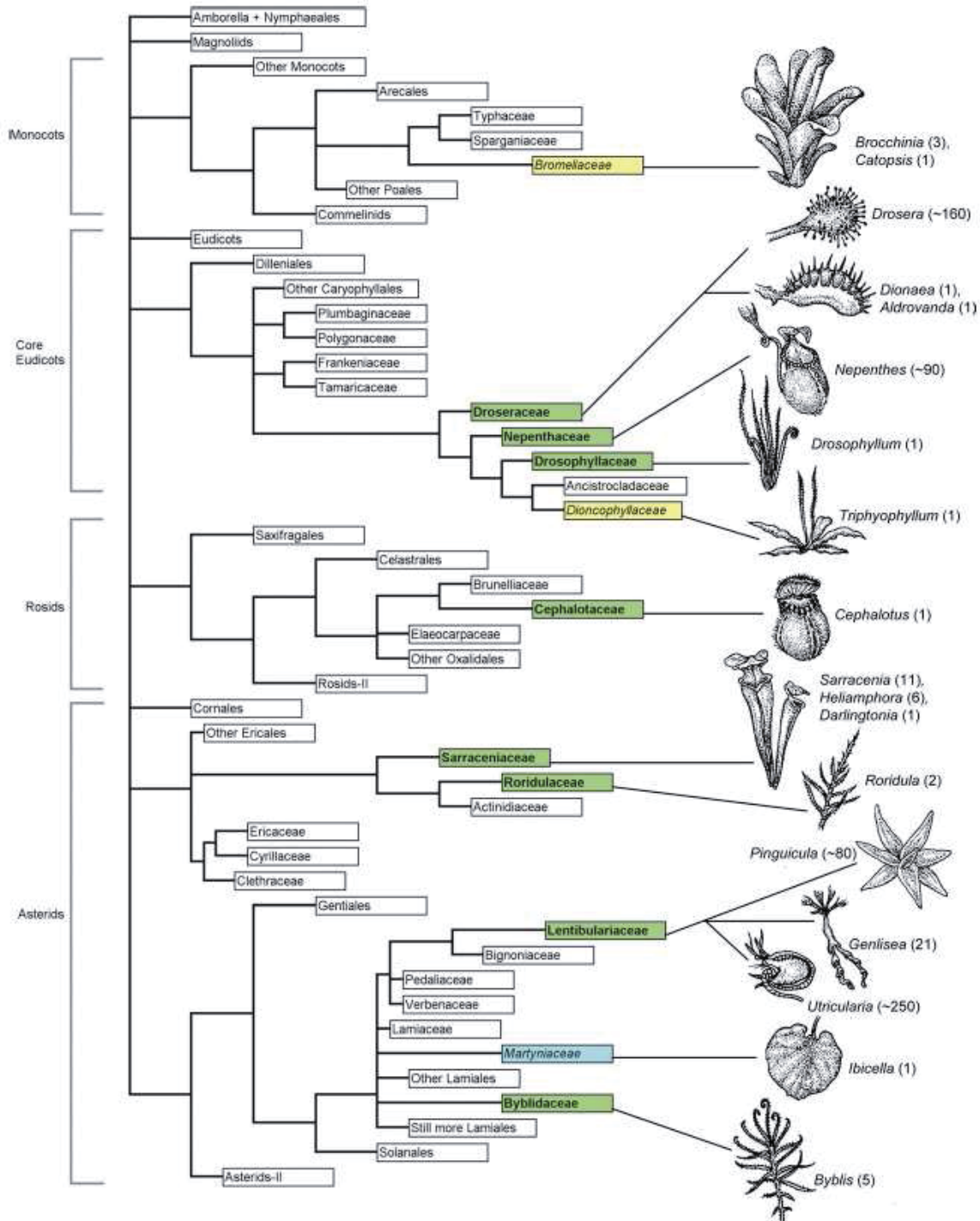


Abbildung 1-1: Phylogenetische Einordnung der karnivoren Pflanzenfamilien innerhalb der Angiospermen

Beziehungen der karnivoren Pflanzen innerhalb der Angiospermen-Phylogenie basierend auf morphologischen und molekulargenetischen Analysen. Familien, die karnivore Gattungen beinhalten, sind farbig hervorgehoben. Repräsentative Fallenarten sind hinter den entsprechenden Gattungen illustriert und die Anzahl der fleischfressenden Spezies innerhalb der Gattungen sind in Klammern angegeben. Die Zweiglängen verdeutlichen allein die Einordnung der Arten und haben keine Aussagekraft hinsichtlich des Grades der Verwandtschaft (Ellison and Gotelli, 2009).

Innerhalb der Ordnungsklassen, aber auch der Familien und Gattungen, kann durch Gen-Sequenz-Analysen zwischen konvergenter Entwicklung und Homologie aufgrund eines

gemeinsamen evolutionären Ursprungs unterschieden werden. Analysen, die auf Sequenzen des *trnK* Introns, der *matK* Gene, sowie Chloroplasten-spezifischer Gene und der nuklearen 18S rDNA basieren, zeigen einen Zusammenhang innerhalb der karnivoren Familien in den Caryophyllales. So konnten trotz unterschiedlichen Fallenarten die Schwesterfamilien Nepenthaceae, Droseraceae, Dionocophyllaceae und Droseraceae in eine monophyletische Gruppe mit einer gemeinsamen, vermutlich Klebefallen-besitzenden Ursprungspflanze, eingegliedert werden (Abbildung 1-1) (Heubl et al., 2006; Ellison and Gotelli, 2009). In der Ordnungsklasse der Lamiales entwickelte sich die Karnivorie ebenfalls mehrfach unabhängig. Dabei unterstützen genetische und morphologische Analysen die Monophylie der Lentibulariaceae (Cieslak et al., 2005), wohingegen andere Familien dieser Ordnung keine gemeinsame Abstammung mit den Lentibulariaceae aufweisen. Auch die verbleibenden dikotylen Familien (Roridulaceae, Sarraceniaceae und Cephalotaceae) weisen eine Konvergenz in der Fallenentwicklung auf und zeigen, dass komplexere Fallen ihren Ursprung in einfachen Klebefallen haben können (Ellison and Gotelli, 2009). Phylogenetische Analysen, basierend auf DNA Sequenzen, unterstützen die Konvergenz in der Entwicklung der Karnivorie, der unterschiedlichen Fallenarten und die Bezeichnung der karnivoren Pflanzen als polyphyletische Taxa. Jedoch sind immer noch Diskrepanzen zwischen der morphologischen und der auf genetischen Analysen basierenden Systematik zu finden, sodass weiterhin in der Systematik und Taxonomie der fleischfressenden Pflanzen Forschungsbedarf besteht.

1.1.2 Ökologie von fleischfressenden Pflanzen

Karnivore Pflanzenarten zeigen eine weltweite Verbreitung, wobei die Mehrheit der terrestrischen Arten in sonnigen, sumpfigen Feuchtgebieten bzw. Mooren auftreten. Es handelt sich dabei um meist feuchte, saure bis leicht basische und zum Teil anaerobe Böden. In diesen feuchten Gegenden kann die Zersetzung von organischem Material zu toxischen Substanzen, wie Schwefelwasserstoff, und zu einem niedrigen Redoxpotential führen. Dadurch können Metalle wie Eisen und Mangan reduziert vorliegen und somit in ihrer Löslichkeit beeinflusst und toxisch für Pflanzen werden. Aufgrund der beeinflussten Löslichkeit können manche Mikronährstoffe für Pflanzen nicht mehr zur Verfügung stehen (Adamec, 1997). Ein für Pflanzen ungünstiger ökologischer Faktor ist auch der niedrige Gehalt an Makronährstoffen. So konnte in den Mooren von North Carolina ein geringer bis kein verfügbarer Anteil an Ammonium, Phosphat, Kalium, Magnesium, Eisen, Nitrat, Kalzium und Mangan detektiert werden (Roberts and Oosting, 1958; Adamec, 1997). Für das karnivore Wurzelsystem stehen somit nur geringe Mengen an Nährstoffen zur Verfügung, wodurch man

die Karnivorie als eine Anpassungsstrategie an die vorherrschenden, nachteiligen Wachstumsbedingungen beschreiben kann.

Einer der wichtigsten Anpassungsmechanismen ist die Ausbildung von Fallen. Anstatt photosynthetisch aktive Blätter werden photosynthetisch ineffizientere Fallen ausgebildet, die spezialisierte Organe zum Beutefang, dessen Verdauung und zur Nährstoffresorption darstellen (Ellison and Gotelli, 2009). Das Anlocken der Beute, die Ausbildung von Fallen, die Sekretion von Verdauungsenzymen sowie die Aufnahme der Nährstoffe verbinden die karnivore Lebensweise mit energieaufwendigen Kosten. So ist es nicht verwunderlich, dass in Blättern, die sowohl zur Photosynthese als auch zur Nährstoffaufnahme dienen, bei terrestrischen karnivoren Pflanzen die netto Photosyntheserate und somit die relative Wachstumsrate verringert ist (Pavlovic et al., 2010; Krol et al., 2012). Aufgrund der mit der Karnivorie verbundenen Kosten sind manche Arten in der Lage zwischen karnivorer und nicht-karnivorer Lebensweise zu wechseln. Nährstofflimitierende Bedingungen oder die Wachstumsperiode der Pflanze lassen solche Pflanzen zur Karnivorie wechseln (Krol et al., 2012). Um den Zusammenhang der durch die Karnivorie erworbenen Vorteile und den Kosten für solch eine Lebensweise zu beurteilen, wird meist ein Kosten-Nutzen-Modell herangezogen (Givnish et al., 1984; Ellison and Gotelli, 2009; Ellison and Adamec, 2011; Givnish, 2015). Die Grundlage dieses Modells beruht darauf, dass die Kosten zur Ausübung der Karnivorie durch den Gewinn der Nährstoffe aus dem Beutetier kompensiert werden. Dies tritt ein, sobald die aus der Beute erhaltenden Mikro- und Makronährstoffe den photosynthetisch aktiven Organen und Prozessen zum Pflanzenwachstum zugeführt werden können (Ellison, 2006; Ellison and Gotelli, 2009). D.h nur in sonnigen, feuchten und Nährstoff-armen Gegenden sind karnivore Pflanzen gegenüber den nicht-karnivoren Pflanzen im Vorteil. Da dort die verfügbaren Nährstoffe und nicht das verfügbare Wasser oder Licht das Pflanzenwachstum limitieren und die Karnivorie die Photosynthese durch Umverteilung der Nährstoffe zusätzlich begünstigen kann (Givnish et al., 1984; Givnish, 2015).

Abhängig von der Art und Weise der Nährstoffaufnahme, über das Wurzelsystem oder über die Fallen, können karnivore Pflanzenarten in drei Gruppen unterschieden werden. So sind viele *Drosera* und *Pinguicula* Spezies in der Lage ihre Biomasse bzw. die Wachstumsrate durch Aufnahme der Nährstoffe über beide Organe zu erhöhen. Zudem wird die Aufnahmekapazität des Wurzelsystems durch die Nährstoffaufnahme der Fallen stimuliert. Sie treten im Vergleich zu anderen Arten vor allem in Gegenden auf, die über einen höheren Nährstoffgehalt im Boden verfügen. In der zweiten Gruppe führen beide Aufnahmesysteme, Wurzel und Falle, unabhängig voneinander zu einer erhöhten Wachstumsrate. Die dritte Gruppierung, zu der auch die Venusfliegenfalle zählt, wächst vor allem auf sehr mageren Böden. Ihr Wurzelsystem besitzt eine geringe Aufnahmekapazität und ihr Wachstum ist

abhängig von der Nährstoffaufnahme über die zu Fallen umgewandelten Blätter. Dies verdeutlicht auch das Verhältnis von Wurzel zu Spross, da die Wurzel von *Dionaea* nur 10 % der gesamten Biomasse ausmacht (Gao et al., 2015). Diese drei unterschiedlichen Konzepte zur Nährstoffaufnahme oder auch der Wechsel von karnivor zu nicht-karnivor (Krol et al., 2012) ermöglichen den Pflanzen auf die umgebenden ökologischen Bedingungen zu reagieren und somit ein effizientes Kosten-Nutzen-Verhältnis zu erzielen (Adamec, 1997).

Der Beutefang kann über zwei verschiedene Formen von Fangmechanismen, den passiven oder aktiven Fallen, stattfinden. Beide Fallenapparate sind abgeleitet von Blättern oder Blatteilen. Bei den passiven Fallen findet keine aktive Bewegung statt. Zum passiven Fangapparat zählen die Kannen-, Reusen- und Klebefallen. Die Kannen- und Reusenfallen sind gekennzeichnet durch konstitutive Enzym- und Verdauungssaftsekretion unabhängig vom Beutefang. Jedoch wird die Sekretion und Expression der Verdauungsenzyme nach dem Beutefang stimuliert und der Sekretausstoß wird erhöht (Owen et al., 1999; An et al., 2002; Krol et al., 2012). Im Gegensatz zu den passiven Fallen findet beim Fangmechanismus der aktiven Fallen eine Bewegung statt. Um diese zu synchronisieren wird ein mechanischer Stimulus in ein elektrisches Signal in Form eines Aktionspotentials übersetzt. Zu den aktiven Fangapparaten gehören die adhäsiven Klebefallen, dessen Tentakeln sich nach einer Stimulation durch die Beute zusammen winden. Saugfallen sind nur in der Gattung *Utricularia* zu finden und *Dionaea muscipula*, die Venusfliegenfalle, sowie *Aldrovanda vesiculosa*, die Wasserfalle, sind die einzigen Vertreter, die mit Hilfe von Klappfallen ihre Beute fangen (Krol et al., 2012).

1.2 Die Venusfliegenfalle, *Dionaea muscipula*

Die Venusfliegenfalle gliedert sich in die Familie der Sonnentaugewächse (*Droseraceae*) und in die Ordnung der Caryophyllales ein (Rivadavia et al., 2003; Ellison and Gotelli, 2009). Die Gattung *Dionaea* ist monotypisch, d.h. sie besitzt nur eine einzige Art, die Venusfliegenfalle (*Dionaea muscipula*). Sie ist neben *Aldrovanda* die einzige karnivore Pflanzenart, die aktiv mit Hilfe von Klappfallen ihre Beute fängt. Beide Arten zeigen zwar eine ähnliche Beutefangtechnik, jedoch ist *Aldrovanda* an das aquatische Leben in dystrophen Gewässern adaptiert (Adamec, 1995). Die terrestrische Spezies *Dionaea* hingegen ist auf mageren Böden in der Küstenebene der amerikanischen Bundesstaaten North Carolina und South Carolina verbreitet.

1.2.1 Morphologie der Venusfliegenfalle

Die Venusfliegenfalle ist eine krautartige, mehrjährige Pflanze mit einem wenig verzweigten, senkrecht wachsenden Rhizom. Die Primärwurzel stirbt nach der Keimung ab und die Wasserversorgung wird hauptsächlich von den Adventivwurzeln übernommen. Die oberirdischen Teile der Pflanzen bilden eine kleine Rosettenstaude, deren Blätter in der Nähe des Bodens positioniert sind. Die Blätter bestehen aus der herzförmigen Blattspreite, die über die Petiole gefaltet ist und an Oberseite sowie Unterseite Stomata besitzen. Dieser Blattteil trägt vor allem zur Photosynthese bei. Die obere Blattlamina ist zur aktiven Klappfalle modifiziert. Sie besteht aus zwei symmetrischen Spreitenhälften, die durch die Mittelrippe verbunden sind und im offenen Zustand leicht aufwärts gebogen vorliegen. Es sind leicht konvex oder konkav geformte Spreiten, deren Abschluss starre Filamente, die Zilien, bilden. Nach dem Schließen der Falle verhindern sie das Entkommen der Beute. Im Gegensatz zur Petiole befinden sich nur an der Unterseite der Fallenhälften Stomata. Die Falleninnenseite hingegen ist mit vielen Drüsen und meist sechs mechanosensorischen Triggerhaaren (meist drei Triggerhaare pro Spreitenhälfte) bestückt (Abbildung 1-2) (Barthlott et al., 2004; Bailey and McPherson, 2012).

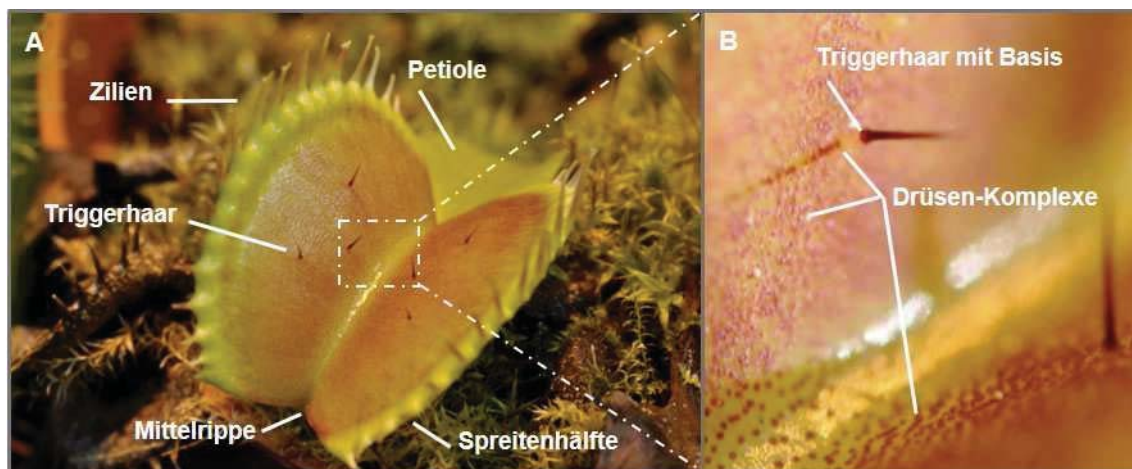


Abbildung 1-2: Klappfalle einer *Dionaea muscipula*

(A) Eine im Offenzustand befindliche Falle einer Venusfliegenfalle. Die einzelnen Fallenbestandteile sind gekennzeichnet. Das Rechteck verdeutlicht den in (B) dargestellten vergrößerten Ausschnitt. (B) Ein Triggerhaar mit der ausgewölbten Basis und die abundanten Drüsen an der Falleninnenseite sind zu erkennen.

Die extrafloralen Nektarien unterhalb der Zilien sondern Lockstoffe ab, die UV-reflektierende Substanzen beinhalten (Gibson and Waller, 2009). Dies und die in der Falleninnenseite befindlichen Anthocyanpigmente lassen den Fallenbereich für Insekten kontrastreich erscheinen und dienen somit zur visuellen Anlockung von Insekten. Die Sekretion von Nektar und die Ausscheidung von über 60 verschiedenen flüchtigen organischen Komponenten

(VOCs) mimikt den Geruch von Früchten und Blüten (Kreuzwieser et al., 2014). Zusammen mit den visuellen Reizen der Klappfalle erhöht dies die Attraktivität der Falle für ihre Beutetiere.

Allerdings ist die eigentliche Funktion der Drüsen die Sekretion des Verdauungssaftes und die Nährstoffaufnahme. Sie treten besonders stark um die Triggerhaare auf und verteilen sich über die komplette Spreitenfläche bis wenige Millimeter unterhalb der Zilien (Abbildung 1-2) (Bailey and McPherson, 2012; Krol et al., 2012). Die ungestielten Drüsen bestehen aus drei funktionell verschiedenen Zelltypen: den sekretorischen, den endodermalen und den basalen Zellen. Die sekretorischen Zellen bilden den terminalen Abschluss des Drüsenkomplexes und liegen über den auxiliären Zellschichten (endodermale und basale Zellen). Die endodermalen Zellen besitzen suberinisierte Zellwände, die eine Barriere für den apoplastischen Transport darstellen. Diese Endokutikula formt mit der epidermalen Kutikula einen kontinuierlichen Barrierekomplex. Die Zellschichten der endodermalen und der basalen Zellen sowie zwischen der basalen und den angrenzenden epidermalen Zellen sind durch Plasmodesmata verbunden (Robins and Juniper, 1980a; Krol et al., 2012). Die Zellwand der sekretorischen Zellen weist viele Einstülpungen auf, an denen die Plasmamembran anliegt. Durch diesen Labyrinth-ähnlichen Komplex ist die Oberfläche zur extrazellulären Umgebung deutlich erhöht. Plasmodesmata unterstützen den schnellen symplastischen Transport in die endodermale Zellschicht (Robins and Juniper, 1980a; Krol et al., 2012). Sie weisen eine Polarität in ihrer Verteilung von den äußeren zu den inneren Zellschichten auf und auch die Labyrinth-ähnliche Membranstruktur ist in ihrer Verteilung stark kontrolliert. Das Zytoplasma beinhaltet viele Mitochondrien, ein parallel angeordnetes erweitertes Endoplasmatisches Retikulum und Golgi Vesikel. Doch sind die sekretorischen Zellen vor allem durch ihre große Vakuole, die bis zu 50 % des Zellvolumens einnimmt, gekennzeichnet (Robins and Juniper, 1980a). Die in diesem Speicherorgan enthaltenden Substanzen könnten neben den Mitochondrien als Energielieferant während der Sekretion dienen oder auch ein Reservoir für Verdauungsenzyme und osmotisch aktive Salze darstellen (Schwab et al., 1969; Robins and Juniper, 1980a; Krol et al., 2012). Nach Stimulation der Drüsenkomplexe durch ein Beutetier ist die Kutikula schwach ausgeprägt und unterbrochen, wodurch die Sekretion des Verdauungssaftes und die Absorption der Nährstoffe erleichtert werden (Joel et al., 1983).

Zur Wahrnehmung eines Beutetiers sind meist drei Triggerhaare in einem Dreieck auf der Innenseite einer Spreitenhälfte angeordnet (Abbildung 1-2) (Bailey and McPherson, 2012). Durch Berührung dieser Mechanosensoren werden der Klappmechanismus und das Schließen der Falle stimuliert. Die Triggerhaare können in vier Segmente unterteilt werden. Das erste Segment ist die Basis, die aus parenchymatischen Zellen gebildet wird. Darüber

schließt sich die Gelenkzone an. Sie besteht aus Zentralzellen, die ringförmig von den sensorischen Zellen umgeben sind. Dieser Zone schließt sich ein Ring aus kleineren, schmalen Zellen an. Die vierte Zone und somit der Abschluss wird von Zellen, deren Zellwände verdickt und verhärtet sind, gebildet (Hensel, 1993).

Die sensorischen Zellen sind von besonderem Interesse, da die Reizaufnahme diesem Bereich zugeordnet wird. Im basalen und apikalen Pol dieser Zellen ist ein konzentrischer Komplex des Endoplasmatischen Retikulums zu finden, welches die Polyphenol beinhaltende Vakuole umgibt (Buchen et al., 1983). Die Zellwände sind durch eine große Anzahl an Plasmodesmata gekennzeichnet (Volkov et al., 2008). Haberlandt beschrieb, dass die Sensitivität der Triggerhaare auf kleine Auslenkungen der sensorischen Zellen zurückzuführen sei (Haberlandt, 1906). Von tierischen Mechanorezeptoren ist bekannt, dass ihre Zellen eine polare Organisation aufweisen. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass aufgrund der Polarität der sensorischen Zellen die Gelenkzone an der Wahrnehmung und Transduktion eines physikalischen Reizes beteiligt ist (Buchen et al., 1983; Hodick and Sievers, 1988).

1.2.2 Erregbarkeit und Schließmechanismus der Klappfallen

Die Hauptbeute der *Dionaea* besteht aus am Boden lebenden Insekten, deshalb sind die Klappfallen bodennah positioniert. Ameisen, Spinnentiere, verschiedene Käferarten und Heuschrecken machen den größten Anteil ihre Beute aus, wohingegen fliegende Insekten nur zu einem kleinen Anteil gefangen werden. Allerdings kann die Beuteart je nach Jahreszeit und Standort variieren (Gibson and Waller, 2009).

Betrifft ein Beutetier die Klappfalle, berührt es zwangsläufig die im Dreieck angeordneten Triggerhaare. Wenn zwei der sensorischen Organe oder eines zweimal in einer Zeitspanne von 20 s bis 25 s berührt werden, erfolgt das schnelle Schließen der Spreitenhälften (Hodick and Sievers, 1988; Escalante-Perez et al., 2011; Volkov et al., 2011). Der physikalische Reiz durch die Berührung der Triggerhaare führt zur Aktivierung von mechanosensitiven Ionenkanälen und somit zur Ausbildung eines Rezeptorpotentials. Handelt es sich dabei um ein Schwellen-überschreitendes Rezeptorpotential, wird eine Reizweiterleitung in Form von Aktionspotentialen in Gang gesetzt. Diese Aktionspotentiale verlaufen von der Basis des Triggerhaars über die komplette Spreitenhälfte. Die Weiterleitung findet wahrscheinlich über die zahlreichen Plasmodesmata der Blattspreiten bis zur Mittelrippe der Falle statt (Volkov et al., 2008). Zu dem konnten Hodick und Siervers nicht nur eine elektrische Erregbarkeit der sensorischen Zellen der Triggerhaare zeigen, sondern auch eine Reaktion der Epidermis- und Mesophyllzellen der Fallenspreiten auf Druck bzw. mechanische Reize in Form von Aktionspotentialen belegen (Hodick and Sievers, 1988).

Erfolgen zwei mechanische Stimuli, so führen die ausgelösten Aktionspotentiale zur schnellen Schließbewegung der Falle, indem die in den Spreitenhälften akkumulierte elastische Energie freigesetzt wird (Forterre et al., 2005; Escalante-Perez et al., 2011). Jedoch ist zu beachten, dass die elektrische Reizweiterleitung nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip verläuft. Es erfolgt kein Schließen der Fallen, wenn das ausgelöste Rezeptorpotential unterhalb des Schwellenwertes liegt und somit keine Aktionspotentiale ausgelöst werden. Wird allerdings der Schwellenwert erreicht und Rezeptor- sowie Aktionspotentiale ausgelöst, so steht die Geschwindigkeit des Schließens in keiner Relation zur Stärke des mechanischen Reizes (Volkov et al., 2007).

Der Mechanismus der dem schnellen Fallenschluss unterliegt, beruht auf einer elastischen Deformation der Spreitenhälften (Forterre et al., 2005; Escalante-Perez et al., 2014). Die Spreitenhälften liegen im offenen Zustand in einer konvexen Form und im geschlossenen Zustand in einer konkaven Krümmung vor (Darwin, 1875). Aufgrund der Geometrie ist im ungereizten, offenen Zustand eine hohe elastische Krümmungsenergie in der Falle gespeichert. Die offene Falle befindet sich in einem meta-stabilen Öffnungszustand. Die Krümmungsenergie wird nach der zweiten mechanischen Stimulation und der Auslösung von Aktionspotentialen freigesetzt. Somit startet der schnelle Fallenschluss nach 350 ms und ist innerhalb von 500 ms beendet (Escalante-Perez et al., 2014). Allerdings erlaubt die geometrische Restriktion der Fallenhälften bei der Energiefreisetzung nur die Bewegung in die konkave, geschlossene Form (Forterre et al., 2005; Forterre, 2013). Forterre beschreibt die Klappbewegung als eine aktive Änderung der Krümmungsenergie bzw. des meta-stabilen Zustands, welcher dem offenen Zustand entspricht (Forterre et al., 2005). Dieses Modell zeigt, dass die entlassene elastische Energie abhängig von geometrischen Parametern wie der Spreitengröße, der Spreitendicke und der Krümmung der Fallenhälften ist. Somit wird die Geschwindigkeit des Schließens durch die geometrischen Parameter beeinflusst (Forterre, 2013). Auch das Modell von Poppinga und Joyeux zum Fallenschluss unterstützt die Annahme, dass die Geschwindigkeit durch die Geometrie der Fallen verstärkt werden kann, und dass das meta-stabile Gleichgewicht der geöffneten Fallen eine entscheidende Rolle beim Klappmechanismus spielt (Poppinga and Joyeux, 2011). Der detaillierte Mechanismus, der dem Freisetzen der Krümmungsenergie und somit dem Aufheben der meta-stabilen Phase zugrunde liegt, steht bis heute noch zur Diskussion. In der Literatur finden sich zwei verschiedene Ansätze zur Erklärung. Williams und Bennett führten den Fallenschluss auf ein irreversibles, schnelles Wachstum der äußeren Seite der Fallenhälfte zurück, das auf Säure-induzierter Zellwandlockerung basiert (Williams and Bennett, 1982). Eine beliebtere Erklärung ist die der reversiblen, schnellen Änderung des Turgordrucks in den Zellschichten der Spreiten (Volkov et al., 2008). Dabei besteht die Spreitenhälfte aus zwei hydraulischen Zellschichten,

die einen unterschiedlichen hydrostatischen Druck, den Turgordruck, besitzen und somit im offenen Zustand eine gegeneinander gerichtete Spannung aufzeigen. Diese Spannung könnte die elastische Krümmungsenergie beschreiben und würde somit die treibende Kraft der Klappbewegung darstellen (Volkov et al., 2008; Volkov et al., 2011). Der mechanische Reiz führt zu einer Relaxation der Spannung durch einen Wasserfluss von der innen liegenden zur außen liegenden hydraulischen Zellschicht. Diesen Wasserfluss berücksichtigten auch Poppinga und Joyeux in ihrem Modell und kommen dadurch zu dem Schluss, dass man während den einzelnen Phasen des Fallenschlusses zwischen der sehr schnellen Änderung der Fallenkrümmung zu konkav und den im Vergleich langsameren Bewegungen durch Turgoränderungen unterscheiden muss (Poppinga and Joyeux, 2011). Des Weiteren ist anzunehmen, dass der Wasserfluss durch z.B. Aquaporine ermöglicht wird, wenn die Änderung des osmotischen Drucks der Zellschichten für den sehr schnellen Klappmechanismus verantwortlich ist. Es wird spekuliert, dass nach dem mechanischen Stimulus und dem Auslösen eines Aktionspotentials ATP hydrolysiert wird, es zu einem Protonentransport und dem Öffnen von Aquaporinen kommt. Dadurch werden beide Zellschichten miteinander verbunden und Wasser strömt von einer hydraulischen Zellschicht zur Anderen, wodurch sich ihr Turgordruck ändert (Hensel, 1993; Volkov et al., 2008). Letztendlich schließt die Falle.

Allerdings ist nach der initialen, schnellen Klappbewegung der Spreiten die Falle nicht vollständig geschlossen. Die Zilien der einzelnen Spreitenhälften liegen überlappend vor, wodurch größerer Beutetiere gefangen bleiben und Kleinere noch entkommen können. So kann eine Auswahl der Beute stattfinden und die anschließenden Mechanismen der Sekretion und der Resorption werden nur bei sich „lohnender“ Beutegröße eingeleitet. Bei dem Versuch des gefangenen Beutetiers zu entkommen, werden weiterhin die Triggerhaare stimuliert und weitere Aktionspotentiale werden ausgelöst. Durch diese andauernden mechanischen Reize erfolgt ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (Escalante-Perez et al., 2011). Die chemischen Reize in Form der erhöhten Kalziumkonzentration, aber auch in Form von Stickstoff-haltigen vom Beutetier stammenden Stoffen, wie Harnstoff, führen zusammen mit den mechanischen Stimuli zur hermetischen Abdichtung der Falle. Erst diese langsame, zweite Phase des Fallenschluss wird begleitet durch die Sekretion von lytischen Enzymen (Barthlott et al., 2004; Gibson and Waller, 2009; Escalante-Perez et al., 2011).

1.2.3 Das Aktionspotential der *Dionaea muscipula*

Aktionspotentiale spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und bei Bewegungen von Pflanzenorganen. Im Gegensatz zu chemischen Signalen, wie zum Beispiel Hormonen, sind elektrische Signale in der Lage Informationen schnell über eine größere Distanz weiterzuleiten. Aktionspotentiale im Allgemeinen gliedern sich in drei Phasen. Erfolgt ein Stimulus, so kommt es zu einer kurzen Depolarisation der Membran, dem Rezeptorpotential. Übertritt dieses einen gewissen Schwellenwert, so wird die Membran weiter depolarisiert, was zusammen Depolarisationsphase genannt wird. Nach Erreichen der maximalen Depolarisation schließt sich die Repolarisationsphase an. Die für ein Aktionspotential zugrunde liegenden Ionen in tierischen Axonen sind Natriumionen, die über Spannungs-aktivierte Natriumkanäle für einen Natriumeinstrom und damit für die Depolarisation sorgen, und Kaliumionen, die bei ihrem Ausstrom die Membran wieder zurück zum Ruhepotential führen. In Pflanzenzellen hingegen ist die Erregbarkeit von Kalzium-, Chlorid- und Kaliumionen abhängig (Fromm and Lautner, 2007).

Die elektrische Erregbarkeit und die Ausbildung von Aktionspotentialen wurden bereits in einigen Algen und in höheren Pflanzen dokumentiert (Hille, 2001). Die Depolarisation erfolgt bei Pflanzen von einem negativen Ruhepotential aus (-150 mV bis -230 mV in Pflanzen und Pilzen), das vor allem durch das Zusammenspiel der aktiven Extrusion von Protonen durch Protonen-ATPasen mit einer Kaliumleitfähigkeit der Membranen erzeugt wird. Verschiedene Ionen können an der Depolarisationsphase beteiligt sein. So handelt es sich bei *Mimosa pudica* um einen Chloridausstrom ins extrazelluläre Medium, wohingegen in *Aldrovanda vesiculosa* ein Kalziumeinstrom zur Depolarisation führt. Gut aufgeschlüsselte Aktionspotentialstudien liegen für die Grünalgen *Chara* und *Nitella* vor. Die Erregbarkeit ihrer Zellen beginnt mit einem Kalziumeinstrom durch Spannungs-aktivierte Kalziumkanäle. Die Depolarisationsphase wird durch den Ausstrom von Chloridionen bestimmt und die darauffolgende Repolarisation geht einher mit einem Kaliumausstrom über gleichrichtende Kaliumkanäle. Allerdings ist festzuhalten, dass die Permeabilitätsänderungen der pflanzlichen Membranen während eines Aktionspotentials für viele höhere Pflanzen (wie auch für die Venusfliegenfalle) noch weitestgehend ungeklärt sind und Hypothesen über einen Kalziumeinstrom, einem dadurch vermittelten Chloridausstrom und einem folgenden Kaliumausstrom weiterhin zur Diskussion stehen (Hille, 2001).

Wie zuvor erläutert, werden beim Fallenschluss der Venusfliegenfalle mechanische Reize in elektrische Signale, in Form eines Aktionspotentials, umgesetzt. Aufgrund der elektrischen Kopplung der verschiedenen Gewebszellen, ist das Ruhepotential einer *Dionaea* Falle vor allem durch die Kaliumleitfähigkeit der Membranen stabilisiert (Hodick and Sievers, 1988; Escalante-Perez et al., 2011). Je nach experimentellen Bedingungen liegt das Ruhepotential

der sensorischen, aber auch der Mesophyllzellen zwischen -130 mV und -160 mV (Hodick and Sievers, 1988; Hensel, 1993; Krol et al., 2006; Krol et al., 2012). Hodick und Sievers beschrieben 1986, dass die Amplitude der Aktionspotentiale abhängig von einem Kalziumeinstrom und somit von der extrazellulären Kalziumkonzentration ist (Hodick and Sievers, 1986). Jedoch war nicht klar, ob der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nur der Anfang einer Reihe von Ereignissen ist und somit als „second messenger“ in der Turgorregulation und dem Fallenschluss dient oder ob Kalzium selbst die über die Membran fließende elektrische Ladung während der Depolarisationsphase darstellt (Hodick and Sievers, 1986). Durch Experimente mit Chloridkanalblockern konnte ein Einfluss von Chloridionen während der Depolarisationsphase in *Dionaea* gezeigt werden (Krol et al., 2006). Zudem sind Kalzium-abhängige Anionenkanäle schon in anderen Organismen wie *Chara* charakterisiert und in ihrer Funktion hinsichtlich der Depolarisation während eines Aktionspotentials beschrieben worden (Fromm and Lautner, 2007). Somit kann vermutet werden, dass es sich bei der Depolarisationsphase eines Aktionspotentials um ein Zusammenspiel von Kalzium- und Chloridflüssen handelt. Die Kalzium-aktivierte und Zeit-abhängige Chloridleitfähigkeit führt zu einer transienten Depolarisation der Membranen der Venusfliegenfalle (Escalante-Perez et al., 2011). Kalzium strömt dabei entweder aus intrazellulären Speichern, wie zum Beispiel dem Endoplasmatischen Retikulum, oder aus dem Apoplasten in das Zytosol der Zelle. Die zweite Phase eines Aktionspotentials, die Repolarisation der Membran, wird einem Kaliumausstrom durch Spannungs-aktivierte gleichrichtende K^+ -Kanäle zugeschrieben, wie es auch bei der Grünalge *Chara* vermutet wird (Krol et al., 2006; Fromm and Lautner, 2007). Auch wenn das genaue Zusammenspiel von Kalzium-, Chlorid- und Kaliumionen bei der Erregbarkeit der Venusfliegenfalle noch nicht genau verstanden ist, ist es beachtlich, dass die Aktionspotentiale in *Dionaea muscipula* in einer Zeitspanne von 1 bis 2 Sekunden mit einer Transmissionsrate von 60-250 mm/s verlaufen, obwohl keine elektrische Leitbahnen, wie zum Beispiel Axone bei Tieren, vorhanden sind (Hodick and Sievers, 1988; Krol et al., 2012).

1.2.4 Die Sekretion des Verdauungssaftes

Nach dem mechanischen Stimulus eines Beutetiers und dem darauffolgenden Fallenschluss schließt sich die Sekretion des Verdauungssaftes an. Die dafür benötigten Drüsen sind multizelluläre Komplexe und kleiden die Falleninnenseite aus. Die Drüsen übernehmen drei Funktionen: 1. die Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, 2. die Freisetzung von Ionen zur Ansäuerung des „Magens“ der Venusfliegenfalle und 3. die Absorption der Verdauungsprodukte (Joel et al., 1983). Bereits Darwin (1875) beschrieb, dass die Sekretion erst nach einer Stimulation der Drüsen in Gang gesetzt wird (Darwin, 1875). Als Sekretions-

induzierende chemische Verbindungen aus der Beute spielen vor allem Stickstoff-haltige Substanzen eine wichtige Rolle. Effektive Auslöser (Elicitoren) der Sekretion sind die Harnsäure als Bestandteil des Insektenkots und die Aminosäure Glutamin aus der Insektenhämolymphe (Robins, 1976). Allerdings führen auch wiederholte elektrische oder mechanische Reize zur Sekretion, sodass viele hintereinander laufende Aktionspotentiale auch Elicitoren darstellen können (Krol et al., 2012). Diese mechano-elektrische Stimulation kann über eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration nach mehr als zwei Aktionspotentialen durch das sekretorische System der Drüsen wahrgenommen werden (Escalante-Perez et al., 2011). Nach Stimulation der Drüsen wird der Labyrinth-ähnliche Komplex der Plasmamembran der sekretorischen Zellen abgeschwächt und es findet eine Umbildung ihrer Kutikula zu einem diskontinuierlichen Verband statt. Dadurch wird die Permeabilität der Kutikula erhöht, sodass während des Vorgangs der Sekretion und der Resorption geladene sowie ungeladene Moleküle von kleinerem bis größerem Molekulargewicht die Kutikula passieren können. Zur Auflockerung der Kutikula werden zwei Modelle angenommen. Der Turgordruck der sekretorischen Zellen steigt und/oder die Zellwandplastizität erhöht sich durch Säure vermittelte Zellexpansion. Nach einer Stimulation der Sekretion kann ein Schwellen der Drüsen beobachtet werden, welches auf die Erhöhung des Turgordrucks zurückgeführt werden kann. Somit wird das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche deutlich erhöht.

Messungen des Verdauungssekrets haben eine starke Ansäuerung des „Mageninhalts“ während des Verdauungsprozesses gezeigt (Rea, 1982; Escalante-Perez et al., 2011). Durch Sekretionselicitoren wird ein Ausstrom von Protonen direkt nach der Stimulation eingeleitet, der vermutlich über ATP-abhängige Protonenpumpen vermittelt wird (Rea, 1983). Diese Ansäuerung spricht für eine Säure-induzierte Erhöhung der Zellwandplastizität und eine beschleunigte Zellexpansion der sekretorischen Drüsenzellen. Zudem zeigt sich 15 min nach der Sekretionsstimulation eine Akkumulation von Chloridionen in der äußeren Zellschicht. Diese werden noch vor der Sekretion der Verdauungsenzyme, in den Apoplasten entladen (Rea et al., 1983). Des Weiteren kann eine Akkumulation der Ionen in den Drüsenkomplexen zum Wasserfluss entlang des osmotischen Gradienten führen, wodurch der Turgordruck der sekretorischen Zellen steigt. Somit können beide Modelle für die Permeabilitätsänderung der Kutikula relevant sein und das saure Sekret, welches letztendlich die Aktivität der Verdauungsenzyme unterstützt, erklärt werden (Joel et al., 1983).

An den Sekretionsprozess schließt sich die Absonderung der Verdauungsenzyme an. Diese werden vor allem nach der Stimulation der Drüsenkomplexe synthetisiert. Die Stimulations-abhängige Synthese der Proteine wird zum einen durch Transkriptomdaten von sekretierenden Fallen und zum anderen durch die gesteigerte Aktivität der Dictyosomen des

Golgi-Apparats unterstützt. Dies spricht gegen die Annahme, dass zuvor produzierte und mit Proteinen gefüllte Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums involviert sind oder dass die vor dem Beutefang synthetisierten Proteine in den Vakuolen gespeichert und dann durch Abschnürungen der Vakuolen freigegeben werden (Robins and Juniper, 1980b; Henry and Steer, 1985; Schulze et al., 2012). Nach der Synthese der Verdauungsenzyme verläuft die Sekretion über den Golgi-Apparat und die Vesikel können durch Exozytose in das Fallenlumen, den „Magen“, abgegeben werden (Henry and Steer, 1985).

Transkriptom- und Sekretom-Analysen des Verdauungssekrets haben eine Vielzahl von Proteinklassen ergeben, die das gefangene Beutetier in dessen Bestandteile zerlegen und somit die Nährstoffe und Bausteine der Pflanze zur Verfügung stellen. So konnten Homologe zu Proteasen, Chitinasen, Peroxidasen, Nukleasen und Phosphatasen gefunden werden. Die allerdings am stärksten vertretende Proteinklasse im Sekret stellen die Cystein-Proteasen, mit Proteinen der Dionain-Familie, dar (Takahashi et al., 2011; Schulze et al., 2012). Diese können in die C1A-Unterfamilie mit dem bekanntesten Vertreter Papain gruppiert werden. Diese Proteasen liegen durch die vielen Cysteine und Disulfidbrücken kompakt und stabil vor und können durch potentielle Glykosylierungen am N-Terminus vor der vorherrschenden proteolytischen Degradation während des Verdauungsprozesses des Insekts geschützt sein. Abundant vertreten sind auch Serin-Carboxypeptidasen der pflanzlichen Serin-Carboxypeptidasen-Gruppe III und Aspartatproteasen mit Homologen zu Nepenthesin und Pepsin der Unterfamilien A1B und A1A. Diese drei Klassen der Proteasen weisen unterschiedliche pH-Optima auf. Somit können die einzelnen Enzyme im Verlauf der Verdauung und mit sinkendem pH ihre Maximalaktivität erreichen. Die im Sekret identifizierten Proteasen sind vor allem bei der Stickstoff-Freisetzung aus dem Beutetier involviert. Das Vorhandensein von Phosphatasen, Nukleasen und Phospholipasen deutet darauf hin, dass neben Stickstoff auch Phosphat der Pflanze aus dem Beutetier zur Verfügung gestellt wird. Chitinasen sind in der Lage das Exoskelett des Beutetiers aufzubrechen und können dem mikrobiellen Wachstum auf dem gefangenen Insekt vorbeugen und entgegenwirken. Die Oxidation der Beuteproteine durch die Fallen-Peroxidasen könnte den Verdauungsmechanismus erleichtern. Die Verdauung des Insekts ist ein Zusammenspiel vieler verschiedener Enzyme. Besonders interessant ist dabei, dass die Mehrzahl der identifizierten Proteine in ihrer Funktion ähnlich den der Pathogenabwehr zugeschriebenen Proteine sind. Diese sind ebenfalls insensitiv gegenüber einer sauren Umgebung und schützen sich vor proteolytischer Degradation. Dies lässt vermuten, dass karnivore Pflanzen zum Zweck der Verdauung die hydrolytischen Eigenschaften Pathogenese-assoziiierter Proteine nutzen, die aus anderen Pflanzen bereits bekannt sind (Schulze et al., 2012).

1.2.5 Einfluss von chemischen Botenstoffen in die Prozesse des Beutefangs

Wie schon zuvor beschrieben, werden durch Kosten-Nutzen-Modelle die Vor- und Nachteile der Karnivorie in Relation zueinander gesetzt. Ein wichtiger ökologischer Stressfaktor, dem Pflanzen ausgesetzt sind, ist der Wassermangel während Trockenperioden. Im Hinblick des Beutefangs bei der Venusfliegenfalle konnte gezeigt werden, dass unter Wasserstress der schnelle Schließmechanismus zum Fangen eines Beutetiers beeinträchtigt wird. Mechanische Stimuli führen zwar auch unter Trockenbedingungen zur Ausbildung von Aktionspotentialen, jedoch führen im Gegensatz zu gut gewässerten Venusfliegenfallen, hier zwei Aktionspotentiale nicht zum Fallenschluss. Die Falle scheint in ihrer Sensitivität gegenüber mechanischen Reizen restringiert zu sein, sodass unter Trockenstress mehr als drei Stimuli und Aktionspotentiale benötigt werden. Dieser Sensitivitätsverlust geht einher mit einem Anstieg des ABA-Gehalts innerhalb der Falle (Escalante-Perez et al., 2011). Das monocyclische Sesquiterpen Abszissinsäure (ABA) ist ein Phytohormon, welches bei Trockenstress synthetisiert wird und zum Beispiel über die Regulation von Anionenkanälen den Turgordruck der Schließzellen beeinflusst. Die ABA-abhängige Aktivierung von Anionenkanälen führt zum Schließen der Stomata und infolge dessen zu einer verringerten Transpiration (Roelfsema et al., 2004; Zhang et al., 2006). Beim Beuteverdau muss die Venusfliegenfalle einen enormen Wasseranteil investieren. Dies scheint unter Trockenstressbedingungen durch die Desensibilisierung der Fallen vermieden zu werden und somit ein effizienteres Nutzen des limitierenden Wassergehaltes zu ermöglichen. Es ist anzunehmen, dass der ABA-induzierte Sensitivitätsverlust der Fangorgane auf transkriptionalem Weg reguliert wird (Escalante-Perez et al., 2011).

In der Reaktion auf abiotische oder biotische Stressfaktoren spielen auch Jasmonate und ihre Derivate, wie Methyljasmonat, eine entscheidende Rolle. Sie führen zur Expression spezifischer Gene, die Mechanismen wie Blattfall, Seneszenz oder Tubersierung der Wurzeln auslösen. Zum Beispiel wird auch durch Expression von Abwehr-assoziierten Genen nach einem Pathogenbefall die Abwehrstrategie der Pflanze mit einer lokalen, aber auch einer systemischen Antwort über Jasmonate induziert. Sie entstehen aus freier Linolensäure und ihre Synthese erfolgt über das Intermediat 12-Oxophytodiensäure, dem OPDA, welches eigenständig und unabhängig vom Jasmonat-Signalweg ebenfalls eine Abwehrantwort der Pflanze stimulieren kann (Boland et al., 1995). Auch *Dionaea muscipula* nutzt die OPDA- oder Jasmonate-Signalwege beim Prozess Beutefang und während der Verdauung. Beim Fang eines Insektes werden Elicitoren aus dem Beutetier freigesetzt, die zur Stimulation der Drüsenkomplexe beitragen. Diese Stimulation könnte durch das Signalmolekül OPDA weitervermittelt werden. Dafür sprechen die Befunde, dass nach dem Fang ein Anstieg der OPDA-Konzentration in der Falle detektiert wurde, und dass künstlich appliziertes OPDA

sowie Jasmonat und seine Derivate zur Synthese und zur Exozytose von lytischen Enzymen führt. Bei exogener Gabe dieser Substanzen beginnt die Sekretion, obwohl die *Dionaea* Fallen zunächst im offenen Zustand verweilen. Das Proteinmuster des sekretierten Fluids entspricht dabei dem sekretierten Verdauungssaft nach einem erfolgreichen Beutefangs. Diese Signalmoleküle sind also in der Lage ein Beutetier nachzuahmen und so die Sekretion einzuleiten. Zudem wurden OPDA sowie Jasmonat und seinen Derivaten in der Venusfliegenfalle eine systemische Rolle zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass von einer im Verdauungsprozess befindlichen Falle ein Transport der Substanzen in die benachbarten Fallen stattfindet. Daraufhin zeigen diese im Offenzustand befindlichen Fallen eine erhöhte Sensitivität während der Sekretion und bei der mechanischen Stimulation. Der Schwellenwert für die Aktionspotentiale scheint verringert zu sein, sodass nicht unbedingt zwei mechanische Reize benötigt werden um den initialen schnellen Fallenschluss herbeizuführen. Somit wird nach dem Fang von nur einer Beute, die Nachbarfallen sozusagen in Alarmbereitschaft gesetzt um auf folgende Beutetiere schnell zu reagieren (Escalante-Perez et al., 2011).

Ähnliche Jasmonsäure-induzierte Reaktionen der Pflanzen verursacht das Phytotoxin Coronatin (COR), welches von einigen *Pseudomonas syringae*-Pathovaren freigesetzt wird. Es wird in seiner Funktion als ein Analogon zu einigen Jasmonaten beschrieben und wirkt stimulierend auf den Jasmonat-Signalweg (Boland et al., 1995; Brooks et al., 2005). Werden Venusfliegenfallen mit Coronatin behandelt, so bleibt ebenfalls der initiale schnelle Fallenschluss aus. Zunächst öffnen sich die Fallen maximal und die Drüsen beginnen mit der Sekretion des Verdauungssafts. Während des schon laufenden Sekretionsprozesses wird der langsame Fallenschluss eingeleitet und letztendlich der hermetisch abgeriegelte externe Magen gebildet. Dieser füllt sich weiterhin mit dem immer saurer werdenden Sekret. Auch das sekretierte Proteinmuster entspricht dem sekretierten Fluid, das unter natürlichen Bedingungen auftritt. Dieses Phytotoxin kann bei exogener Applikation den langsamen Fallenschluss, die Ausbildung des externen Magens und den Sekretions- sowie Verdauungsmechanismus einleiten und dadurch als artifizielle „Beute“ fungieren. Bei Analysen dieser Prozesse spielt das Werkzeug Coronatin eine wichtige Rolle, da unabhängige Studien erfolgen können und dabei keine Vermischung der Insektensubstanzen und den pflanzlichen Molekülen auftritt (Escalante-Perez et al., 2011).

1.2.6 Die Nährstoffaufnahme aus der Beute in den Fallen

Karnivore Pflanzen haben sich an das Leben in Nährstoff-armen Böden angepasst und sind durch ihre Lebensweise in der Lage benötigte Nährstoffe und Bausteine aus dem gefangenen Beutetier zu ziehen. Die Verdauungsphase der Venusfliegenfalle richtet sich vor allem nach der Größe des Beutetiers, sodass dieser Prozess sich in der Regel mehrere Tage hinzieht (Barthlott et al., 2004). Zwar geht die Sekretion des Verdauungssafts der Resorption der Nährstoffe voraus, jedoch finden beide Prozesse auch gleichzeitig statt und zeigen nicht nur den zeitlichen Aspekt als Gemeinsamkeit, sondern auch den Ort des Geschehens. Die Drüsenkomplexe an der Fallenninnenseite üben ihre Funktion sowohl bei der Sekretion als auch bei Resorption aus. Durch die Sekretion findet eine Aufspaltung des Insekts in seine einzelnen Bestandteile statt. Die Hämolymphe von Arthropoden zeigt eine Vielfalt von anorganischen Kationen und Anionen, organischem Stickstoff, Phosphat oder Kohlenstoff in Form von freien Aminosäuren, Peptiden, Kohlenhydraten, usw., die sich in ihrer genauen Menge je nach Art des Beutetieres unterscheiden (Punzo, 1989, 1990). Aufnahmestudien mit Hilfe von markiertem Insektenpulver in *Dionaea muscipula* Fallen belegen eine Resorption von organischem Stickstoff und Kohlenstoff (Schulze et al., 2001; Kruse et al., 2014). Rea 1983 zeigte eine Aufnahme von D-Alanin, die stark abhängig von vorausgehender Stimulation der Fallen durch Sekretionselicatoren war (Rea and Whatley, 1983). Somit wird nicht nur die Sekretion von lytischen Enzymen, sondern auch die Nährstoffaufnahme stimuliert und gesteuert. Über die molekulare Ebene der Resorption in der Venusfliegenfalle ist jedoch noch wenig bekannt.

Üblicherweise grenzt die Plasmamembran Zellen von ihrer Umwelt ab. Sie stellt somit eine Diffusionsbarriere dar, die bei der Nährstoffaufnahme überwunden werden muss. Durch membranständige Transportproteine kann sie zu einer selektiven Permeabilitätsschranke und somit für organische und anorganische Moleküle passierbar werden. Neben speziellen Transportern und Kanälen kann eine Aufnahme auch über Endozytose erfolgen. Die Kutikula weist kleine Brüche oder Poren auf, über welche die Aufnahme in den Apoplasten verlaufen kann. In vielen verschiedenen Pflanzenzellen, zum Beispiel den Zwiebelepidermiszellen oder auch Zellen der Rhizodermis, spielt die Endozytose zur Nährstoffaufnahme eine entscheidende Rolle. Auch in *Dionaea* kann die Nährstoffabsorption von größeren Molekülen aus dem Beutetier über Endozytose stattfinden. Um die aufgenommenen Moleküle für die Pflanze verfügbar zu machen, stellt die Fusion der Endozytose-Kompartimente mit Lysosomen einen wichtigen Punkt dar. Des Weiteren kann die Exozytose von lytischen Enzymen, Substanzen und Membranen durch später folgende Endozytose kompensiert werden. Die Endozytose stellt für die Pflanze einen Enzym-sparenden Mechanismus der Nährstoffaufnahme dar und kann die Resorption über Transporter oder Kanäle ergänzen

(Adlassnig et al., 2012). 2013 konnte die für einen Ammoniumtransporter, DmAMT1, codierende mRNA in Drüsen von *Dionaea* identifiziert und charakterisiert werden (Scherzer et al., 2013). Das Expressionsniveau von DmAMT1 steigt mit Stimulation der Sekretion. Weitere molekularbiologische und elektrophysiologische Studien zeigen, dass in den Drüsen der Venusfliegenfalle dieses Kanalprotein eine wichtige Rolle in der Stickstoffaufnahme aus dem Beutetier und somit im Stickstoffstoffwechsel der Fallen spielt (Scherzer et al., 2013). Homologe Ammoniumtransporter zu DmAMT1 aus anderen Pflanzenspezies sind in Wurzelzellen lokalisiert und als ein Schlüsselprotein in der NH_4^+ -Aufnahme bei den Wurzelsystemen beschrieben (Gazzarrini et al., 1999; Loque and von Wieren, 2004). Bei nicht-karnivoren Pflanzen findet die Nährstoffaufnahme aus dem Boden vor allem über die Wurzelhaare statt. Anstatt fallenspezifische Transportproteine für die Resorption der Nährstoffe aus dem Beutetier hervorzubringen, liegt die Vermutung nahe, dass karnivore Pflanzen Transportmodule aus der Wurzel in ihren Resorptionsgeweben exprimieren. Deshalb werde im Folgenden Mechanismen der Nährstoffresorption im Wurzelsystem aus *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzenspezies beschrieben, um einen Vergleich und eventuell auftretende Parallelen mit der Nährstoffresorption in *Dionaea* Fallen zu ziehen.

1.3 Wurzelhaare sind für die Nährstoffresorption aus dem Boden verantwortlich

Bei nicht-karnivoren Pflanzen sind die Zellen der Wurzelhaare von entscheidender Bedeutung für die Aufnahme von Makro- (K^+ , SO_4^{2-} , Pi, NH_4^+ , Ca^{2+} , usw.) und Mikronährstoffen (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) aus dem Boden. Aus diesem Grund dient dieses Gewebe gerne als Modell für Studien zur Entschlüsselung der molekularen Basis der Nährstoffabsorption. Physiologisch stellt die Nährstoffaufnahme ein komplexes System aus spezifischen Transportprozessen und/oder auch einer Überschneidung mehrerer Signal- oder Transportwegen dar. Um für eine ausreichende Nährstoffversorgung der Pflanze zu sorgen, haben sich verschiedene, weitestgehend Ionen- und Molekül-spezifische, Transportmodule entwickelt. Zum einen erlaubt die Regulation der Transportmodule den Aufbau von chemischen und elektrischen Gradienten und dient auch dazu diese zu bewahren. Zum anderen wird dadurch auf die intrazelluläre Molekül- und Ionenkonzentration und auf den damit verbundenen elektrochemischen Gradienten über der Membran Einfluss genommen. Die treibende Kraft für die Aufnahme der meisten Nährstoffe ist der elektrochemische Gradient, der über die Plasmamembranen der einzelnen Zellen anliegt. Einen großen Anteil am Aufbau und Erhalt des elektrochemischen Protonengradienten haben P-Typ H^+ -ATPasen, über welche die Ionenaufnahme via Sekundärtransportsysteme gesteuert und energetisiert werden kann

(Gilroy and Jones, 2000; Shen et al., 2006). Neben Symport-Mechanismen werden aber auch einige Nährstoffe über Uniportsysteme in die Zellen transportiert. Phosphor und Schwefel werden als Anionen in Form von Phosphat (Pi) und Sulfat transportiert. Einige Vertreter der Phosphattransporter-Familie (PHTs) sind unter Pi-Mangel induziert und kodieren einen hoch-affinen Symport von Pi und Protonen. Hoch-affine Sulfattransporter (SULTRs) vermitteln die Aufnahme von SO_4^{2-} , wohingegen nieder-affine SULTRs bei dem Langstecken-Transport eine Rolle spielen. Tritt SO_4^{2-} in die Schwefelassimilation der Pflanze ein, erfolgt eine Reduktion zu Sulfiden, welches bei der Cystein- und Glutathion-Biosynthese verwendet wird (Gilroy and Jones, 2000; Cui, 2012). Der für organische Moleküle wie Aminosäuren und Nukleinsäuren benötigte Stickstoff wird in Form von Ammonium oder Nitrat aufgenommen. Für diese Aufnahme haben sich zwei distinkte Transportsysteme, die Ammoniumtransporter (AMTs) und Nitrattransporter (NRTs), entwickelt (Gilroy and Jones, 2000). Am Beispiel der Stickstoffaufnahme kann beobachtet werden, dass sich innerhalb der Aufnahmesysteme in der Wurzel zwei Transportprozesse mit unterschiedlichen Kinetiken wiederfinden. Unter sehr geringer externer Ionenkonzentration ($1 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$) kommt die Aufnahme über hoch-affine Transportsysteme (HATS) zum Tragen. Das konstitutive System (cHATS) ist aktiv ohne vorhergehender Stimulation durch Stickstoff, wohingegen das induzierbare System (iHATS) durch extrazellulären Stickstoff angeregt wird. Beide HATS zeigen eine in Sättigung-gehende Transportaktivität, welche sich durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben lässt. Liegen hohe externe Ionenkonzentrationen vor, so übernehmen vor allem die nieder-affinen Transportsysteme (LATS) die Absorption. Ihre Beteiligung an der Stickstoffaufnahme tritt vor allem signifikant ab einer Konzentration von 1mM in Erscheinung und ihre Transportaktivität weist ein weitestgehend lineares Verhalten auf (Bassirad, 2000; Miller et al., 2007). Zu den hier beschriebenen HATS gruppiert sich auch der Ammoniumtransporter 1 aus *Arabidopsis thaliana* (AtAMT1;1) ein. Dieser ist für die Ammoniumaufnahme aus dem Boden unter geringen externen NH_4^+ -Konzentrationen zuständig (Yuan et al., 2007). Wie schon erwähnt, konnte in *Dionaea*-Fallen ein homologes Protein, DmAMT1, identifiziert und funktionell als hoch-affiner Ammoniumtransporter aus dem Beutetier beschrieben werden (Scherzer et al., 2013). Dies ist ein Beispiel für die Parallelen zwischen der Nährstoffresorption an Wurzelhaaren und ihrer Aufnahme in die Klappfallen der Venusfliegenfallen. Da ich mich in dieser Arbeit im speziellen mit dem Kationentransport in *Dionaea muscipula* befasst habe, möchte ich im Weiteren kurz auf die Kationenaufnahmesysteme an *Arabidopsis*-Wurzeln und auf die verantwortlichen Proteine eingehen. Membranproteine im Allgemeinen sind für bestimmte Ionen permeabel, wodurch eine selektive Diffusion ermöglicht wird. Bei Ionen ist die treibende Kraft der elektrochemische Gradient, der sich aus dem transmembranen elektrischen Potentialgradienten (der Membranspannung) und dem chemischen Gradienten

zusammensetzt. Dabei kann die Membranspannung den chemischen Gradienten kompensieren. Somit kann sogar eine Ionenaufnahme stattfinden, wenn der Ionenkonzentrationsgradient nach außen zeigt.

1.3.1 Funktionelle und strukturelle Vielfalt der pflanzlichen Kaliumtransportproteine

Kaliumionen sind für Pflanzen eine essentielle anorganische Substanz und von großer physiologischer Bedeutung für die Entwicklung, den Metabolismus und ihren zellulären Prozessen, wie z.B. der Aktivierung von Enzymen und der Stabilisierung der Proteinbiosynthese. In osmotischen bzw. Turgor-gesteuerten Vorgängen spielt Kalium eine Schlüsselrolle und ist maßgeblich an der Stomabewegung, der nastischen Blattbewegung und dem Streckungswachstum beteiligt. Des Weiteren wird das Membranpotential der Zellen im Zusammenspiel von Kalium und der Protonen-motorischen Kraft, resultierend aus der Aktivität von H⁺-ATPasen, eingestellt. Die Aufrechterhaltung dieses dynamischen Gleichgewichts ist maßgeblich von der Kaliumaufnahme/-versorgung und den beteiligten Transportsystemen abhängig (Sharma et al., 2013). In Pflanzen liegt eine zytosolische Kaliumkonzentration von 100 bis 200 mM vor, wohingegen unter naturnahen Bedingungen im Boden nur 10 bis 100 µM auftreten (Schroeder et al., 1994). Eine Kaliumaufnahme muss somit gegen einen mehr als 1000-fachen Konzentrationsgradienten erfolgen, was einen komplexen K⁺-Aufnahmekonzept voraussetzt. Diese Tatsache erklärt auch die große Varianz an Kaliumtransportproteinen in Pflanzen. In *Arabidopsis* unterscheidet man Kaliumtransportproteine, die zum einen Kanäle (*Shaker*, TPK und K_{ir}-ähnlich) und zum anderen Transporter (engl. carrier) (HAK/KUP/KT, HKT und CPA) umfassen (Gomez-Porras et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass mindestens ein Vertreter jeder Genfamilien bei der Kaliumaufnahme aus dem Boden beteiligt ist.

Kaliumkanäle der Shaker-Familie

Die Namensgebung der *Shaker*-Kanäle beruht auf den ersten identifizierten Kaliumkanal aus *Drosophila melanogaster* (Tempel et al., 1987). *Drosophila* Verlustmutanten des Spannungs-abhängigen Kaliumkanals zeichneten sich durch heftiges Zittern nach einer Ether Narkose aus, woraus sich der Name „*Shaker*-Kaliumkanäle“ ableitete. Pflanzliche wie tierische *Shaker*-Kanäle setzen sich aus vier α-Untereinheiten zusammen. Jeder Untereinheit besteht aus sechs Transmembranen (S1-S6) und einer hoch konservierten Porenregion zwischen den Domänen S5 und S6. (Uozumi et al., 1998). Im Zytosol der Zelle befinden sich sowohl der N- als auch der C-Terminus. Neben Homotetrameren assemblieren auch unterschiedliche α-

Untereinheiten aus verschiedenen Unterfamilien der *Shaker*-Kanäle zu funktionellen Heterotetrameren. So kann es zu einer hohen Diversität und Flexibilität der Kanalklasse kommen (Dreyer et al., 1997; Sharma et al., 2013). Die Pore entsteht beim Assemblieren von vier α -Untereinheiten und stellt den hydrophilen Permeationsweg für Kaliumionen durch die hydrophobe Membran dar. Die Kaliumselektivität lässt sich auf das universelle Motiv TXGYGD/E zurückführen (Becker et al., 1996; Lebaudy et al., 2007; Sharma et al., 2013). Beim Betreten des Selektivitätsfilters streift das Kaliumion seine Hydrathülle ab. Dabei ersetzen die Carbonylsauerstoffe des universellen Motivs die Wassermoleküle der Hydrathülle. Somit kann unter geringer Energieaufwendung der Selektivitätsfilter vom Kaliumion passiert werden (Doyle et al., 1998). Jede Kanaluntereinheit ist durch ein S4-Segment mit ungewöhnlich vielen positiv geladenen Aminosäuren charakterisiert, die im Zusammenspiel mit den Transmembranen S1 bis S3 den Kanal-intrinsischen Spannungssensor bilden (Marten and Hoshi, 1998). Der C-Terminus beinhaltet verschiedene regulatorische Elemente, wie zum Beispiel die Ankyrin-ähnliche Domäne oder die Bindestelle für die sekundären Botenstoffmoleküle (cAMP und cGMP) (Gambale and Uozumi, 2006). Zudem dient der C-Terminus vor allem der Multimerisierung der Untereinheiten (Marten and Hoshi, 1998). Aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften und ihrer Struktur lassen sich die Spannungs-aktivierten pflanzlichen *Shaker*-Kanäle in drei Unterfamilien gruppieren. Findet eine Aktivierung der Kanäle unter depolarisierenden Spannungen statt, so erfolgt ein auswärtsgerichteter Kaliumfluss, was die Mitglieder der Unterfamilie der Auswärtsgleichrichter (K_{out}) kennzeichnet. Eine weitere Unterfamilie weist Kaliumkanäle mit einer schwachen Spannungsabhängigkeit auf, die somit einen Kaliumstrom als auch einen K^+ -Ausstrom vermitteln können (K_{weak}). Neben diesen beiden Familien gruppiert sich eine Familie der Einwärtsgleichrichter (K_{in}). Diese Kanäle öffnen sich bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen. Ein Vertreter der K_{in} -Kanäle aus *A. thaliana*, AKT1, ist als eine Komponente beim Kaliumaufnahmesystem in Wurzelhaaren beschrieben (Sharma et al., 2013).

Kationen-gekoppelte Transporter der HAK/KUP/KT Familie

Kaliumtransporter, die sich in der HAK/KUP/KT-Familie eingliedern, zählen zu den hoch-affinen Kaliumtransportmodulen. Es handelt sich um eine große Familie, die Mitglieder in Bakterien, Archaeen, Pilzen und Pflanzen aufweist. Durch Hydropathie-Analysen lässt sich eine Topologie mit 12 putativen transmembranen Domänen und einem langen hydrophilen C-Terminus vermuten. Phylogenetische Studien führen zu einer Eingruppierung der Transporter in sechs verschiedene Unterfamilien. Gruppe V und VI sind spezifisch für HAK/KUP/KT-ähnliche Transportergene aus *Physcomitrella patens* und stellen somit Spezies-

spezifische Untergruppen dar (Gomez-Porras et al., 2012). Dabei ist Gruppe I, zu der auch der zur Kaliumaufnahme dienende HAK5 Transporter aus *A. thaliana* zählt, die wohl am besten charakterisierte Gruppe (Gomez-Porras et al., 2012). Als Transportmechanismus wird ein K^+/H^+ -Symport vermutet und als treibende Kraft soll vor allem die Protonen-motorische Kraft dienen. Für einen vakuolären Vertreter der Gruppe II konnte unter Kaliummangel ein K^+/H^+ -Symport mit einer Stöchiometrie von 1:1 gezeigt werden (Grabov, 2007).

1.3.2 Hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahmesysteme in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln

Die Kaliumaufnahme aus dem Boden ist ein komplexes, gut organisiertes und reguliertes System, das ein breites Spektrum an Ionenkonzentrationen abdeckt. Die hauptverantwortlichen Transportproteine sind der *Shaker*-Kanal AKT1 und der Transporter AtHAK5. Unter geringen Kaliumkonzentrationen wird die AtHAK5 Expression in der Epidermis der Haupt- und Lateralwurzel induziert (Grabov, 2007). Auch der Kanal AKT1 findet sich im peripheren Wurzelgewebe wieder und beide Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert (Lebaudy et al., 2007). Liegt eine externe Kaliumkonzentration unter 0,01 mM vor, so wird die Aufnahme nur vom Transporter AtHAK5 übernommen. In einem Bereich von 0,01 bis 0,05 mM können beide Transportproteine die Kaliumaufnahme vermitteln. Jedoch unter höheren Konzentrationen im Boden trägt vor allem der Kanal AKT1 zur K^+ -Resorption bei (Sharma et al., 2013). Diese beiden Transportproteine ermöglichen eine hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahme aus dem Boden.

Die nieder-affine Kaliumresorption an der Wurzel wird durch AKT1 und AtKC1 vermittelt

AKT1 zählt zu der Untergruppe der K^+ -Einwärtgleichrichtern (K_{in}) der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle. Diese aktivieren unter hyperpolarisierenden Membranspannungen. Durch das Spannungs-abhängige Öffnen wird ein Kaliumstrom ermöglicht sobald das Membranpotential negativer als das Umkehrpotential für Kalium liegt. Dabei werden die Spannungsabhängigkeit und die Gleichrichtung von dem Protein selbst vermittelt (Hedrich et al., 1995b; Sharma et al., 2013). Des Weiteren zeigen die Kanäle dieser Unterfamilie bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration eine Verschiebung des Spannungs-abhängigen Öffnens zu positiveren Membranpotentialen und somit eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit bei einer gegebenen Spannung. Diese Sensitivität gegenüber extrazellulären Protonen führt zu einem verstärkten Kaliumstrom in die Zelle. An einem KAT1-homologen Vertreter der K_{in} -Kanäle aus der Kartoffel, KST1, konnten zwei Histidine identifiziert werden, die auf die „Säureaktivierung“ Einfluss nehmen (Hoth et al., 1997).

Um die Kaliumaufnahme über AKT1 zu steuern, ist das Protein selbst ein Ziel in einem regulatorischen Netzwerk aus Kinasen, Phosphatasen und Kalziumsensoren. Unter Kaliummangelbedingungen können Pflanzen Mechanismen und Signalwege initiieren um ihre Kapazität zur Kaliumaufnahme zu erhöhen. So folgt unter diesen Bedingungen eine Erhöhung der Produktion von Wasserstoffperoxid. Dies führt zum einen zu einer Änderung der Expressionsrate von hoch-affinen Transportproteinen (Shin and Schachtman, 2004) und zum anderen zu einer Erhöhung der freien Kalziumkonzentration im Zytosol der Zellen (Foreman et al., 2003; Li et al., 2006). Es wird vermutet, dass Kaliummangel über "Sensoren/Rezeptoren" wahrgenommen wird und damit zu einer Aktivierung von Kalzium-permeablen Kanälen und somit zu einem Kalziumeinstrom in die Pflanzenzelle führt (Hedrich and Kudla, 2006). Es ist bekannt, dass unter verschiedenen abiotischen Stressfaktoren Kalzium als „second messenger“ dient und von Pflanzen-spezifischen Calcineurin B-ähnliche Kalziumsensoren (CBL) wahrgenommen wird. CBLs besitzen vier EF-Hand-Motive (Kalzium-Bindedomänen), über die eine Kalziumbindung erfolgt. Einige CBLs, darunter auch CBL1 und CBL9, besitzen Myristylierungs- und/oder Palmethylierungsstellen am N-Terminus, die für eine Membranassoziation sorgen können (Batistic and Kudla, 2004). CBLs interagieren spezifisch mit Serin/Threonin Proteinkinasen der CIPK-Familie (CBL-interagierende Proteinkinasen). Diese besitzen eine N-terminale konservierte Kinasedomäne und im regulatorischen C-Terminus findet sich die NAF-Domäne, die in der spezifischen Interaktion von individuellen CBLs mit bestimmten CIPKs ausschlaggebend ist.

Viele Transportproteine sind Phosphorylierungsziele der CBL/CIPK-Komplexe und für eine Interaktion der Sensor/Kinase-Komplexe mit ihren Zielproteinen ist vor allem ein überlappendes Expressionsmuster entscheidend. Ein bislang gut untersuchtes regulatorisches Netzwerk findet sich im SOS (engl. Salt Overly Sensitive) Signalweg wieder. Hierbei interagiert der Ca^{2+} -Sensor AtCBL4 (SOS3) und die Kinase AtCIPK24 (SOS2) mit dem Na^+/H^+ -Antiporter (SOS1). Die Phosphorylierung von SOS1 durch den CBL/CIPK-Komplex aktiviert den Antiporter. Dieser auf zellulärer Ebene wirkende Signalweg dient vermutlich zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase bei Salzstress (Qiu et al., 2002; Ji et al., 2013). Im Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass zwei CBLs, AtCBL1 und AtCBL9, mit der Proteinkinase AtCIPK23 wechselwirken. Dieser Komplex aus einem Kalziumsensor und der Proteinkinase ist in der Lage den K^+ -Kanal AKT1 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten sind alle Komponenten (AKT1/AtCBL1-CBL9/AtCIPK23) von Nöten um den Kanal funktionell zu exprimieren (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Neben einer Aktivierung von AKT1 durch AtCBL1-CBL9/AtCIPK23 kann das Binden der 2C-typ Proteinphosphatase, AIP1, den Kanal dephosphorylieren und somit inaktivieren (Lee et al., 2007). Neben der Regulation durch Kinasen und Phosphatasen werden die elektrischen

Eigenschaften von AKT1 durch Heteromerisierung mit der α -Untereinheit AtKC1 bestimmt. AtKC1 ist ein Mitglied der pflanzlichen *Shaker*-Familie, vermittelt aber als Homotetramer keine makroskopischen Kaliumströme im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten. AtKC1 ist vielmehr eine stille Untereinheit, die mit anderen Untereinheiten der K_{in} -Kanalfamilie Heterotetramere bilden kann und somit auf die Kanalaktivität Einfluss nimmt (Dreyer et al., 1997). Assemblieren zum Beispiel Untereinheiten von AtKC1 und AKT1, so wird die Aktivierungsschwelle des Heteromers zu negativeren Membranpotentialen im Vergleich zum AKT1 Homomer verschoben (Duby et al., 2008). Geiger et al. 2009 untersuchte den Effekt von AtKC1 auf AKT1 vermittelte Kaliumströme unter Kaliummangelbedingungen. Während AKT1 Homomere bei niedrigen externen Kaliumkonzentrationen einen K^+ -Efflux zu ließen, verschob AtKC1 die Spannungsabhängigkeit des Heteromers zu negativeren Spannungen, sodass ein Kaliumausstrom verhindert werden konnte. Zusätzlich scheint die Stabilität der Pore im AKT1-AtKC1-Komplex deutlich stärker von der extrazellulären Kaliumkonzentration abzuhängen. Liegt extern eine geringe Kaliumkonzentration vor, so wird die Pore von Kaliumkanälen instabil und „fällt in sich zusammen“ (Zhou et al., 2001). Durch die Bildung der AKT1-AtKC1-Heteromere wird die Pore bei höheren externen Kaliumkonzentrationen instabil im Vergleich zu AKT1-Homomeren (Geiger et al., 2009). Beide Effekte von AtKC1, der Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit und auf die Stabilität der Pore, verhindern den Kaliumausstrom, der bei AKT1-Homotetrameren beobachtet wurde.

HAK5 Transporter vermitteln die hoch-affine Aufnahme von Kalium in die Wurzel

Für die hoch-affine Kaliumaufnahme aus dem Boden sind Transporter der HAK/KUP/KT-Familie verantwortlich. In *Arabidopsis* konnte unter Kaliummangel eine Erhöhung der AtHAK5-Expression und die damit verbundene verstärkte Lokalisation des Transporters in der Plasmamembran gezeigt werden (Ahn et al., 2004; Qi et al., 2008). Jedoch konnten die Transportcharakteristika bislang nur *in planta* an Mutantenlinien und mit Hilfe von Hefekomplementations-Studien untersucht werden. Somit ist bis heute keine detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung der HAK-Transporter vorhanden. Nichts desto trotz konnte mit Hilfe dieser Studien der hoch-affine Kaliumtransport den HAK-Proteinen zugeschrieben werden. *athak5* Mutanten sind in ihrer hoch-affinen Kaliumresorption eingeschränkt und weisen ein reduziertes Wurzelwachstum unter geringen Kaliumkonzentrationen auf (Qi et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2010). HAK-Transporter sind in der Lage Kalium unter einer Konzentration von 10 μ M entgegen des chemischen Gradienten zu transportieren (Rubio et al., 2014). Ihre Transportkinetik ist durch einen sehr geringen K_m -Wert charakterisiert. So fehlt in *athak5* Mutanten ein induzierbares, hoch-affines Kaliumaufnahmesystem mit einem K_m von 15-24 μ M (Gierth et al., 2005). Zudem wurde

gezeigt, dass HAK-Transporter nicht strikt selektiv für Kaliumionen sind, sondern auch Rubidium oder Cäsium hoch-affin transportieren (Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006). Da bei *Arabidopsis*-Pflanzen, die unter Kaliummangel aufwachsen, eine Inhibierung der Cs^+ Aufnahme durch Ammonium verursacht wurde, legte dies eine Inhibierung des AtHAK5 vermittelten Cäsiumtransports durch Ammonium auf den AtHAK5 nahe. In Hefe konnte die Inhibierung des Transporters durch Ammonium genauer untersucht werden (Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006; Qi et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Ammoniumkonzentrationen im millimolaren Bereich zu einer Verringerung der Cäsium- bzw. der Kaliumaufnahme führen. Somit wird vermutet, dass *in planta* Ammonium einen direkten Einfluss auf den AtHAK5 vermittelten Transport hat, indem es diesen blockt, oder die erhöhte Expression unter Kaliummangelbedingungen reduziert (Qi et al., 2008). Im Gegensatz zum inhibierenden Effekt des Ammoniums, zeigten Spalding et al. 1999, dass die Kaliumpermeabilität der hoch-affinen, nicht AKT1-Komponente durch Natrium und Protonen stimuliert wird (Spalding et al., 1999). Jedoch wurde 2010 eine Verringerung der AtHAK5 Expressionsrate unter Salzstressbedingungen gezeigt, was eher auf eine transkriptionale Regulation schließen lässt als auf eine Inhibierung des Proteins durch Natrium/Protonen. Zudem wurde anhand von Studien an Mutantenlinien vermutet, dass AtHAK5 nicht in der Lage ist Natriumionen zu transportieren (Nieves-Cordones et al., 2010), was auch für HAK-Transporter aus Pilzen bewiesen wurde. Aufgrund der folgenden Aussagen: (i) der Kaliumtransport über HAK-Proteine ist nicht von Natrium anhängig, (ii) unter geringen externen K^+ -Bedingungen kann der elektrochemische Gradient für Kalium nicht die treibende Kraft für die Kaliumaufnahme darstellen, und (iii) der hoch-affine Kaliumtransport in Wurzeln kann durch Protonen stimuliert werden; führten zur Vermutung, dass es sich beim Transportmechanismus von HAK-Transportern um einen K^+/H^+ -Symport handelt (Rodriguez-Navarro, 2000).

In Abbildung 1-3 werden die hauptverantwortlichen Kaliumaufnahmesystem in *Arabidopsis* Wurzeln schematisch dargestellt. Am Beispiel des pflanzlichen *Shaker*-Kanals AKT1 ist erkennbar, dass diese Systeme einer gut organisierten Regulation unterliegen. Beim Vertreter der HAK-Transportproteine, AtHAK5, ist aufgrund von einer fehlenden elektrophysiologischen Charakterisierung in heterologen Expressionssystemen wenig über das Zusammenspiel mit regulatorischen Elementen bekannt. Jedoch wird vermutet, dass neben der transkriptionalen Induktion unter Kaliummangelbedingungen auch eine posttranskriptionale oder posttranslationale Regulation erfolgt (Rubio et al., 2014). Neben der nieder-affinen Kaliumaufnahme wird dem NH_4^+ -insensitiven Kanal AKT1 auch eine Funktion beim hoch-affinen Transport zugeschrieben. Sobald im externen Medium Ammonium vorliegt und damit

die Kaliumpermeation über den NH_4^+ -sensitiven AtHAK5 inhibiert wird, springt die Kanal vermittelte Kaliumaufnahme ein (Rubio et al., 2008; Sharma et al., 2013).

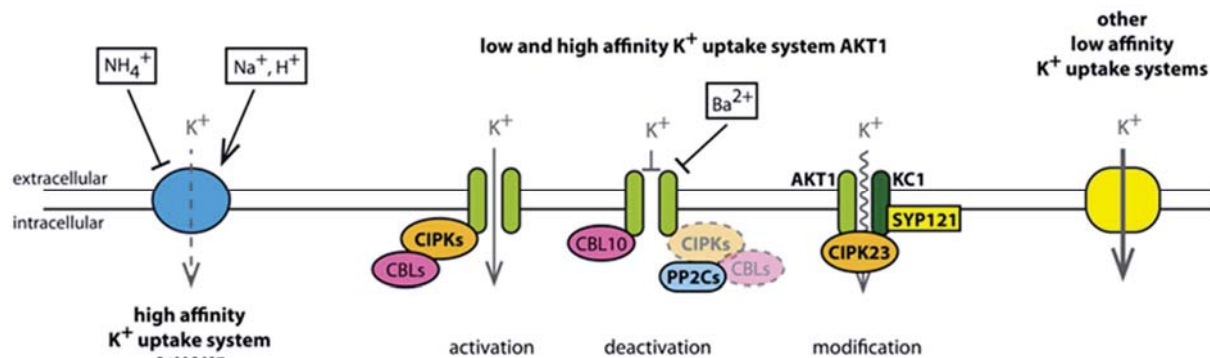


Abbildung 1-3: Kaliumaufnahmemodule in *Arabidopsis* Wurzeln

Bei geringen externen Kaliumkonzentrationen findet der hoch-affine Kaliumtransport über AtHAK5 statt. Durch extern vorliegendes Ammonium wird der Transport inhibiert, jedoch die Kaliumaufnahme durch Protonen stimuliert. Der Kaliumkanal AKT1 dient vor allem dem nieder-affinen Kaliumtransport. Durch die Interaktion mit AtCBL9/AtCIPK23-Komplexen findet eine Aktivierung von AKT1 statt, die durch die PP2C-Phosphatase AIP1 aufgehoben werden kann. Der Kalziumsensors AtCBL10 interagiert direkt mit AKT1 und inhibiert so den Kaliumstrom. Externe Applikation von Barium deaktiviert den Kanal ebenfalls. Eine Modifikation der Transporteigenschaften von AKT1 kann über die Heteromerisierung mit AtKC1 erfolgen. Die dadurch resultierenden geänderten Eigenschaften verhindern einen Kaliumausstrom bei Kaliummangel. (Sharma et al., 2013)

1.4 Was passiert mit dem aus dem Insekt stammenden Natrium während des Verdauungsprozesses?

In Insekten und ihrer Hämolymphe findet sich zu einem gewissen Anteil, neben den Kationen wie Kalium, Magnesium oder Kalzium, das Kation Natrium. Dieses variiert im Gehalt je nach Insektenart (Punzo, 1989, 1990; Finke, 2002). Im Gegensatz zu Pflanzen arbeiten tierische Zellen mit Natriumgradienten über der Plasmamembran, die durch ubiquitär exprimierte Na^+/K^+ -ATPasen aufgebaut und erhalten werden. Ähnlich wie die Protonen-motorische Kraft bei Pflanzen, nutzen Tiere den Natriumgradienten über der Plasmamembran zur Energetisierung der Nährstoffaufnahme sowie zur Regulation des Zellvolumens und des zytosolischen pH-Wertes (Blumwald, 2000). Im Gegensatz zu tierischen Zellen ist Natrium nicht essentiell für Pflanzenzellen und kann sogar in hohen millimolaren Konzentrationen toxisch wirken. Dieser hohe Salzgehalt kann sich auf zwei Arten als Stress auf pflanzliches Gewebe auswirken. Zum einen kann eine vorherrschende hohe Konzentration im Boden aufgrund vom osmotischen Potential in Wassermangel resultieren und zum anderen kann durch ein geändertes K^+/Na^+ -Verhältnis Ionen-spezifischer Stress ausgelöst werden. Jedoch kann Natrium bis zu einem gewissen Anteil Kalium vor allem in seiner osmotischen Funktion in der Vakuole ersetzen (Blumwald, 2000; Maser et al., 2002a).

Insekten stellen eine wichtige Nährstoffquelle für die Venusfliegenfalle dar. Nach dem Abschließen der Verdauungs- und der Resorptionsphase öffnen sich die Spreitenhälften der Fallen wieder. Es ist auffällig, dass sich anschließend keine Rückstände der Beute oder Salzkrusten in den Fallen wieder finden (Darwin, 1875). Es scheint als würde *Dionaea* jedes Molekül und Ion rückstandslos aufnehmen, darunter auch das in hohen Konzentrationen toxisch wirkende Natrium. Um diesem Aspekt in der vorliegenden Doktorarbeit näher zu kommen, soll im Folgenden auf Na⁺-spezifische Transportproteine, am Modell von *Arabidopsis thaliana*, eingegangen werden.

1.4.1 Pflanzen transportieren Natrium über HKTs

Pflanzen nutzen verschiedene Natriumtransportproteine um die Na⁺-Homöostase zu kontrollieren und sich durch Schäden aufgrund einer Na⁺-Akkumulation zu schützen. Na⁺/H⁺-Antiporter, die eine entscheidende Rolle im SOS-Signalweg zur Salzstressbewältigung spielen, sorgen für den Rücktransport von Natrium in den Boden (Ji et al., 2013). Andere Transportproteine, darunter auch Mitglieder der HKT-Familie, verhindern die Akkumulation von Natrium in photosynthetisch aktivem Gewebe und Tonoplasten-lokalisierte Antiporter (NHX-Antiporter) ermöglichen das Einlagern von Natriumionen in der Vakuole. Transportproteine der HKT-Familie sind sehr gut analysierte Na⁺-permeable Transporter, die in vielen Pflanzenspezies eine Rolle in der Salzstresstoleranz spielen (Almeida et al., 2013).

Die pflanzlichen HKT`s zählen zusammen mit den aus Hefe stammenden Trk`s und den bakteriellen KtrB`s zu einer Transporter-Superfamilie. Der erste pflanzliche Trk-ähnliche Transporter, TaHKT1, wurde in Weizen identifiziert und als ein hoch-affiner Kaliumtransporter beschrieben (Schachtman and Schroeder, 1994). Daraus ergab sich die Bezeichnung der pflanzlichen Trk-ähnlichen Transporter als hoch-affine Kalium-Transporter (HKT). Später wurde im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten der TaHKT1 als ein Na⁺-gekoppelter K⁺-Transporter charakterisiert. Zudem wurden weitere HKT-Orthologe aus anderen Pflanzenspezies identifiziert, die zwar unterschiedliche Transporteigenschaften aufwiesen, aber alle wurden mit dem Kation Natrium in Verbindung gebracht. Deshalb wirkte die Namensgebung verwirrend. Im Jahr 2006 wurde jedoch die Vereinbarung getroffen, an der HKT Nomenklatur festzuhalten und aufgrund der Transportcharakteristika pflanzliche HKT-Proteine in zwei Untergruppen einzugliedern (Maser et al., 2002b; Platten et al., 2006; Almeida et al., 2013).

Einteilung der HKT-Transporter in zwei Untergruppen

Trk/HKT Transporter besitzen vier Poren-Loop-ähnliche Domänen, die in einer einzelnen Polypeptidkette vorliegen (Durell and Guy, 1999). Aufgrund der Transportcharakteristika werden HKTs in die beiden Untergruppen I und II eingeteilt. Diese basieren u. a. auf der Aminosäuresequenz der ersten Porendomäne. Vertreter der Gruppe I besitzen ein Serin im Selektivitätsfilter der ersten Porendomäne und ein Glycin in den drei weiteren Porendomänen, wodurch sich ein S-G-G-G Motiv ergibt. Im Gegensatz dazu weisen Mitglieder der Gruppe II eine G-G-G-G Motiv auf, da alle vier Porendomänen ein Glycin besitzen (Platten et al., 2006). Die Präsenz eines Serins oder Glycins an dieser speziellen Position innerhalb der ersten Porendomäne bestimmt die Selektivität des Transportproteins (Maser et al., 2002b). Ein Serin wird mit einer Natriumleitfähigkeit assoziiert, wohingegen ein Glycin zur einer Na⁺ und/oder K⁺ Leitfähigkeit führt. Jedoch muss man beachten, dass diese Eingruppierung mit Ausnahmen einhergeht. So besitzt zum Beispiel OsHKT2;1 ein Serin an besagter Stelle, doch vermittelt dieses Protein einen Kaliumtransport. Ein weiteres Mitglied der HKT-Transporter aus Reis, OsHKT2;4 ist in der Lage divalente Kationen, wie Kalzium und Magnesium, zu transportieren (Golldack et al., 2002; Horie et al., 2011). Somit sollte beachtet werden, dass die Selektivität und Affinität vieler HKT-Transporter sich nicht aus dem Namen und der Präsenz eines Serins oder Glycins in der ersten Porendomäne ableiten lassen (Almeida et al., 2013). Analysen der Transporteigenschaften für jeden einzelnen HKT sind für eine detaillierte Charakterisierung von Nöten.

Im Allgemeinen üben HKT-Transporter der Klasse I eine essentielle Rolle in der Na⁺-Entgiftung aus. Einige Vertreter sind in der Plasmamembran der Xylemparenchymzellen lokalisiert und führen Natriumionen aus dem Transpirationsstrom, um eine Natriumakkumulation im Pflanzenspross und somit eine Schädigung der photosynthetisch aktiven Zellen zu vermeiden. Viele Vertreter der Klasse II Transportproteine sind in der Wurzel exprimiert und weisen eine erhöhte Expression bei limitierenden Kaliumbedingungen auf. Sie nehmen wahrscheinlich Natrium aus dem extrazellulären Medium auf, sobald die Verfügbarkeit von Kaliumionen limitiert ist (Almeida et al., 2013).

1.4.2 HKT1 aus *Arabidopsis thaliana*

Zwar stellen HKT-Transporter ein interessantes Forschungsgebiet dar, dennoch ist die *in planta* Funktion von HKT1 aus *Arabidopsis thaliana* noch nicht im Detail verstanden. In heterologen Expressionssystemen vermittelt AtHKT1 einen Na⁺-selektiven Uniport (Uozumi et al., 2000). Trotz der Verwendung des Terms „Transporter“ für AtHKT1 konnten Patch Clamp-Studien ein für Kanäle typisches Verhalten nach Nernst aufzeigen. So fungiert AtHKT1 *in*

planta als ein Na⁺-permeablen Kanal (Xue et al., 2011). Aufgrund seiner strikten Permeabilität für Natrium wird AtHKT1 in die Klasse I der HKT-Transporter eingruppiert. Auch das charakteristische Motiv (S-G-G-G) der ersten Porendomäne findet sich in seiner Aminosäuresequenz wieder. Wird das Serin an Position 68 zu einem Glycin mutiert, zeigt die Mutante bei heterologer Expression zusätzlich eine Kaliumleitfähigkeit (Maser et al., 2002b). Dies verdeutlicht, dass die Motive der ersten Porendomäne der beiden Unterklassen eine entscheidende Rolle bei der Selektivität dieser Proteine spielen.

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von AtHKT1 entwickelten sich zwei verschiedene Modelle. Studien an *athkt1* Mutantenlinien zeigten keinen reduzierten Natriumeinstrom in die Pflanzen, sondern eine Änderung der Natriumverteilung. Dies deutet auf eine Rolle von AtHKT1 bei der Re-Zirkulation von Natrium aus dem Spross zur Wurzel hin, was durch das Phloem-spezifische Expressionsmuster unterstützt wird (Berthomieu et al., 2003). Das Modell zur Natrium-Re-Zirkulation (Abbildung 1-4) beruht auf der AtHKT1 vermittelten Beladung des Phloems im Spross, um dort die Akkumulation von Natrium zu verhindern. Über den basipedalen Phloemstrom gelangt das Natrium zurück zur Wurzel (Almeida et al., 2013). Das Zurückführen von Natrium zur Wurzel kann die photosynthetisch aktiven Blätter vor zu hohen Natriumkonzentrationen und somit vor Na⁺-Stress schützen. In diesem Modell würde AtHKT1 einen einwärtsgerichteten Natriumtransport ins Phloem vermitteln (Berthomieu et al., 2003; Hauser and Horie, 2010).

Die Expression von AtHKT1 in Xylemparenchymzellen und der höhere Natriumgehalt im Xylemsaft der *athkt1* Mutanten im Vergleich zum Wildtypen deuten auf eine Rolle des Transportproteins beim Entladen des Xylems in der Wurzel. Demnach schleust AtHKT1 bereits in der Wurzel Natriumionen aus dem Xylemsaft in die Xylemparenchymzellen. Dadurch könnten hohe Na⁺-Konzentrationen im Transpirationsstrom des Xylems vermieden werden (Sunarpi et al., 2005). Dieses „Entladungs-Modell“ (Abbildung 1-4) der Funktion von AtHKT1 wird zudem durch Überexpressions-Studien unterstützt. Dabei wurde eine Überexpression des Proteins in Parenchymzellen der Wurzel induziert, was zu einem erhöhten Na⁺-Einstrom in die Parenchymzellen führte und zu einer erhöhten Na⁺-Toleranz der Pflanzen (Moller et al., 2009; Plett et al., 2010). Die detektierte K⁺-Akkumulation in Wurzeln der *athkt1* Mutanten kann ebenfalls mit Hilfe dieses Modelles beschrieben werden. Die Aufnahme von Natrium über AtHKT1 in die Xylemparenchymzellen resultiert in dessen Depolarisation der Membran und somit in der Aktivierung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen (K_{out}). Fehlt AtHKT1, so bleibt die Membran der Xylemparenchymzellen hyperpolarisiert und weniger Kalium kann über die Depolarisations-aktivierten SKOR-Kanäle in die Xylemgefäße entlassen werden. In Wildtyp-Pflanzen trägt der Kaliumausstrom zusammen mit dem Natriumeinstrom zur Aufrechterhaltung

des hohen K^+/Na^+ -Verhältnis bei, was als ein entscheidender Faktor bei der Salztoleranz von Glykophyten gilt.

Zwar wird das „Re-Zirkulations-Modell“ immer mehr in Frage gestellt, jedoch könnten auch beide Transportprozesse miteinander gekoppelt sein. So wird spekuliert, dass eine Re-Zirkulation erreicht wird, indem Na^+ -Ionen aus dem Xylem in die entsprechenden parenchymatischen Zellen entladen wird und über symplastische Diffusion ins Phloem gelangt (Almeida et al., 2013).

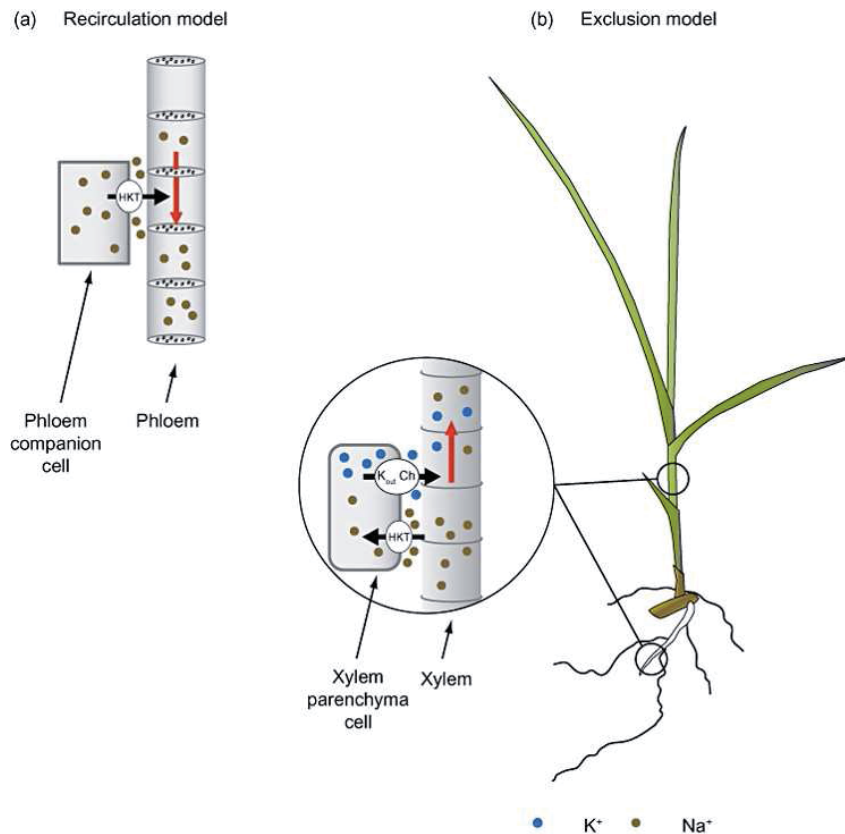


Abbildung 1-4: Schema der beiden Modelle zur physiologischen Funktion von AtHKT1

(a) Beim „Re-Zirkulations-Modell“ wird Natrium über AtHKT1 in das Phloem transportiert. Somit können die Natriumionen über den Phloemstrom in Richtung Wurzel transportiert und eine Akkumulation von Natrium im Spross vermieden werden. (b) Im zweiten Modell zur Entladung von Natrium aus dem Xylem, vermittelt der in den Xylemparenchymzellen (XP-Zellen) lokalisierte AtHKT1 den Na^+ -Transport aus dem Transpirationsstrom in die Parenchymzellen. Dadurch wird bereits ein vermehrter Transport von Natrium in den Spross vermieden. Durch den Natriumstrom in die XP-Zellen wird deren Membran depolarisiert und somit ein Kaliumausstrom ins Xylem über Kaliumauswärtsregulator (K_{out}) aktiviert. Dies kann zur Aufrechterhaltung des hohen K^+/Na^+ -Verhältnisses während Salzstress dienen (Hauser and Horie, 2010).

1.5 Zielsetzung

Die Venusfliegenfalle (*Dionaea muscipula*) erweckte bereits im 18. und 19. Jahrhundert das Interesse von vielen Wissenschaftlern. Ihre karnivore Lebensweise ermöglichte der Venusfliegenfalle die Besiedlung von Nährstoff-armen Böden, was ihr einen evolutionären Vorteil bot. Obwohl schon seit der Zeit Charles Darwins (1809-1882) die besonderen morphologischen Anpassungen, wie die Ausbildung von Fallen, untersucht wurden, sind bis heute die Karnivorie-spezifischen Anpassungen auf molekularer Ebene noch weitestgehend unverstanden. Deshalb stehen die Entschlüsselung des Transkriptoms und Genoms im Fokus der heutigen Forschung. Diese genetischen Informationen sollen schließlich helfen, Karnivorie-spezifische physiologische Prozesse, wie z.B. die Mechanosensitivität und die elektrische Erregbarkeit sowie die schnelle Schließbewegung der Fallen zu verstehen. Neben diesen Eigenschaften sind die Prozesse der Sekretion von Verdauungsenzymen und die anschließende Resorption von Nährstoffen aus dem Beuteinsekt von zentralem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit lag ein besonderes Augenmerk auf der Resorption der aus der Hämolymphe des Insekts stammenden Kationen, Natrium und Kalium. Kalium stellt das Hauptosmotikum und einen essentiellen Makronährstoff der Pflanzen dar, wohingegen eine hohe Konzentration an Natrium bei Na⁺-sensitiven Pflanzen zu Salzstress führt. Da *Dionaea* während des Insektenverdaus beide Kationen rückstandslos aufnimmt, ergaben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit geklärt werden sollten: (i) Über welche Transportproteine nimmt die Venusfliegenfalle diese beiden Kationen auf und wie ist die Aktivität dieser Proteine reguliert? (ii) Unterscheiden sich die elektrischen Eigenschaften der an der Nährstoffresorption beteiligten Transportproteine zwischen karnivoren und nicht-karnivoren Pflanzen? (iii) Führt die Aufnahme von Natrium aus der Hämolymphe von Beutetieren zu Salzstress in den *Dionaea*-Gewebe oder beeinflusst Natrium die elektrische Erregbarkeit der Venusfliegenfalle?

Zur Klärung dieser Fragen sollten Fallen-spezifische Kationentransportproteine identifiziert, kloniert und elektrisch charakterisiert werden. Hierzu stellten Transkriptomanalysen und vorläufige Genmodelle, die anhand von Homologien zu bereits bekannten pflanzlichen Genen erstellt wurden, die molekularbiologische Grundlage zur Klonierung der Transportproteine dar. Mittels heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik sollten Einblicke in die Transporteigenschaften und Regulationsmechanismen der Kanäle und Transporter/Carrier erlangt werden. Schließlich sollten die elektrischen Eigenschaften der an der Nährstoffresorption beteiligten Transportproteine mit Transportern aus nicht-karnivoren Pflanzen verglichen werden, um spezifische an die Karnivorie angepasste Merkmale zu finden. Solche Unterschiede in den

Transporteigenschaften sollten weiterhin durch Struktur-Funktions-Untersuchungen mit Hilfe gezielter Mutagenese auf molekularer Ebene identifiziert und analysiert werden.

2. Material und Methoden

Die Grundlagen der folgenden Material- und Methoden-Beschreibung wurde zum Teil aus meiner Diplomarbeit („Klonierung und biophysikalische Charakterisierung von Ionenkanälen aus der Venusfliegenfalle (*Dionaea muscipula*)“, 2011) übernommen und dem Sachverhalt entsprechend angepasst. Des Weiteren sind die in dieser Arbeit verwendeten gängigen Methoden im Umgang mit *E. coli* Zellen, RNA- und DNA-Proben, soweit nicht anders erwähnt, entsprechend Current Protocols in Molecular Biology (Wiley) und Molecular Cloning (Sambrook; Russel) durchgeführt worden.

2.1 Isolierung von *Dionaea* mRNA und Generierung von cDNA

2.1.1 mRNA-Isolierung

Für die Synthese der cDNA wurde auf bereits isolierte *Dionaea* Gesamt-RNA zurückgegriffen. Anschließend wurde die mRNA mittels Oligo(dT) beschichteten Dynabeads Oligo (dT)25-61005 (Invitrogen) aus der Gesamt-RNA isoliert.

Dynabeads sind magnetische Kügelchen, an deren Oberfläche eine Oligo(dT) Sequenz gebunden ist. Das 5`Poly(A)-Ende von eukaryotischer mRNA kann mit der Oligo(dT) Sequenz hybridisieren und somit aus dem Verband der Gesamt-RNA isoliert werden.

Die Gesamt-RNA hatte eine Konzentration von 2 µg/µl. Davon wurden für die Isolierung 50 µl, also 100 µg, herangezogen. Für diese Menge wurden 266 µl (133 mg) ungewaschene Beads verwendet. Diese wurden vor ihrer Nutzung einem Waschprozess unterzogen. Dazu wurden die 266 µl Beads in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, das in einen Magnetständer gestellt wurde. Aufgrund des integrierten Magnets im Ständer verschoben sich die Beads an die Wand des Reaktionsgefäßes, sodass der Überstand mit einer Pipette entfernt werden konnte. Mit 100 µl Bindepuffer wurden die Beads gewaschen, indem sie resuspendiert und anschließend wieder in den Magnetständer gestellt wurden. Der Überstand konnte abgenommen und die Beads entsprechend dem Herstellerprotokoll in 133 µl Bindepuffer resuspendiert werden. Nach dieser Vorbehandlung konnten die Beads für die Isolierung herangezogen werden.

Zur Isolierung der mRNA wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 50 µl Gesamt-RNA mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Das gleiche Volumen an Bindepuffer wurde hinzugegeben und bei 65°C für 2 min inkubiert. Diese Inkubation ermöglichte das Hybridisieren der 5`Poly(A)-Enden der mRNA und den Oligo(dT) beschichteten Beads. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort auf Eis gestellt. 80 Units RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl Fermentas) und die 133 µl der gewaschenen Beads wurden hinzugefügt. Um eine optimale Bindung der mRNA an die Beads zu gewährleisten,

erfolgte eine 40minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in einem Überkopfschüttler. Nach der Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gestellt und nach magnetischer Abtrennung der Beads konnte der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen werden. Mit je 200 µl Wasch-Puffer B wurde die Verbindung aus Beads und mRNA 2x gewaschen, indem sie im Wasch-Puffer B resuspendiert und anschließend, nach der Abtrennung der Beads im Magnetständer, der Überstand abgenommen wurde. Die Beads wurden daraufhin in 15 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und bei 80°C in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler personal) für 2 min erwärmt. Während dieser Phase löste sich die mRNA von den Beads und konnte anschließend mit dem Überstand abgenommen werden. Dabei war zu beachten, dass der für diesen Schritt verwendete Magnetständer erwärmt war, damit das mRNA-Beads-Gemisch nicht zu schnell abkühlte und wieder eine Hybridisierung zwischen mRNA und Beads entstand. Die Konzentration der nun isolierten mRNA wurde mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) photometrisch ermittelt.

2.1.2 Erst-Strang cDNA-Synthese

Aus der Transkriptomsequenzierung von *Dionaea muscipula* waren während des Amplifizierens und Klonierens putativer Ionenkanäle dieser Pflanze vorhergesagte kodierende Gensequenzen oder lediglich fragmentarische Bereiche eines Gens bekannt. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu bereits bekannten Genen anderer Pflanzenspezies konnten kodierende Sequenzen (CDS) oder Sequenzfragmente dieser putativen Ionenkanäle klassifiziert und ausgewählt werden. Diese sollten mit Hilfe der SMART Race Technik in Volllänge kloniert werden. Das BD SMART Race cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech) ermöglichte speziell die Amplifikation von unbekanntem 5'- und 3'-Sequenzen und somit die Klonierung der Volllänge einer kodierenden Sequenz ausgehend von der bekannten Sequenz aus der Transkriptomsequenzierung. Die dazu hergestellte cDNA wurde jedoch auch zur Amplifikation von bereits vorhergesagten CDS einiger Gene herangezogen.

Als Ausgangsmaterial wurde isolierte mRNA aus *Dionaea muscipula* verwendet. Mit Hilfe des BD SMART Race cDNA Amplification Kits (BD Biosciences Clontech) erhielt man zwei cDNA Populationen, die 3'-Race cDNA und die 5'-Race cDNA.

Die 3'-cDNA-Synthese erfolgte auf die herkömmliche Art und Weise mit Hilfe einer Reversen Transkriptase. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen. In ursprünglicher Form dienen sie der Replikation des retroviralen Genoms. In der Molekularbiologie stellt dieses Enzym ausgehend von einer RNA-Matrize einen komplementären DNA-Strang her. Es entstehen RNA-DNA-Hybride. Die cDNA-Synthese geht

von der Poly(A)-Sequenz der eukaryotischen mRNA aus. An diese lagert sich eine Oligo(dT)-Sequenz an. Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich kann die Reverse Transkriptase eine DNA-Kopie der mRNA synthetisieren.

Im Falle der 3`-cDNA-Synthese wurde eine spezielle Form des Oligo(dT)-Primers verwendet, der 3`-RACE CDS Primer A. Dieser besitzt neben dem Oligo(dT) eine Nukleotidabfolge, die ein Adaptoroligo an die cDNA fusioniert und später bei der RACE-PCR als Andockstelle für die dort verwendeten Primer dient.

Die 5`-cDNA-Synthese verlief nach einem abweichendem Mechanismus. Die im Falle der 3`- und 5`-cDNA-Synthese verwendete BD PowerScript Reverse Transcriptase ist eine Mutante der MMLV Reversen Transkriptase. Erreicht sie ausgehend vom Poly(A) das 5` Ende des RNA-Templates, so fügt sie durch ihre Transferaseaktivität 3-5 Cytosine an. Das in den Reaktionsansatz beigefügte BD SMART II A Oligonukleotid besitzt drei Guanine, die sich nun an das neue dC-reiche cDNA-Ende anlagern können. So entsteht ein neues Template für die Reverse Transkriptase, die nun eine Kopie des originalen RNA-Templates mit eine am 5` Ende hinzugefügten Sequenz herstellt. Als Oligo(dT) Primer wurde der 5`-RACE CDS Primer verwendet.

Präparation der 5`-RACE fertigen cDNA:

- 3 µl mRNA
- 1 µl 5`-RACE CDS Primer (12 µM)
- 1 µl BD SMART II A Oligonukleotid (12 µM)

Präparation der 3`-RACE fertigen cDNA:

- 3 µl mRNA
- 1 µl 3`-RACE CDS Primer A (12 µM)
- 1 µl Nuklease-freies Wasser

Die zuvor genannten Reaktionsbestandteile wurden jeweils in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 2 min bei 70°C inkubiert. Daraufhin wurden sie für 2 min auf Eis abgekühlt.

In jedes der Reaktionsgefäße wurden anschließend folgende Komponenten hinzugefügt

- 2 µl 5x First-Strand Puffer
- 1 µl DTT (20 mM)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1µl BD PowerScript Reverse Transcriptase

Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Reaktionsansätze gemischt und anschließend für 2 h bei 42°C in einem Thermocycler mit Deckelheizung (Eppendorf Mastercycler personal) inkubiert. Die Erst-Strang cDNA konnte danach mit 250 µl eines Tricine-EDTA-Puffers (N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer) verdünnt werden. Diese Verdünnung wurde noch einmal für 7 min auf 72°C erhitzt und anschließend zur späteren Verwendung bei -20°C aufgehoben.

2.2 Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1986 von Kary Banks Mullis etabliert (Mullis et al., 1986) und stellt ein Verfahren dar, DNA-Fragmente (Templates) *in vitro* in großer Anzahl zu amplifizieren.

Im Prinzip besteht eine PCR aus drei Schritten: der Denaturierung, dem Primer-Annealing und der Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die Probe auf 94° - 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 heruntersetzt, dass die gewünschten Primer an die einzelsträngige DNA binden können. Die Primer sind Oligonukleotide und dienen als Startpunkte der PCR. Sie hybridisieren an komplementären DNA-Sequenzen und können durch DNA-Polymerasen verlängert werden. Werden zwei Primer eingesetzt, so kann der Erste am Leit- und der Zweite am Folgestrang der Template-DNA binden. Die PCR verläuft dann exponentiell. Bei diesen Primern handelt es sich immer um ein Paar mit ähnlichen Annealing-Temperaturen, die Primer-spezifisch sind. Wird die Temperatur für diesen Schritt zu niedrig gewählt, binden die Primer unter Umständen auch unspezifisch, ist sie zu hoch, binden die Primer gar nicht. Während des dritten Schritts werden ausgehend von den gebundenen Primern die komplementären Stränge der Matrizen-DNA durch eine thermostabile Polymerase und zugegebene Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP's) so verlängert, dass wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die Inkubationstemperatur der Elongation richtet sich nach der Beschaffenheit der DNA-Polymerase, wohingegen sich die Inkubationszeit nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz richtet.

Lässt man diesen dreistufigen Zyklus n-mal hintereinander ablaufen, so erhält man theoretisch aus einem einzigen DNA-Molekül 2^n neu synthetisierte DNA-Moleküle. Dies läuft nach dem Prinzip der semikonservativen Replikation ab. Durch Änderungen der für die einzelnen Schritte benötigten Temperaturen und Inkubationszeiten kann eine PCR im Einzelfall optimiert werden.

2.2.1 RACE-PCR

Als RACE wird eine Methode bezeichnet, die eine schnelle Amplifikation von unbekanntem 3`- und 5`-Sequenzen ermöglicht. Dafür wurden spezielle Primer mit der Vector NTI Software (Invitrogen) designt/synthetisiert, die jeweils komplementär zu einem Bereich der bekannten Fragmente der zu amplifizierenden Sequenz waren. Die Primer wurden hinsichtlich der Annealing-Temperatur passend zu den Adaptorsequenzen der 3`- und 5`-RACE cDNA designt. So entstand ein antisense Primer (GSP1) für die 5`-RACE PCR und ein sense Primer (GSP2) für das 3`-RACE. Sie erzeugten überlappende RACE-Produkte. So konnte zum einen später die Volllänge synthetisiert werden und zum anderen konnten die GSP-Primer als Kontrolle für das Vorhandensein der sequenzierten Transkriptsequenzen dienen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die cDNA oder die GSP-Primer eine Fehlerquelle darstellten.

Als weitere Primer wurde der aus dem BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) stammende 10x Universal Primer A Mix (UPM) verwendet. Er besteht aus einem UPM-Primer long und einem UPM-Primer short. Der UPM long (0,4 µM) ist am 3`-Ende komplementär zu der Adaptorsequenz der 3`- und 5`-RACE cDNA. Die zusätzliche Sequenz am 5`-Ende des UPM Primer long stellt nach den ersten PCR-Zyklen die Hybridisierungsstelle für den UPM short Primer (2 µM) dar. Dies gewährleistete, dass die Adaptorsequenz mit amplifiziert wurde.

Reaktionsansatz der 5`-RACE PCR:

5 µl 10x BD Advantage 2 PCR Puffer (BD Bioscience Clontech)
 1 µl dNTP Mix (10 mM)
 1 µl 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix (BD Bioscience Clontech)
 2,5 µl der 25x verdünnten 5`-RACE cDNA
 5 µl UPM (10x)
 1 µl GSP1 (10 µM)
 34,5 µl Nuklease-freies H₂O

Reaktionsansatz der 3`-RACE PCR:

5 µl 10x BD Advantage 2 PCR Puffer (BD Bioscience Clontech)
 1 µl dNTP Mix (10 mM)
 1 µl 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix (BD Bioscience Clontech)
 2,5 µl der 25x verdünnten 3`-RACE cDNA
 5 µl UPM (10x)
 1 µl GSP2 (10 µM)

34,5 µl Nuklease-freies H₂O

Alle Komponenten wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und durch langsames Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem wie folgt programmierten Thermocycler mit Deckelheizung (Eppendorf Mastercycler personal). Die Deckelheizung betrug 110°C um Verdunstungsverluste und die damit verbundenen Pufferveränderungen zu minimieren.

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Denaturierung	94	120	
Denaturierung	94	30	} 5x
Elongation	72	180	
Denaturierung	94	30	} 5x
Primer-Annealing	62	30	
Elongation	72	180	
Denaturierung	94	30	} 25x
Primer-Annealing	56	30	
Elongation	72	180	
Abschluss der Synthese	72	180	

Tabelle 2-1: PCR-Zyklen der 5'- und 3'-RACE PCR

Nach Ablauf der PCR wurde ein Aliquot Gel-elektrophoretisch analysiert. Von positiven PCR-Fragmenten wurden 5 µl 1:50 mit dem Tricine-EDTA-Puffer verdünnt. Die verbliebenen 45 µl wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2 Nested-RACE PCR

Eine „nested PCR“ kommt dann zum Einsatz, wenn die vorhergegangene PCR unspezifische, verschiedene oder für eine Identifikation zu wenige Amplifikate liefert. Die dafür verwendeten Primer setzten innerhalb der gewünschten PCR-Produkte auf. Somit sorgt das zweite Primer-Paar für eine hohe Spezifität und Ausbeute der gewünschten Amplimere.

Im BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) ist passend zu den UPM-Primer auch ein Nested Universal Primer A (NUP) enthalten. Dieser Primer kann direkt auf der Adaptorsequenz der 3'- und 5'-Enden binden und liegt somit um die Nukleotidanzahl des UPM short Primers nach innen versetzt. Passend zu den designten GSP-Primer wurden Nested-GSP-Primer synthetisiert. Ausgehend vom antisense Primer GSP1 für das 5'-RACE

befindet sich der Nested-GSP1-Primer bis zu 300 bp in Richtung 5`-Ende des ersten PCR-Fragmentes. Analog dazu liegt der Nested-GSP2-Primer bis zu 300 bp vom sense Primer GSP2 in Richtung 3`-Ende des ersten PCR-Fragments.

Wichtig für eine „nested-PCR“ war, dass das dafür verwendete PCR-Produkt mit dem Tricine-EDTA-Puffer vielfach verdünnt wurde. Es stabilisiert den für eine PCR benötigten pH-Wert bei höheren Temperaturen und verdünnt die PCR-Bestandteile der vorherigen PCR in hohem Maße, dass diese die zweite ablaufende PCR nicht beeinflussen.

Ansatz der „nested-PCR“:

- 5 µl des 1:50 verdünnten primären PCR-Produkts
- 1 µl NUP (10 µM)
- 1 µl Nested-GSP1 oder Nested-GSP2 (10 µM)
- 5 µl 10x BD Advantage 2 PCR Puffer (BD Bioscience Clontech)
- 1 µl dNTP Mix (je 10 mM)
- 1 µl 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix (BD Bioscience Clontech)
- 36 µl Nuklease-freies Wasser

Die Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und dieses kurz an zentrifugiert. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem zuvor programmierten Thermocycler mit Deckelheizung (Eppendorf Mastercycler personal). Die daraus erhaltenen Amplimere konnten bei -20°C gelagert werden. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem DNA-Agarosegel überprüft und konnte für weitere molekularbiologische Arbeiten herangezogen werden.

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Denaturierung	94	120	
Denaturierung	94	30	} 25x
Primer-Annealing	56	30	
Elongation	72	180	
Abschluss der Synthese	72	180	

Tabelle 2-2: PCR-Temperaturprogramm der 5`- und 3`-Nested-RACE PCR

2.2.3 Amplifikation der kodierenden Sequenzen putativer Ionenkanäle

Um die kodierende Sequenz (CDS) eines Gens zu amplifizieren wurden die vorhergesagten Vollängen aus der Transkriptomanalyse herangezogen. Putative Start- und Stopcodons wurden über Vergleiche der vorhergesagten Sequenz mit bereits bekannten Sequenzhomologe anderer Pflanzenspezies identifiziert. Zeigte jedoch im Vorfeld die Transkriptomanalyse nur fragmentarische Bereiche eines Gens von Interesse, wurde zunächst mit Hilfe der RACE-Technik (2.2.1) die 5`- und 3`-Region amplifiziert. Durch mehrfache Sequenzieranalysen (2.7) dieser Fragmente konnten die fehlenden Informationen hinsichtlich der Start- und Stopcodons ermittelt werden. Es wurden mit Hilfe der Vector NTI Software (Invitrogen) Primer designt, die die kodierende Sequenz umspannten und somit am Start- und Stopcodon des zu amplifizierenden Gens hybridisierten. Sollte im weiteren Verlauf das Gen C-terminal mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert werden, so wurde der am Stopcodon aufsitzende Primer modifiziert, sodass anstelle der Stopsequenz eine Linkersequenz aus 2 Guaninen eingebaut wurde.

Reaktionsansatz:

1-3 µl cDNA (25x verdünnte 5`-RACE cDNA)

1 µl Phusion Cx DNA-Polymerase (2 U/µl)

10 µl 5x Reaktionspuffer Phusion HF

1 µl dNTP Mix (je 10 mM)

1 µl sense-Primer (10µM)

1 µl antisense-Primer (10µM)

33-35 µl Nuklease-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in einem Thermocycler unter den folgenden Bedingungen behandelt. Dabei richtete sich die Elongationszeit nach der angenommenen Länge des zu amplifizierenden Gens und nach der Beschaffenheit der verwendeten DNA-Polymerase (1kb/40s).

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Denaturierung	98	30	} 30x
Primer-Annealing	56	30	
Elongation	72	x	
Abschluss der Synthese	72	180	

Tabelle 2-3: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei Amplifikation der CDS

Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung auf ein Agarose-Gel aufgetragen und konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

2.2.4 IVT-PCR

Mittels einer *in vitro* PCR (IVT-PCR) kann ein cDNA-Fragment synthetisiert werden, das als Template zur Herstellung von cRNA durch eine *in vitro* Transkription dient. Durch den Einsatz von speziellen IVT-Primer entstanden linearisierte DNA-Matrizen. Die Bindestellen der Primer wurden in den verwendeten Vektoren so gewählt, dass die DNA-Matrizen den Promotor für die virale T7-RNA-Polymerase und die 5'- und 3'- untranslatierten Regionen (UTRs des β -Globulins aus *Xenopus laevis*) sowie die dazwischen sitzende klonierte cDNA umspannte. Je nach Art des Vektors war es möglich, dass die kodierende Sequenz des klonierten Gens N-terminal oder C-terminal mit der kodierenden Sequenz eines Reportergens (Bsp. YFP) fusioniert wurde. Durch dieses Verfahren wird eine Linearisierung des Vektors über einen Restriktionsverdau vor der *in vitro* Transkriptionsreaktion unnötig.

Folgende Reagenzien wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und unter den in aufgeführten Bedingungen behandelt.

Ansatz der PCR:

1 μl DNA

1 μl Phusion Cx DNA-Polymerase (2 U/ μl)

5 μl 5x Reaktionspuffer Phusion HF

1 μl dNTP Mix (je 10 mM)

1 μl IVT-Primer forward (10 μM)

1 μl IVT-Primer reverse (10 μM)

Mit X μl Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 μl

	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	
Denaturierung	98	60	} 25x
Denaturierung	98	30	
Primer-Annealing	56	30	
Elongation	72	x	
Abschluss der Synthese	72	120	

Tabelle 2-4: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei einer IVT-PCR

Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des Konstruktes.

Das PCR-Produkt konnte 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°C aufbewahrt werden.

2.2.5 PCR zur gerichteten Mutagenese

Um Punktmutationen in die kodierenden Sequenzen der Zielgene einzufügen, wurde auf die USER-Technik zurückgegriffen (Nour-Eldin et al., 2006; Norholm, 2010). Dazu wurden sich überlappende Gen-spezifische Primer-Paare designt, die in der Überlappungssequenz die gewünschte Mutation eingefügt hatten (Dadacz-Narloch et al., 2011). Auf die Plasmid-DNA des Konstruktes folgte die Mutagenese-PCR, in der der forward gerichtete Mutagenese-Primer mit einem in dem Ampicillin-Resistenz-Gen liegenden reverse Primer und umgekehrt (z.B. Mutagenese forward Primer + Amp reverse Primer) einen Reaktionsansatz darstellten. So entstanden 2 PCR-Fragmente, die nach der Entfernung methylierter Matrizen-DNA mittels DpnI, durch das Verfahren der USER-Klonierung (2.5.2) zusammengefügt werden konnte. Der PCR-Reaktionsansatz und die Bedingungen entsprachen dabei den der IVT-PCR unter 2.2.4, mit Ausnahme der geänderten Primer-Kombinationen. Zum DpnI-Verdau wurde 1 µl des Enzyms auf den abgeschlossenen PCR-Reaktionsansatz gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei 80°C für 20 min erfolgte eine Inaktivierung des DpnI-Enzyms. Nach dem Zusammenfügen des vollständigen Vektors mit der mutierten Gensequenz und der funktionellen Ampicillin-Resistenz mittels USER-Klonierung konnte anschließend die mutierte Plasmid-DNA in *E. coli* transformiert und vermehrt (2.6.1, 2.6.2, 2.6.3) werden.

2.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt ein Verfahren dar, DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. DNA-Moleküle sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates negativ geladen, wodurch sie in einem elektrischen Feld zum Pluspol (Anode) wandern. Durch die geringere Ladung und die porenartige Struktur des Agarose-Gels wandern kleinere Fragmente schneller als Größere. Die Konzentration der Agarose bestimmt den Vernetzungsgrad und damit die Porengröße im Agarose-Gel. Dieser Vernetzungsgrad und die angelegte Spannung beeinflussen neben der Größe der DNA-Moleküle die Laufgeschwindigkeit der DNA im Agarose-Gel. Je niedriger die Konzentration des Polymerzuckers Agarose in diesen Gelen ist, desto größer ist die Maschengröße des Gels.

Verschiedene Konzentrationen eignen sich unterschiedlich gut um verschiedene Fragmentgrößen aufzutrennen. Für DNA-Fragmente größer 1000 bp werden 1 %-ige Agarose-Gele verwendet, für kleinere Fragmente 2 %- und 3 %-ige Gele. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain, Biotium, Hayward, California, USA) (5 μ l/100ml) können die aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der DNA und emittiert Licht, wenn es mit UV-Licht der Wellenlänge 254-366 nm angeregt wird.

2.3.1 Durchführung und Analyse von DNA in Agarose-Gelen

Um ein 1 %-iges Agarose-Gel herzustellen, wurde 5 g Agarose in 500 ml 1x TAE-Puffer durch mechanisches Rühren und Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 25 μ l GelGreen zugegeben. Das fertige Gel konnte nun in einem Wärmeschrank gelagert werden, damit das Gel nicht auspolymerisierte. In einen Gelschlitten wurde je nach Probenvolumen und -anzahl ein sechs-, zehn- oder zwölfzahniger Kamm gesteckt und das Gel gegossen. Nach etwa einer halben Stunde war das Gel durch Abkühlen vollständig auspolymerisiert. Der Schlitten mit dem Gel wurde dann in eine Elektrophoresekammer gestellt und diese mit 1x TAE-Laufpuffer gefüllt. Die Proben (100-500 ng) wurden je nach Volumen mit der entsprechenden Menge an 5x DNA-Probenpuffer gemischt. Dieser Puffer enthält Glycerin, um den Proben im Vergleich zum TAE-Laufpuffer eine höhere Dichte zu verleihen, wodurch sie in den Geltaschen verbleiben und nicht in den Puffer diffundieren. Nach dem Beladen des Gels wurde zum Auftrennen der DNA-Fragmente eine Spannung von ca. 80 V angelegt. Als Vergleichsmöglichkeit diente ein parallel aufgetragener Größenstandard. Als solcher wurde hier der λ -PstI-Marker verwendet. Bei diesem Marker handelt es sich um ein Gemisch aus DNA-Probenpuffer und mit dem Restriktionsenzym PstI vollständig verdauter DNA des λ -Phagen. Nach einer Laufzeit von 20-40 min wurde das Gel aus der Kammer genommen. Die Detektion und photographische Darstellung der entstandenen Banden erfolgte an einem Intas UV Imager (Intas UV-Systeme) in einem Wellenlängenbereich von 254-366 nm.

2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

2.4.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Elution der elektrophoretisch aufgetrennten DNA aus einem Agarose-Gel erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen und erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt, um die durch GelGreen (Biotium) angefärbten Banden sichtbar zu machen. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von ca. 800 µl QG-Puffer folgte eine Inkubation bei 60°C (Thermo Shaker TS-100, PeqLab) bis sich das Gelstück komplett verflüssigt hatte (mind. 10 min). Um dies zu beschleunigen, wurde das 1,5 ml-Reaktionsgefäß während der Inkubation einige Male gevortext. Zum Binden der DNA an die Matrix der QIAquick MiniElute Säule wurde der Ansatz in die Säulchen pipettiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zuvor wurden noch 200 µl Isopropanol zur Probe gegeben, um die Matrix der Säule anzufeuchten und somit die Ausbeute zu erhöhen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde nochmals mit 500 µl QG-Puffer gewaschen. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 1 min). Wieder wurde der Durchfluss verworfen und die Säule wurde eine weitere Minute zum Trocknen zentrifugiert. Um verbliebenes Ethanol aus dem Puffer PE zu entfernen, wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gestellt und nochmals eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die gebundene DNA aus der Säulenmatrix zu eluieren, wurden zweimal jeweils 10 µl Nuklease-freies Wasser mittig auf die QIAquick Membran pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation bei RT folgte jeweils ein weiterer einminütiger Zentrifugationsschritt. Der Durchfluss, in dem sich die eluierte DNA befand, konnte bei -20° C gelagert werden.

2.4.2 Aufreinigung einer PCR-Reaktion

Die Aufreinigung einer PCR erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kit von Qiagen. Dabei werden 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 gewaschen. Zum Trocknen der Matrix folgten zwei Zentrifugationsschritte von je einer Minute. Bei der dritten Zentrifugation wurde ein neues Auffanggefäß verwendet, um sicher zu stellen, dass jeglicher Ethanol des PE-Puffers entfernt

wurde. Anschließend konnten die Amplimere mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert werden. Dies erfolgte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt.

2.5 Klonierungsverfahren

Bei einer Klonierung wird ein DNA-Fragment (z.B. die kodierende Sequenz eines Gens) in einen Vektor integriert. Dieses Konstrukt kann in unterschiedliche Wirte transformiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde als Empfängerorganismus stets das Bakterium *Escherichia coli* verwendet. Plasmidvektoren sind ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen repliziert und amplifiziert werden. Bei der herkömmlichen Klonierungstechnik werden Restriktionsendonukleasen verwendet, um Plasmidvektoren an der Klonierungsstelle aufzuschneiden, sodass einzelsträngige Überhänge an den Schnittstellen entstehen. An dieser Stelle können dann DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen inseriert werden. Vektoren enthalten meist Antibiotika-Resistenz-Gene, sodass nach einer Transformation des Konstruktes eine Selektion der positiv transformierten Zellen möglich ist. Die hier verwendeten Vektoren besaßen eine Ampicillin-Resistenz.

2.5.1 T/A-Klonierung

Im Falle der T/A-Klonierungstechnik erfolgt die Klonierung über Adenin- und Thymin-Überhänge. Hierfür wurde das pGEM T-Easy Vector System von Promega verwendet. Der enthaltene und linearisierte Vektor pGEM T Easy besitzt 3'-terminale Thymine an beiden Enden. Wenn das Insert aus einer PCR stammt, bei der eine Taq-Polymerase zum Einsatz kam, besitzen die DNA-Amplifikate 5'-terminale Adenine, da Taq-Polymerasen ihre DNA-Synthese mit einem Überhang an Adeninen abschließen. Der Plasmidvektor mit den Thymin-Überhängen und das Insert mit den Adenin-Überhängen können so miteinander hybridisieren und ligiert werden. Dabei ist die Insertionsrichtung nicht vorgegeben.

Die aus der RACE-PCR (2.2.1 und 2.2.2) stammenden 5'-und 3'-Fragmente konnten über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM T Easy integriert werden, da der BD Advantage 2 Polymerase Mix (BD Bioscience Clontech) eine Taq-Polymerase beinhaltet. Somit waren die DNA-Fragmente mit Adenin-Überhängen versehen.

Ligationsansatz bei Verwendung des pGEM T Easy Vector Systems (Promega) und dem 2x Rapid Ligation Puffer (Promega):

2,5 µl 2x Rapid Ligation Puffer, T4 DNA Ligase

0,5 µg pGEM T Easy Vektor (50 ng)

0,5 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl)

1,5 µl aufgereinigte DNA-Amplifikate

5 µl Nuklease-freies H₂O

Die Reagenzien wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Ansatz inkubierte 1 h bei RT. Danach erfolgte sofort die Transformation in *Escherichia coli*.

2.5.2 USER-Klonierung

Eine USER (uracil-specific excision reagent) –Klonierung (Nour-Eldin et al., 2006) ermöglicht rasches und sehr effizientes Klonieren eines PCR-Fragments ohne einen Ligationsschritt. Das Verfahren 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 ohne Ligation ein stabiles Hybridisierungsprodukt.

Durch eine 38 bp lange PacI-USER-Kassette werden Vektoren kompatibel für das USER-Verfahren hergestellt. Durch die Behandlung mit dem Restriktionsenzym PacI (New England Biolabs Inc.) werden die Vektoren aufgeschnitten. Mit Hilfe des Nickingenzym Nt.BbvCI (New England Biolabs Inc.), das nur einen Strang der doppelsträngigen DNA durchschneidet, entstehen 3'-Überhänge von 8 bp, die nicht komplementär zueinander sind. Diese Tatsache verhindert zum einen eine Re-Hybridisierung des Vektors und sorgt zudem für eine gerichtete Insertion.

Um die zu klonierenden PCR-Produkte in einen USER-Vektor integrieren zu können, müssen diese 5'-Überhänge besitzen, die komplementär zu den 3'-Überhängen der Vektoren sind. Diese „sticky ends“ werden mit speziell designten Primern erzeugt. Neben der Gen-spezifischen Sequenz werden den Primern Überhänge angehängt. Der sense-Primer erhält dabei die Basenpaarabfolge 5'- GGCTTAAU - 3', wohingegen beim antisense-Primer 5'- GGTTTAAU – 3' die USER spezifischen Überhangsequenz ausmacht. Beim Ablauf einer PCR werden die Amplimere um diese Basenpaare verlängert und somit USER-kompatibel. In diesen Sequenzverlängerungen ist das achte Nukleotid immer ein Uracil. Nach der PCR wird das PCR-Produkt mit einem USER Enzymmix, bestehend aus einer Uracil DNA Glycosylase und einer DNA Glycosylase-Lyase Endo VIII (New England Biolabs Inc.), behandelt. Diese Enzyme katalysieren die Abspaltung des Uracils aus dem im PCR-Produkt integrierten Primern und die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrates an dieser Stelle, sodass zum Vektor kompatible einzelsträngige Überhänge entstehen.

Für dieses Verfahren ist es wichtig die Amplifikation, wie in 2.2.3 beschrieben, mit einer DNA-Polymerase, wie der Phusion Cx DNA-Polymerase, durchzuführen. Da diese zwar eine Korrekturlese-Funktion (proof-reading) besitzt, aber so modifiziert wurde, dass sie Uracile in einem DNA-Molekül nicht als Fehler betrachtet (Norholm, 2010).

Durchführung einer USER-Klonierung:

Der für die USER-Klonierung vorbereitete Vektor, das PCR-Produkt und der USER Enzymmix (New England Biolabs Inc.) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 30 min bei 37°C und weitere 30 min bei 25°C in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler personal) inkubiert. Während dieser Zeit entsteht das stabile Hybridisierungsprodukt, das nun für Transformationen in entsprechend chemisch kompetente Bakterien verwendet werden konnte.

Reaktionsansatz:

1,5 µl Vektor

1 µl USER-Enzym Mix (1000 U/ml)

4,5 µl TE-Puffer

3 µl PCR-Produkt

2.5.3 Verwendete Vektoren zur USER-Klonierung

Alle verwendeten Vektoren zur Expression im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten wurden bereits USER-kompatibel von Prof. Dr. Dietmar Geiger, J-v-S Institut, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Sie basierten auf dem Ausgangsvektor pGEMKN und wurden wie in (Nour-Eldin et al., 2006) beschrieben modifiziert. Nach der Klonierung (2.5.2) und Transformation in *E. coli* (2.6.1) konnten positive Bakterienkolonien mittels der in den Vektoren enthaltenen Ampicillin-Resistenz-Gene selektiert werden. Für Interaktionsstudien mittels BiFC (engl. Bimolecular fluorescence complementation) waren die Vektoren pNBI u #18 und #20 jeweils downstream der USER-Kassette mit einer Hälfte der kodierenden Sequenz für das Fluoreszenzprotein YFP versehen. Dabei stellten die Aminosäuren 1-155 die N-terminale und die Aminosäuren 156-239 die C-terminale Hälfte dar. Somit entstanden nach Insertion des Zielgens die Fusionsproteine Zielgen::YC und Zielgen::YN, die in *Xenopus* Oozyten für BiFC-Experimente und somit für Interaktionsstudien dienen.

Im Folgenden werden die verwendeten Vektoren, ihre Bezeichnung, Funktion und Modifikation dargestellt.

Vektoren- nummer	Vektoren- bezeichnung	Funktion und Modifikation
#16	pNBI u	USER-kompatibler Oozyten- Expressionsvektor
#18	pNBI u C-term YC	USER-kompatibler Oozyten- Expressionsvektor; C-terminale YFP-Hälfte downstream der USER-Kassette; BiFC- Interaktionsstudien
#20	pNBI u C-term YN	USER-kompatibler Oozyten- Expressionsvektor; N-terminale YFP-Hälfte downstream der USER-Kassette; BiFC- Interaktionsstudien

Tabelle 2-5: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

2.6 Molekularbiologische Methoden mit *E.coli*

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

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden selbst hergestellte, chemisch kompetente *E. coli* Zellen verwendet, die auf dem Stamm von XL1-Blue MRF' (Stratagene) basieren. Da das Bakterium *E. coli* nicht von Natur aus kompetent ist, muss seine Zellwand durch eine chemische Vorbehandlung mit z.B. Kalziumchlorid für Plasmid-DNA durchlässig gemacht werden. Durch einen späteren Hitzeschock der Zellen kann die Plasmid-DNA letztendlich aufgenommen werden.

Die kompetenten MRF' Zellen wurden als 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.6.1 Bakterien-Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation ist ein Verfahren, um Plasmid-DNA in (chemisch) kompetente Bakterienzellen zu bringen. Die Transformation der Plasmid-DNA erfolgte durch einen Hitzeschock. Für die Transformation wurde zunächst ein bei -80°C gelagertes 50 µl-Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, um die vollständige Regeneration der geschädigten Zellwand zu verhindern. Dann wurde der Klonierungsansatz (z.B. eine USER-Reaktion oder eine T/A-Ligation) zu den Bakterien gegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis.

Anschließend sorgte ein Hitzeschock von 40 s bei 42°C im Wasserbad für die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien. Nach diesem Hitzeschock wurden die Bakterienstämme für weitere 5-10 min auf Eis inkubiert.

Handelte es sich bei dem Klonierungsansatz um eine USER-Reaktion, so konnten die transformierten Bakterien sofort auf LB-Agarplatten ausgestrichen werden.

Wenn der Ansatz der T/A-Klonierung transformiert wurde, so wurden anschließend 450 µl SOC-Medium zugegeben. Dieses Medium ist mit 0,4 % Glukose sehr nährstoffreich und sorgt dafür, dass die Bakterien schnell regenerieren und sich erneut teilen. Die Transformationsansätze wurden 45 min bei 37°C geschüttelt (Thermo Shaker TS-100, PeqLab).

Anschließend konnten auch diese transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen werden. Die Agarplatten 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 über Nacht bei 37°C.

2.6.2 Herstellung von Übernachtskulturen

Für eine Übernachtskultur wurden in einem 15 ml Falcon 5 ml LB-Medium, welches mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzt war, mit ca. 20 µl Flüssigkultur einer Bakterien-Kolonie oder einer gepickten Bakterien-Kolonie von einer LB-Platte angeimpft. Das Falcon mit dem angeimpften Medium wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Da es sich bei *E. coli* um einen fakultativ anaeroben Mikroorganismus handelt, erfolgte die Inkubation unter Schütteln (Inkubator Shaker Model G25“, New Brunswick scientific co. Inc), um ein optimales Wachstum der *E.coli*-Bakterien zu gewährleisten.

2.6.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien

Um die Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien zu isolieren, wurde eine Mini-Präparation mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen und nach den Herstellerinformationen durchgeführt. Dabei wird die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und den bakteriellen Proteinen getrennt.

Für dieses Verfahren wurden 1,5 ml einer Übernacht-Vorkultur der entsprechenden Bakterien in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 1 min bei Raumtemperatur (RT) und 9.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen,

und das Pellet in 250 µl P1-Puffer durch Vortexen gut resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellwände wurden 250 µl P2-Puffer hinzugegeben und sofort zweimal kurz gevortext. Nach einer Inkubation von ca. 3 min bei RT wurde mittels 350 µl N3-Puffer die Lysierung neutralisiert. Der Ansatz wurde wieder zweimal kurz gevortext und anschließend 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die Plasmid-DNA von Zellwandbestandteilen, genomischer DNA, Lipiden und Proteinen zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und in die QIAprep spin columns gegeben, welche für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurden. Dabei verblieb die Plasmid-DNA an der Säulenmatrix und konnte mit 750 µl PE-Puffer und einer weiteren 1minütigen Zentrifugation gewaschen werden. Der Durchfluss wurde verworfen und der noch an der Säule haftende Waschpuffer durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt entfernt. Anschließend wurde 50 µl Nuklease-freies Wasser mittig auf die Säulenmatrix pipettiert und für 1 min inkubiert. Die darauffolgende Elution der Plasmid-DNA erfolgte bei einer Zentrifugation für 1 min. Die Konzentration der nun isolierten Plasmid-DNA wurde mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) photometrisch ermittelt. Die isolierte Plasmid-DNA konnte nun bei -20° C gelagert werden.

2.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Grundlagen der Sequenzierung beruhen auf der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Das Sequenzieren diente zur Kontrolle und Verifizierung der amplifizierten und klonierten Gensequenzen (2.2.3) und zur Identifikation der Start- und Stopcodons von 5´- und 3´-RACE-PCR Produkten (2.2.1, 2.2.2). Diese wurden extern bei den Sequenzierungsdienstleistern GATC-Biotech oder LGC Genomics durchgeführt. Als Proben dienten die aufgereinigten, amplifizierten DNA-Fragmente (2.4.2), sowie die isolierten Plasmid-DNAs, in Form einer Minipräparation (2.6.3). Entsprechend der GATC oder LGC Vorgaben wurden die DNA-Templates verdünnt und vorbehandelt. Um die Zielgene oder Fragmente zu sequenzieren, wurden jeweils Vektor-spezifische Primer verwendet.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit der Software Vector NTI von Invitrogen.

2.8 *In-vitro* Transkription

Aus einer DNA-Matrize kann durch die *in vitro* Transkription cRNA synthetisiert werden. Dafür muss die Template-DNA über einen Promotor für die RNA-Polymerase verfügen (z.B. T7-Promotor für die T7-RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen).

2.8.1 cRNA-Synthese

Als Template für die cRNA-Synthese wurde die aufgereinigte IVT-PCR (2.2.4) benutzt. Die DNA-Matrize liegt somit gereinigt (2.4.2) und linearisiert vor und besitzt den T7-Promotor. Die Herstellung von cRNA wurde mit dem AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit von Cellscript Inc. durchgeführt.

Für einen halben Reaktionsansatz wurde zu 0.5-1 µg der linearisierten, aufgereinigten IVT-PCR

1 µl AmpliCap-Max T7 Transcription Puffer

4 µl AmpliCap-Max Cap/NTP PreMix (22.5 mM ATP, CTP und UTP, 4.5 mM GTP, 18 mM m7G[5']ppp[5']G)

1 µl DTT (100 mM)

0.25 µl ScriptGuard RNase Inhibitor

1 µl AmpliCap-Max T7 Enzym Solution

gegeben.

Der gut durchmischte und abzentrifugierte Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 20 µl Ammoniumacetat-Präzipitationslösung (5 M) wurde die zuvor ablaufende Reaktion gestoppt. Es folgte eine Inkubation für mind. 30 min bei -20°C, in der die synthetisierte RNA ausfiel. Nach einer Zentrifugation bei 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417R) für 30 min konnte der Überstand entfernt und die cRNA mit 0.5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen werden. Dies geschah mittels einer weiteren Zentrifugation bei 4°C für 5 min. Hierbei sollte das Pellet deutlich sichtbar sein. Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet für ca. 15 min in einem 37°C-Heizblock getrocknet. Anschließend konnte die entstandene cRNA in 10 µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.8.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die cRNA kann, wie auch DNA, 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 %-iges RNA-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 37 %-iges Formaldehyd 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.

Die RNA-Proben wurden wie folgt behandelt, bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden.

1 μ l cRNA

3 μ l 4x RNA-Probenpuffer

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. Die Dokumentation erfolgte photographisch am UV Imaging System (Intas UV Imager).

2.9 *Xenopus laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Der Glatte Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gehört zur Gattung der Krallenfrösche (*Xenopus*). Seine natürliche Verbreitung beschränkt sich vor allem auf Südafrika.

Seine Oozyten zeichnen sich durch ihren dotterreichen, hellen vegetativen und durch den dunklen animalen Pol aus. Ein Froschei hat einen Durchmesser von ca. 1 mm und enthält eine große Menge Zytoplasma mit Speicherstoffen für das Wachstum des Embryos. Die Oozyten eignen sich durch ihre hohe Anzahl an maternalen Ribosomen und den für die Translation wichtigen Bestandteilen ausgezeichnet als heterologes Expressionssystem.

Bereits seit 1971 werden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem erfolgreich eingesetzt. Gurdon et al. entdeckten, dass nach Injektion von Fremd-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. (Gundersen et al., 1983; Miledi et al., 1983) gezeigt werden. Heute zählt dieses Expressionssystem zu den Standardmethoden bei der Translation von klonierten und eventuell mutierten tierischen und pflanzlichen Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren.

Dieses heterologe Expressionssystem weist mehrere Vorteile gegenüber nativen Geweben und anderen heterologen Expressionssystemen auf. Die Oozyten lassen sich sehr gut mit der DEVC-Methode (Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik) untersuchen, da sie wegen ihrer Größe relativ leicht angestochen werden können und wegen ihrer relativ großen Oberfläche Ströme im μ A-Bereich zeigen können. Ebenso besitzen sie eine hohe Translationsfähigkeit und führen die meisten posttranslationalen Modifikationen an fremden Proteinen sowie deren richtigen Einbau in die Zellmembran durch.

2.9.1 Gewinnung der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die südafrikanischen Krallenfrösche wurden in kleinen Gruppen in Aquarien bei 20-22°C Wassertemperatur gehalten.

Die Oozyten wurden bei einer Operation des Frosches gewonnen (Stuhmer et al., 1987). Hierzu wurde er mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-ethylester; 0,75 g/l) narkotisiert und anschließend auf Eis gebettet. Die Bauchhaut und das darunter befindliche Muskelgewebe konnte aufgeschnitten und die Ovarlappen mit einer Pinzette entnommen werden. Nach der Entnahme der Oozyten wurde der Frosch mit einigen Stichen zugenäht.

Die Ovarlappen wurden unter dem Binokular mit Uhrmacherpinzetten grob zerrissen, um die Zugänglichkeit der einzelnen Oozyten für Enzyme bei den weiteren Schritten zu verbessern. Anschließend konnten sie nach mehrmaligem Waschen mit Ca²⁺-freier ND96-Lösung einem Collagenaseverdau (0,25-0,27 PZU/mg, Raumtemperatur, 1,5 h) unterzogen werden. Dieser Verdau entfernte das restliche Bindegewebe, Follikelzellen und Blutgefäße und führte schließlich zur Vereinzelnung der Oozyten (Guan et al., 2013). Zur Aufbewahrung wurde die ND96-Lösung mit Gentamycin (50 mg/l) und 1 mM Kalzium versehen. In dieser Lösung konnten die uninjizierten und injizierten Oozyten bei 16°C einige Tage aufbewahrt werden.

Reagenz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Hepes	10 mM; pH 7.4 mit NaOH
Gentamycin	100 µg/ml
mit D-Sorbitol auf	220 mosmol/kg
Ca ²⁺ -freie ND96	ohne CaCl ₂ und Gentamycin

Tabelle 2-6: Zusammensetzung der ND96-Lösung

2.9.2 Injektion von cRNA in die Oozyten von *Xenopus laevis*

Innerhalb von 24 h nach der Präparation der Oozyten erfolgte mit Hilfe des Nanoject II Auto Nanoliter Injectors (Drummond) die Injektion der cRNA eines Ionenkanals. 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 µm. Mit Hilfe eines Mikroskops (Mikroschmiede, Leitz) konnte die feine Spitze schräg abgebrochen werden, um die Membran

der Oozyte nicht unnötig zu verletzen. Zur Injektion musste die Mikropipette vollständig mit einem inerten, inkompressiblen Öl gefüllt werden, bevor die cRNA in die Spitze der Kapillare aufgezogen wurde. Für elektrophysiologische Charakterisierungen wurden 50 nl der cRNA (500 ng/ μ l) mit einem Druckstoß injiziert (Guan et al., 2013; Imes et al., 2013). Die injizierten Oozyten wurden in ca. 4 bis 5 ml ND96-Lösung mit Gentamycin (50 mg/l) und 1 mM Kalzium bei 16°C aufbewahrt. Je nach Konstrukt war nach 1-3 Tagen das Expressionsniveau so hoch, dass die Oozyten zu Messungen mit der DEVC-Technik genutzt werden konnten.

2.10 Interaktionsstudien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen wurden verschiedenste Techniken entwickelt. Zum Beispiel stellen Yeast Two-Hybrid (Mendelsohn and Brent, 1999), Ko-Immunopräzipitation (Selbach and Mann, 2006), BiFC oder FRET (Ciruela, 2008) oft verwendete mikrobiologische, biochemische oder auf Fluoreszenz-basierende Methoden dar. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde auf die weitverbreitete Fluoreszenz-basierende Technik BiFC zurückgegriffen.

2.10.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Interaktionsstudien können zur Aufklärung der Regulation von Transportproteinen beitragen. Eine Methode, eine Interaktion zwischen Proteinen in lebenden Zellen sichtbar zu machen, ist die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (engl. bimolecular fluorescence complementation, BiFC). Diese Technik beruht auf der Fusion der zu untersuchenden Proteine mit nicht-fluoreszierenden Fragmenten eines Fluoreszenzproteins. Interagieren die Proteine miteinander so können die beiden Hälften des Fluorophors sich zusammenlagern, sodass es zur Fluoreszenzkomplementation kommt. Der zusammengefügte Komplex zeigt eine starke intrinsische Fluoreszenz, die eine direkte Visualisierung möglich macht ohne die Zugabe weiterer Reagenzien. Somit ist BiFC eine technisch einfache Methode Proteininteraktionen nachzuweisen (Kerppola, 2008). Allerdings können sich auch Nachteile bei der Verwendung dieser Methode ergeben. Diese Technik kann nicht zur Echtzeit-Analyse von Interaktionen verwendet werden (Kerppola, 2008). Zudem ist die Fluorophorkomplementation irreversibel und beide getrennte Fragmente zeigen die Tendenz zur Selbstkomplementation, was zu falsch positiven Interaktionen führen kann (Walter et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden zu Interaktionsstudien die zu untersuchenden Proteine in die BiFC-kompatiblen Oozyten-Vektoren (Tabelle 2-5) mit Hilfe der USER-Technik (2.5.2) kloniert. Als

Fluoreszenzprotein diente hierbei das YFP (yellow fluorescent protein). Nach Injektion der Konstrukte in *Xenopus* Oozyten konnte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop die BiFC-Analyse durchgeführt werden.

2.10.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die Aufnahmen der BiFC-Analysen in *Xenopus laevis* Oozyten wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop von Leica (Leica DM6000 CS, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Das Fluorophor YFP wurde bei der Wellenlänge 514 nm mittels eines Argon-Lasers angeregt. Als Objektiv diente das Leica HCX IRAPO L25x/0.95W und mit Hilfe der Software LAS AF (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) konnten die Aufnahmen erstellt werden (Maierhofer et al., 2014). Die Emission des YFPs wurde in einem Wellenlängenbereich von 528 bis 580 nm detektiert und in den Aufnahmen als gelbe Pixel dargestellt.

2.11 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik

Für die elektrophysiologische Untersuchung von elektrogenen Rezeptoren, Ionenkanälen und Transportern in *Xenopus laevis* Oozyten wird das seit längerem etablierte Messsystem der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (engl. Double-Electrode Voltage-Clamp, DEVC) herangezogen. Diese Methode ermöglicht eine funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Membrantransportproteinen, sowie Einblicke in deren Regulation (Gurdon et al., 1971; Finkel and Redman, 1984; Hille, 1992).

Nach der Expression der Kanäle in *Xenopus* Oozyten konnten so ihre spezifischen Kanalparameter bestimmt werden. Dies erforderte die Stromableitung von der Plasmamembran der Oozyten bei einer vorgegebenen konstanten Membranspannung. Angesichts der Membranströme konnte die Konstanz der Membranspannung bei gleichzeitiger Messung des über die Membran fließenden Stroms durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermöglicht werden (Finkel and Gage, 1985). Die Grundprinzipien dieser Messtechnik werden im Folgenden kurz beschrieben.

2.11.1 Das Messprinzip

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (Abbildung 2-1) werden zwei Mikroelektroden in die Oozyten eingestochen (Guan et al., 2013). Die Spannungselektrode (PE) misst das Membranpotential (U_{mem}) in Relation zum Potential der Badelektrode (Referenzelektrode, RE). Die Stromelektrode (SE) appliziert einen Strom, um die vorgegebene Potentialdifferenz aufrechtzuerhalten. Dies geschieht über eine Rückkopplungsschleife. Der zu applizierende Strom wird durch die Differenz der aktuellen Membranspannung (U_{mem}) und der vorgegebenen Kommandospannung (U_{Soll}) errechnet. Vermittelt ein Transportprotein einen Strom, so kompensiert der Verstärker (MV) den daraus resultierenden Spannungsabfall über der Oozytenmembran mit der Applikation eines Gegenstroms, der in seiner Amplitude genau dem Strom entspricht, der durch das Transportprotein fließt. D.h. der applizierte Strom zur Aufrechterhaltung der Membranspannung (U_{mem}) ist indirekt proportional zum Transportprotein vermittelten Strom. Zur Untersuchung elektrophysiologischer Charakteristika eines elektrogenen Transportproteins werden sprunghafte Änderungen der Membranspannung an der Oozytenmembran angelegt. Diese schnellen Änderungen der Membranspannung (U_{mem}) sorgen dafür, dass sich der gemessene Strom aus einem kapazitiven Strom (I_{kap}) und dem Kanalstrom zusammensetzt. Der kapazitive Strom entsteht durch die Umladung der Membran und fließt nur in einem kurzen Zeitraum (1-2 ms) nach der Änderung der Membranspannung (U_{mem}). Aus diesem Grund stört in diesem Fall der kapazitive Strom nicht bei der elektrophysiologischen Charakterisierung des Kanals und es musste keine Kompensation dieser Ströme vorgenommen werden.

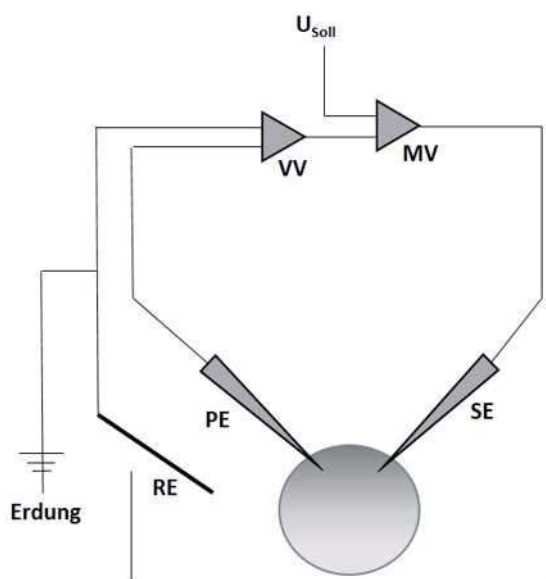


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik

Über die Potentialelektrode (PE) und dem Vorverstärker (VV) wird das Membranpotential (U_{mem}) ermittelt. Entspricht dies nicht der Sollspannung (U_{Soll}), wird mittels des Messverstärkers (MV; Differenzialverstärker) über die Stromelektrode (SE) Strom appliziert, sodass U_{mem} gleich U_{Soll} ist. Die Referenzelektrode (RE; Badelektrode) dient als Referenz für PE und SE und ebenso als Erdung.

2.11.2 Der Messaufbau

Um mechanische Störungen der Umgebung weitestgehend auszugleichen, befand sich der mechanooptische Teil der Messapparatur auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Dieser Teil setzte sich aus der Badkammer mit Perfusionssystem, den Mikromanipulatoren (Micromanipulator, Märzhäuser MM33, Drummond Scientific Company, Broomall, USA) und der Stereolupe (SZ40, Olympus) inklusive einer Lichtquelle (KL 1500 electronic, Schott) zusammen. Gegenüber elektrischen Störungen der Umwelt wurde die Messapparatur durch einen Faradaykäfig abgeschirmt. Die leitenden Elemente der Messeinheit wurden unter Vermeidung von Erdungsschleifen geerdet. Die Oozyte wurde in die Badkammer gelegt, in der sie gleichmäßig mit der jeweiligen Messlösung umspült wurde. Die Fließgeschwindigkeit der Lösung wurde durch das Perfusionssystem vorgegeben. Die Mikromanipulatoren ermöglichten eine Bewegung der Glaselektroden in alle drei Raumrichtungen, sowie den Einstich in die Oozyte. Die Referenzelektrode (RE) war an die Erde des Vorverstärkers (VV) der Spannungselektrode (PE) angeschlossen und wurde in Nähe der Oozyte in die Badlösung eingetaucht. Die elektronischen Elemente mit Ausnahme des Vorverstärkers waren außerhalb des Faradaykäfigs lokalisiert. Über den Vorverstärker wurde die von der Membran abgeleitete Stromantwort in den eigentlichen Messverstärker (MV) (Turbo TEC 01C, NPI electronics, Tamm, Deutschland) geleitet. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren wurde das Signal im Messverstärker tiefpassgefiltert. Dies konnte auf dem computersimulierten Oszilloskop verfolgt werden, wobei der dafür verwendete Messrechner (IBM PC, Maxdata) über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation) mit dem Messverstärker verbunden war. Mit Hilfe des Pulsgenerators im Programm Patchmaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) konnten verschiedene Spannungsprotokolle erstellt und mittels des Messrechners über den Spannungseingang/-ausgang des Messverstärkers an die Membran angelegt werden. Vor den Messungen wurde nach dem Eintauchen der Glaselektroden in die Badlösung die Widerstände überprüft und ein Strom- sowie Spannungsabgleich vorgenommen. Der Einstich in die Oozyte erfolgte mit Hilfe eines akustischen Signals des Verstärkers.

2.11.3 Elektroden und Pipetten

Die Mess- und Referenzelektroden waren Silber/Silberchlorid-Elektroden. Diese wurden hergestellt, indem ein Silberdraht (World Precision Instruments Inc., USA) mit einem Chloriergerät (ACI-01, npi-Electronics, Tamm, Deutschland) in 2 M KCl-Lösung elektrolytisch chloriert wurde. Da die Messlösungen Chloridionen enthielten, konnte es zu einer

Potentialänderung an der Referenzelektrode kommen. Dies wurde minimiert, indem die Referenzelektrode in einen mit 3 M KCl gefüllten Schlauch gesteckt wurde. Somit konnten die Cl⁻-Konzentrationsunterschiede der Messlösungen innerhalb einer Messreihe vernachlässigt werden. Der Schlauch wurde mit einem Agarstopfen verschlossen (2 % Agar in 3 M KCl), um die Diffusion von K⁺ und Cl⁻ in die im Vergleich niedermolaren Messlösungen zu verhindern. Die Einstichpipetten wurden mit Hilfe eines Kapillarziehgerätes (Scientific Instrument Lab, Narishige Japan) aus Borosilikatglaskapillaren (KWIK-FIL™, World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) gezogen und mit einer Kanüle mit 3 M KCl-Lösung befüllt. Der Öffnungsdurchmesser der Pipetten wurde so groß gewählt, dass ein Widerstand von 0,5 bis 1,5 MΩ zwischen dem Inneren der Kapillare und der Badlösung zu messen war. Außerdem konnte dadurch die Diffusion der Pipettenlösung in das Zytosol der Oozyten unterbunden werden. Die Einstichpipetten wurden auf die Silber/Silberchlorid-Elektroden des Vorverstärkers gesteckt.

2.11.4 Konventionen

Die Membran wird durch die Potentialdifferenz der zytosolischen Membranseite und des extrazellulären Raums vorgegeben. Da das extrazelluläre Potential konventionsgemäß auf Null gesetzt wird, ist ein Kationeneinstrom in die Zelle als negativer elektrischer Strom definiert. Ein Kationenausstrom entspricht somit einem positiven Strom.

2.11.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle

Der Einstich in die Oozytenmembran erfolgte im Stromklemmen-Modus. Aufgrund des Diffusionspotentialgradienten der Chloridionen zwischen den Elektroden und den Badlösungen wurden nach dem Eintauchen der Elektroden die Offset-Potentiale durch das Potentiometer auf Null abgeglichen und anschließend die Pipettenwiderstände überprüft. Lagen diese in einem Bereich von 0,5 bis 1,5 MΩ, wurden sie zum Einstechen in die Membran verwendet. Das Einstechen wurde mikroskopisch und akustisch verfolgt und kontrolliert. Um die Abdichtung zwischen Membran und Elektrode zu überprüfen und gegebenenfalls vorhandene Leckströme zu detektieren, wurde ein Testpuls appliziert. Dies erfolgte im Spannungsklemmen-Modus. Es wurde eine Haltespannung U_H von -20 mV gewählt, da dieses Potential annähernd dem natürlichen Membranpotential der Oozyten entspricht. Während des Testpulses wurde, ausgehend von der Haltespannung, im Wechsel für 10 ms Spannungssprünge von +20 und -20 mV angelegt.

Singlepuls-Messungen wurden bei unterschiedlichen Spannungen durchgeführt, um die durch die exprimierten Transportproteine verursachten Ströme in verschiedenen Lösungen zu detektieren. Die Wahl der applizierten Spannung richtete sich dabei nach dem zu untersuchenden Transportprotein und Oozyten-Batch.

Für die detailliertere Charakterisierung der Proteine wurde ihr Verhalten in Abhängigkeit von der Membranspannung untersucht. Es wurden zwei verschiedene Spannungsprotokolle, Einfachspannungspuls-Protokoll und Zweifachspannungspuls-Protokoll, appliziert. Beim Einfachspannungspuls (Abbildung 2-2) folgte ausgehend von der Haltespannung U_H eine Testspannung U_T . Diese wurde im Standardprotokoll von +60 mV bis zu -200 mV in 10 mV Schritten bei jedem Durchlauf abgesenkt. Anschließend wurde zur Haltespannung zurückgekehrt. Hingegen wurde beim Zweifachspannungspuls-Protokoll (Abbildung 2-2) zwischen der anfänglichen Haltespannung und der Testspannung eine Vorpulsspannung U_{VP} eingefügt. Diese Vorpulsspannung betrug im gezeigten Beispiel -100 mV und diente zur Voraktivierung der Transportproteine. Die Testspannungen wurden wieder in einem Bereich von +60 mV bis zu -200 mV in jedem Durchlauf in 10 mV Schritten verändert. Die darauffolgende Folgepulsspannung U_F betrug +10 mV, bevor die Membran auf die vorhergehende Haltespannung geklemmt wurde. Die Standard-Spannungspuls-Protokolle wurden hinsichtlich der Spannungen oder der Zeit den zu untersuchenden Transportproteinen und dem jeweiligen Oozyten-Batch angepasst.

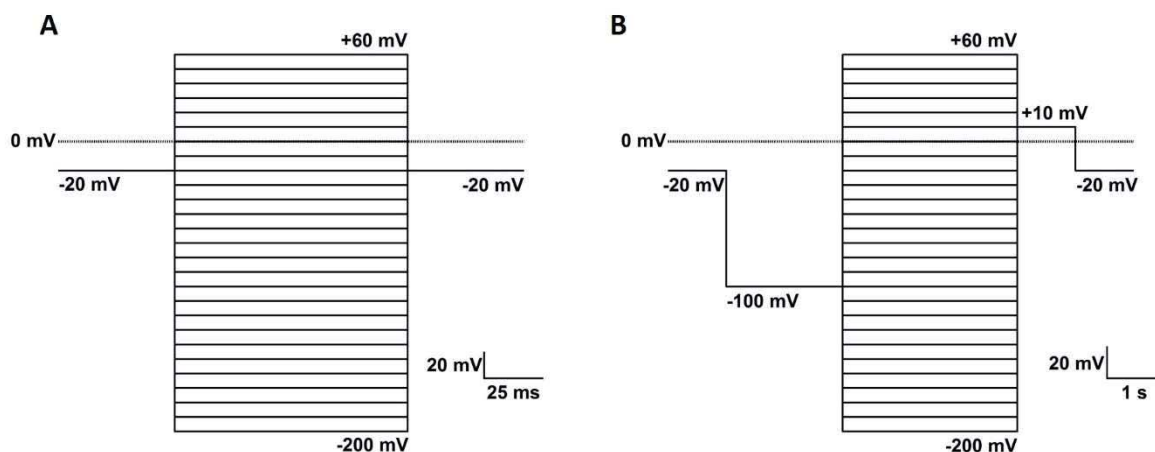


Abbildung 2-2: Standard-Spannungspuls-Protokolle zur Messung der *Dionea* Transportproteine

(A) Das Beispiel eines Einfachspannungspuls-Protokoll zeigt, dass ausgehend einer Haltespannung U_H von -20 mV für 100 ms die Testpulse erfolgen bevor zu U_H zurückgekehrt wird. Die Testpulse werden in 10 mV Schritten herabgesetzt und decken einen Spannungsbereich von +60 bis -200 mV ab. (B) Beim beispielhaften Zweifachspannungspuls-Protokoll folgt nach U_H eine Voraktivierung bei -100 mV. Die Testpulse bewegen sich wie in A in einem Spannungsbereich von +60 bis -200 mV und werden in 10 mV Schritten verringert. Nach den Testspannungen schließt sich ein Folgepuls U_F bei +10 mV an, bevor zu U_H zurückgekehrt wird.

2.11.6 Messreihen und Messlösungen

Die verschiedenen Transportproteine wurden auf ihre pH-Abhängigkeit und ihre Selektivität hin untersucht. Zudem erfolgten weitere Charakterisierungen über verschiedene Substratkonzentrationen und über ihre Temperaturabhängigkeit. Für die einzelnen Messreihen wurden folgende Lösungen hergestellt.

K⁺-Kanal DmKT1

Standardlösung	100 mM KCl und 100 mM LiCl; pH 4
K ⁺ -Konzentrationsabhängigkeit	1, 5, 10, 30, 50, 70 und 100 mM KCl; pH 4
Selektivitätsmessung	LiCl, KCl, NaCl, RbCl, NH ₄ Cl, NMDG-Cl, CsCl (je 100 mM); pH 4
pH-Abhängigkeit	100 mM KCl mit pH 3, 4, 5 und 6

K⁺-Transportprotein DmHAK5

Standardlösung	2 mM KCl und 2 mM LiCl; pH 4
Selektivitätsmessung	LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl, NH ₄ Cl, NMDG-Cl (je 2 mM); pH 4
	200 mOsmol/kg Sorbitol ±2 mM KCl; pH 4
	100 mM NaCl ±2 mM KCl; pH 4
	100 mM NH ₄ Cl ±2 mM KCl; pH 4
K ⁺ - und pH-Abhängigkeit	0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 1 und 2 mM KCl; pH 3, 4 und 5
	100 mM KCl; pH 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5 und 3
Messung zum Ammoniumeinfluss	0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 und 10 mM NH ₄ Cl; pH 4
Einfluss der internen Ansäuerung	10 mM NaAc; pH 5.6
	2 mM KCl; pH 5, 4 und 3
Temperatur-Abhängigkeit	2 mM KCl; pH 3

Na⁺-Kanal DmHKT1

Standardlösung	100 mM NaCl und 100 mM LiCl; pH 5.6
Na ⁺ -Abhängigkeit des Wildtyps und der Mutanten	1, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 70 und 100 mM NaCl; pH 5.6
Selektivitätsmessung des Wildtyps und der Mutanten	LiCl, NMDG-Cl, KCl, RbCl, CsCl, NaCl (je 100 mM); pH 5.6

pH-Abhängigkeit	100 mM NaCl; pH 4, 6 und 8
Weitere Lösungen für die Messung der Mutanten	100 mM NaCl, KCl, und LiCl; pH 5.6 10 mM NaCl, 10 mM KCl und 10 mM NaCl + 10 mM KCl; pH 5.6
Messung des AMFEs	50 mM KCl + 50 mM LiCl 1 mM NaCl + 49 mM KCl + 50 mM LiCl 3 mM NaCl + 47 mM KCl + 50 mM LiCl 5 mM NaCl + 45 mM KCl + 50 mM LiCl 10 mM NaCl + 40 mM KCl + 50 mM LiCl 20 mM NaCl + 30 mM KCl + 50 mM LiCl 30 mM NaCl + 20 mM KCl + 50 mM LiCl 40 mM NaCl + 10 mM KCl + 50 mM LiCl 45 mM NaCl + 5 mM KCl + 50 mM LiCl 47 mM NaCl + 3 mM KCl + 50 mM LiCl 49 mM NaCl + 7 mM KCl + 50 mM LiCl 50 mM NaCl + 50 mM LiCl; pH 5.6

Jede Lösung enthielt zusätzlich 1 mM Kalziumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid. Die pH-Werte wurden mit MES/Tris (pH 6 – 7) und Citrat/Tris (pH 4 – 5) gepuffert und deren Einstellung erfolgte mit Hilfe eines pH-Meters. Bei Messungen mit variierenden Testionenkonzentrationen wurde auf 100 mM mit LiCl ergänzt. Ausgenommen sind dabei die verwendeten Lösungen für die Charakterisierung von DmHAK5, bei denen die Einstellung der Ionenstärke mit Sorbitol erfolgte. Des Weiteren wurde unter osmometrischer Kontrolle (Vapor Pressure Osmometer 5500, Schlag GmbH, Bergisch Gladbach) die Osmolalität der Messlösungen mit D-Sorbitol auf 220-240 mOsmol/kg eingestellt. Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Herstellung aller verwendeten Lösungen, ebenso wie die Durchführung der Experimente, bei Raumtemperatur (20-25°C). Eine Ausnahme stellten dabei die Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der Transportproteine dar, die bei einer Badtemperatur von 10, 20 und 30 °C erfolgten.

2.12 Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse

Aus den in Abbildung 2-2 gezeigten Spannungspuls-Protokollen oder auch den der Transportproteinen entsprechenden modifizierten Protokollen konnten die im Folgenden charakteristische Merkmale entnommen werden

Am Ende der Testspannungen U_T wurden die Gleichgewichtsströme I_{SS} („steady-state“-Ströme) abgelesen. Diese ergeben sich aus der Spannungs-abhängigen Relaxation in ein neues Gleichgewicht. Die instantanen Ströme („tail“-Ströme) I_T treten direkt nach dem Abklingen der kapazitiven Ströme I_{KAP} auf, die sich aufgrund der Umladung der Membran bei sprunghaften Spannungsänderungen ergaben. Diese instantanen Ströme können nach einer Voraktivierung der Proteine durch einen Vorpuls U_{VP} im Testspannungsbereich abgeleitet werden. Die Gabe einer Folgespannung U_F führte zu einem Folgepulsstrom I_F , der direkt nach dem Abklingen von I_{KAP} abgelesen wurde. Diese drei Stromkenngößen (I_{SS} , I_T , I_F) liefern weitreichende Aussagen über charakteristische Merkmale der Transportproteine.

Ganzzellströme über der Oozytenmembran können durch folgende Gleichung (1) ausgedrückt werden, sobald ein Transportprotein nur in zwei Zuständen, dem offenen und dem geschlossenen Zustand, vorliegen kann.

$$I(U,t) = N * i(U, \Delta C^+) * p_o(U,t)$$

GLEICHUNG 1

I = Ganzelloozytenstrom, abhängig von der Spannung und der Zeit

N = Anzahl der aktivierbaren Kanäle

i = Einzelkanalstrom, abhängig von der Spannung und dem Konzentrationsgradienten des permeierenden Kations

p_o = Offenwahrscheinlichkeit, abhängig vom Membranpotential und der Zeit

2.12.1 Spannungsabhängigkeit

Am Ende der Testspannungen U_T sind die Transportproteine in einen Spannungs-abhängigen Gleichgewichtszustand relaxiert, sodass sich der über die Membran fließende Strom in einem thermischen Gleichgewicht befindet. Dieser Gleichgewichtsstrom I_{SS} wird wie der Ganzzellstrom (Gleichung (1)) durch die Anzahl der aktivierbaren Kanäle, dem Einzelkanalstrom und der Offenwahrscheinlichkeit beschrieben.

Die in Gleichung (1) angegebene Offenwahrscheinlichkeit kann durch die Boltzmann-Statistik ausgedrückt werden. Trifft man nun die Annahme, dass das Transportprotein nur in einem Zustand für ein Ion leitend ist, d.h. nur die Konformationen offen (leitend) und geschlossen

(nicht leitend) vorkommen können, so kann die Besetzungswahrscheinlichkeit dieser beiden Zustände beschrieben werden durch:

$$\frac{p_0}{p_{\text{geschl}}} = e^{\frac{\Delta G}{k^*T}}$$

GLEICHUNG 2

p_0 = offene, leitende Besetzungswahrscheinlichkeit

p_{geschl} = geschlossene, nicht leitende Besetzungswahrscheinlichkeit

ΔG = Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen offen und geschlossen

Betrachtet man die Offenwahrscheinlichkeit als Funktion der Membranspannung (Gleichung (3)), so müssen bei einem Spannungs-abhängigen Übergang von einem Zustand in den Anderen Ladungen, die mit dem Transportproteinen assoziiert oder integriert sind, über die Membran fließen (Hodgkin et al., 1952). Die Energiedifferenz ΔG wird hierbei beschrieben durch $z \cdot e_0 \cdot U$, wobei das Elementarladungsäquivalent z die Anzahl der bewegten Elementarladungen e_0 angibt. Ist $\Delta G = 0$, so ist die Besetzungswahrscheinlichkeit im offenen und geschlossenen Zustand gleich. Dabei entspricht die Membranspannung U der halbmaximalen Aktivierungsspannung $U_{1/2}$.

$$\frac{p_0}{p_0 + p_{\text{geschl}}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{(U-U_{1/2}) \cdot z \cdot e_0}{k^*T}}}$$

GLEICHUNG 3

Zum Beschreiben der Spannungs-abhängigen Offenwahrscheinlichkeit p_0 eines Transportproteins wird oft die halbmaximale Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ herangezogen. Diese wird durch die Analyse der Folgepulsströme I_F direkt nach dem Abklingen von I_{KAP} bestimmt ($t = 0$).

$$I_F(t=0) = N \cdot i(U_F) \cdot p_0(U_T)$$

GLEICHUNG 4

Da der Folgepuls in einem Spannungspuls-Protokoll immer zur gleichen Spannung springt und somit der Term $N \cdot i(U_F)$ konstant ist, sind die daraus resultierende Folgepulsströme I_F ein direktes Maß für die Spannungs-abhängige Offenwahrscheinlichkeit p_0 .

2.12.2 Bestimmung der Permeabilitätseigenschaften eines Transportproteins mittels Umkehrpotentialen

Das Umkehrpotential U_{rev} eines Transportproteins beschreibt die Membranspannung bei der der Nettostromfluss, d.h. die Summe aller Ströme über der Membran, gleich Null ist. Ein Ionenfluss über die Membran stellt dabei den Stromfluss dar und bewegt sich entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Zur Bestimmung von U_{rev} findet eine Voraktivierung der Proteine statt, da das Spannungs-abhängige Schalten im Vergleich zur instantanen Membranspannungsänderung langsamer ist. Somit ist durch den konstanten Vorpuls (U_{VP}) die Anzahl der geöffneten Transportproteine N konstant. Zudem ist zu diesem Zeitpunkt die Offenwahrscheinlichkeit p_0 konstant, weil immer zur gleichen Vorpulsspannung gesprungen wird. Dies führt dazu, dass die instantanen Transportströme I_T proportional zum Einzelkanalstrom i sind und U_{rev} aus I_T ermittelt werden kann.

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK-Gleichung) können Umkehrpotentiale von Transportproteinen, die für verschiedene Ionensorten leitend sind, berechnet werden (Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949).

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} * \ln \frac{P_X * [X^+]_{au\beta en} + P_Y * [Y^+]_{au\beta en} + P_Z * [Z]_{au\beta en}}{P_X * [X^+]_{in nen} + P_Y * [Y^+]_{in nen} + P_Z * [Z]_{in nen}}$$

GLEICHUNG 5

R = Gaskonstante (8.3144598 J/mol*K)

T = absolute Temperatur in °Kelvin

F = Faradaykonstante (96485.33289 C/mol)

P = Permeabilitätskoeffizient der einzelnen Ionen

$[X^+, Y^+, Z^-]$ = Konzentration der einzelnen Ionen X, Y, Z

Ist das Transportprotein nur für eine einwertige Ionensorte (C^+ = Kation) leitend, so richtet sich U_{rev} nur nach dem elektrochemischen Gradienten für dieses Ion und Gleichung (5) vereinfacht sich zur Nernst-Gleichung.

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} * \lg \frac{P_C * [C^+]_{au\beta en}}{P_C * [C^+]_{in nen}}$$

GLEICHUNG 6

Die Nernst-Gleichung kann bei einer absoluten Temperatur von 298,15 K weiter vereinfacht werden.

$$U_{rev} = 59,1 \text{ mV} * \ln \frac{P_C * [C^+]_{au\ss en}}{P_C * [C^+]_{innen}}$$

GLEICHUNG 7

Nach dieser Gleichung verschiebt sich das Umkehrpotential U_{rev} bei einer 10-fachen Konzentrationsänderung des permeierenden Ions um 59,1 mV.

2.12.3 Bestimmung der Kationen-abhängigen „cord conductance“

Das Ohmsche Gesetz definiert den Zusammenhang von elektrischen Strömen und der elektrischen Spannung bei einem gegebenen spezifischen Widerstand. Die Leitfähigkeit (engl. conductance) ergibt sich aus dem Kehrwert des Widerstands. Bei der Betrachtung der Strom-Spannungs-Beziehungen von Transportproteinen muss allerdings die elektromotorische Kraft des transportierten Ions berücksichtigt werden. D.h. neben der angelegten Spannung hat der über der Membran anliegende chemische Gradient ebenfalls einen Einfluss auf die Stromamplitude, sodass zur Beschreibung von Ionenströmen über elektrogene Transportproteine das Ohmsche Gesetz wie folgt von Hodgkin und Huxley modifiziert wurde (Hodgkin et al., 1952).

$$I = G * (U - U_{rev})$$

GLEICHUNG 8

I = Stromfluss

G = Leitfähigkeit

U = Spannung

U_{rev} = Umkehrpotential

Um den Einfluss des chemischen Gradienten auf die Leitfähigkeit des Transportproteins auszuklammern, wurde der Term $U - U_{rev}$ in die Formel integriert. Die „cord conductance“ eines Transportproteins ist somit definiert als:

$$G = \frac{I}{(U - U_{rev})}$$

GLEICHUNG 9

Die „cord conductance“ stellt ein wichtiges Charakteristikum von Transportproteinen dar und gibt deren Leitfähigkeit hinsichtlich der permeierenden Ionen an.

Gleichung (1) beschreibt den Ganzzell- oder den Gleichgewichtsstrom abhängig vom elektrochemischen Gradienten. Der Term $N \cdot i$ ist somit abhängig von der Membranspannung U und dem Konzentrationsgradienten ΔC^+ . Bei der Bestimmung der „cord conductance“ G wird der chemische Konzentrationsgradient mathematisch eliminiert, sodass nur eine Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung bestehen bleibt. Berücksichtigt man weiterhin das Zwei-Zustandsmodell (offen und geschlossen) der Transportproteine und definiert man p_o als Offenwahrscheinlichkeit, kann der Gleichgewichtsstrom zusätzlich zu Gleichung (1) wie folgt beschrieben werden.

$$I_{SS} = G^*(U - U_{rev}) * p_o$$

GLEICHUNG 10

Um unter Einbeziehung der Gleichung (10) und der durch die Boltzmann-Statistik beschriebenen Offenwahrscheinlichkeit p_o die Aktivierung von Transportproteinen zu ermitteln, kann die maximale „cord conductance“ G_{max} nun wiedergegeben werden als (Geiger et al., 2009).

$$G_{max} = \frac{I_{SS} * \left(1 + e^{\frac{zF(U - U_{1/2})}{RT}} \right)}{(U - U_{rev})}$$

GLEICHUNG 11

I_{SS} = Gleichgewichtsströme

U_{rev} = Umkehrpotential

U = Membranspannung

$U_{1/2}$ = halbmaximale Aktivierungsspannung

R = Gaskonstante (8.3144598 J/mol*K)

T = absolute Temperatur in °Kelvin

F = Faradaykonstante (96485.33289 C/mol)

z = Elementarladungsäquivalent

Transportproteine sind oft durch Liganden gesteuert. Dabei kann ein Ligand auch gleichzeitig ein permeiertes Ion sein. Ermittelt man G_{max} bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, so kann die Abhängigkeit der Aktivität/Offenwahrscheinlichkeit des Transportproteins vom

permeierenden Ion und somit dessen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des Proteins untersucht werden.

2.12.4 Der anormale Molfraktionseffekt, AMFE

Die Bestimmung des anormalen Molfraktionseffekts (AMFE) erlaubt die Untersuchung der Ionenpermeation eines Transportproteins, welches eine Leitfähigkeit für mehrere Substrationen (C_1^+ und C_2^+) aufzeigt. Dabei werden die Substrationen in ihrer Konzentration gegenläufig appliziert. Die Gesamtionenkonzentration (C_{ges}) der Addition beider Substrate ist auf eine Konzentration festgelegt, wohingegen die Molfraktion variiert wird (Takeuchi and Takeuchi, 1971; Neher, 1975).

$$C_{ges} = C_1^+ + C_2^+$$

GLEICHUNG 12

Die Molfraktion der Substrationen kann beschrieben werden als:

$$\frac{C_1^+}{(C_1^+ + C_2^+)}$$

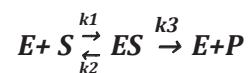
GLEICHUNG 13

Transportprozesse von mehreren Ionen durch eine Kanalpore können anhand verschiedener Modelle beschrieben werden, wie zum Beispiel das Multi-Ion Single-File-Modell von Hille und Schwarz (Hille and Schwarz, 1978) oder das Wechselwirkungsmodell von Wu (Wu, 1991; Wu, 1992). In beiden Fällen ist eine Verdrängung des ersten Ions durch das zweite Ion die Grundlage des Transportes. Mit dem Unterschied, dass der Ionentransport beim Hille-Schwarz-Modell auf die elektrostatische Abstoßung im Kanal und bei Wu auf die Übertragung von kinetischer Energie zurückgeführt wird. Allerdings versuchen beide Modelle den AMFE zu beschreiben, der in beiden Fällen auf eine kleinere Verdrängungswahrscheinlichkeit des Ions in der Pore bei extern ungleichen Ionen beruht. Somit beschreibt der AMFE für Kanalproteine, die eine Leitfähigkeit für zwei Substrationen aufweisen, das Phänomen, dass die Leitfähigkeit verursacht durch eine Mischlösung beider Substrate (eine Molfraktion) geringer ist als die Leitfähigkeit der Einzelionenlösungen. Somit kommt es bei einem Mischverhältnis der Ionen zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Substrate beim Transport durch die Pore, was oft als Flusskopplung bezeichnet wird (Hille, 2001). Der resultierende Strom des Kanals aufgetragen gegen die Molfraktion ergibt in der Anwesenheit eines AMFEs einen

Parabel-ähnlichen Verlauf mit entweder einem Maximum oder Minimum. Liegt kein AMFE vor, so erfolgt ein linearer Kurvenverlauf. Allgemein führt dies zur Interpretation, dass das Kanalprotein nur ein Ion zur gleichen Zeit in der Pore beinhalten kann, wodurch es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der unterschiedlichen Substrate kommt und demzufolge zu keinem gekoppelten Transportmechanismus. Die Bestimmung des AMFEs ist ein wichtiges Werkzeug um Hinweise auf einen gekoppelten Transportmechanismus eines Kanalproteins zu erhalten.

2.12.5 Enzymkinetik – Die Michaelis-Menten-Theorie und die Bestimmung des K_m -Wertes

Die Michaelis-Menten-Theorie ist ein mathematisches Modell, welches die Kinetik von enzymatisch katalysierten Reaktionen beschreibt. Dabei bildet sich reversibel aus Substrat (S) und dem Biokatalysator, dem Enzym (E), der Enzym-Substrat-Komplex (ES), der in Produkt (P) und Enzym (E) zerfällt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Umwandlung von ES zu P. Eine enzymatisch katalysierte Reaktion lässt sich vereinfacht beschreiben durch folgende Reaktionsgleichung.



GLEICHUNG 14

E = Enzym

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P = Produkt

$k_{1,2,3}$ = Geschwindigkeitskonstanten

Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen kann bei enzymatischen eine Sättigung eintreten. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen können alle Bindestellen eines Enzyms durch das umzusetzende Substrat besetzt sein, sodass die Umsatzgeschwindigkeit V (beschrieben durch die Geschwindigkeitskonstante k_3) nicht gesteigert werden kann und die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{max} erreicht wird. Daraus ergibt sich eine wichtige Kenngröße enzymatischer Reaktionen, der K_m -Wert. Dieser beschreibt die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit und stellt ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar.

Die Michaelis-Menten-Theorie kann auch bei DEVC-Messungen Anwendung finden. Die gemessenen Gleichgewichtsströme bei verschiedenen Konzentrationen der Testionen können

ebenso eine Sättigungskinetik aufweisen, die mittels der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden kann. Daraus resultieren die Parameter des K_m -Wertes, die halbmaximale Ionenkonzentration, und der durch das Transportprotein erreichte maximale Strom.

$$I = \frac{I_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

GLEICHUNG 15

I = Strom

I_{max} = maximaler Strom

$[S]$ = Substratkonzentration

K_m = halbmaximale Ionenkonzentration

Die halbmaximale Ionenkonzentration (K_m) ist gleich der halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeit. Diese Konzentration gibt an, bei welcher Substratmenge die halbmaximale Aktivität des Transportproteins erreicht wird und stellt die Affinität des Proteins zum Substrat dar. Ein niedriger K_m -Wert weist darauf hin, dass schon bei geringen Ionenkonzentrationen ein Transport über die Membran stattfindet, der effizient und mit hoher bis maximaler Geschwindigkeit ablaufen kann.

Für Transportproteine stellt die Bestimmung des K_m -Wertes vor allem hinsichtlich der Einordnung in die Gruppe der nieder- oder hoch-affinen Transporter/Kanäle ein wichtiges Werkzeug dar.

2.12.6 Q_{10} -Wert

In physiologischen und biochemischen Prozessen kann eine Temperaturänderung Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit nehmen. Dies wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel) oder auch die van't-Hoff'sche-Regel beschrieben. Sie besagt, dass durch eine Erhöhung der Temperatur T um 10 K, die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis vervierfacht wird. Eine wichtige Kenngröße hierbei ist der Q_{10} -Koeffizient, der definiert ist als:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

GLEICHUNG 16

R1 und R2 = Reaktionsgeschwindigkeiten bei T1 und T2

T1 und T2 = Temperaturen in K

In einem beliebigen Zeitintervall ΔT kann die n-fache Änderung wie folgt kalkuliert werden:

$$Q_{\Delta T} = (Q_{10})^{\frac{\Delta T}{10}}$$

GLEICHUNG 17

Bei Transportproteinen wie Carriern (Transporter) führen Konformationsänderungen zu einer Temperatur-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeitsrate, woraus sich ein $Q_{10} \geq 2$ ergibt. Der Transport und die Leitfähigkeit bei Ionenkanälen dagegen ist relativ Temperatur-insensitiv, sodass sie einen geringeren Q_{10} von 1.2 bis 1.5 aufweisen (Hille, 2001).

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Klonierung von Transportproteinen der Venusfliegenfalle

In der vorliegenden Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf Kationenkanäle und –transporter gelegt, die bei der Kationenaufnahme aus dem verdauten Beutetier involviert sind. Um interessante Transportproteine zu identifizieren und anschließend zu klonieren, wurde auf eine EST-Datenbank aus *Dionaea muscipula* Fallen zurückgegriffen. Aus den Transkriptomanalysen mittels 4-5-4- und Illumina-Sequenzierungen resultierten kurze DNA-Fragmente, die sogenannte reads. Die reads beider Transkriptomdatensets wurden zu Sequenzsegmenten assembliert (Schulze et al., 2012). Diese Sequenzsegmente sind überlappende DNA-Fragmente, die aus einer genetischen Quelle stammen und Fragmente oder sogar Vollängen eines Transportproteins enthalten können. Mittels dieser Sequenzdaten konnten Vorhersagen über die biologische Einordnung, die Funktion und den Nutzen getroffen und somit Gene detektiert werden, deren Sequenzinformationen zu Kationentransportproteinen zugeordnet wurden. Diese Vorhersagen dienten als Ausgangspunkt zur Amplifizierung und Klonierung der Kationenkanälen DmKT1 und DmHKT1, sowie des K⁺-Transporters DmHAK5 aus *Dionaea muscipula*.

3.1.1 Klonierung der Kationentransportproteine

Als Ausgangsmaterial zur Klonierung diente Gesamt-RNA aus Fallen von *Dionaea muscipula*. Nach Isolierung der mRNA (2.1.1) und anschließender cDNA-Synthese (2.1.2) konnte mit Hilfe der in Material und Methoden (2) beschriebenen SMART Race Technik und den beschriebenen PCR-Methoden (2.2) die kodierenden Sequenzen (CDS) von drei Kationentransportproteinen amplifiziert werden. Das Klonieren der CDS mittels T/A-Klonierungstechniken resultierte in einem Plasmid (2.5.1), welches daraufhin durch Sanger-Sequenzierungen überprüft wurde (2.7). Nach Verifizierung und erfolgreicher Übereinstimmung der Sequenzen mit den vorhergesagten DNA-Fragmenten oder Vollängen der EST-Datenbank, konnten die kodierenden Sequenzen in die entsprechenden Expressionsvektoren (2.5.2, 2.5.3) zur Charakterisierung in *Xenopus* Oozyten kloniert werden. Zu elektrophysiologischen Analysen (2.11) oder zu Fluoreszenz-basierten Proteininteraktions-Studien (2.10) wurde die hergestellte cRNA der Transportproteine (2.8) in Oozyten injiziert und zur Expression für ein bis drei Tage bei 18°C inkubiert.

Die in der folgenden Tabelle (Tabelle 3-1) aufgelisteten Transportproteine konnten identifiziert und kloniert werden. Dabei richtet sich der Trivialname und die Annotation der Proteine nach

der phylogenetischen Klassifizierung und den untersuchten Transportcharakteristika, auf die in den sich anschließenden Kapiteln im Detail eingegangen wird.

Trivialname	Genbank-Nummer	Annotation	Länge des Proteins
DmKT1	LN715171	putativer K ⁺ -Kanal	879 aa
DmHAK5	LN715172	putativer K ⁺ /H ⁺ -Symporter	784 aa
DmHKT1	KT223138	putativer Na ⁺ -Transporter	526 aa

Tabelle 3-1: Auflistung der identifizierten und klonierten Transportproteine aus *Dionaea Fallen*. In der Tabelle sind die Transportproteine mit den dazugehörigen Genbank-Nummern aufgelistet. DmKT1 und DmHAK5 stellen putative Transportproteine für Kaliumionen dar, wohingegen DmHKT1 als putativer Natriumtransporter bezeichnet werden konnte. Zusätzlich ist die Anzahl der Aminosäuren (aa) der jeweiligen Proteine angegeben.

3.2 Phylogenetische Einordnung der identifizierten putativen Kaliumtransportproteine

Basierend auf Homologien der Aminosäuresequenz können Transportproteine phylogenetisch in unterschiedliche Transporterfamilien eingruppiert werden. Innerhalb der einzelnen Familie kann meist noch eine weitere Klassifizierung in Untergruppen stattfinden. Diese phylogenetische Einordnung kann erste Hinweise auf die Funktion und Transportcharakteristika der zu untersuchenden Kanäle und Transporter liefern.

3.2.1 Eingruppierung von DmKT1 in die AKT1-Unterfamilie

Aufgrund von Sequenzhomologien kann DmKT1 innerhalb der Spannungs-aktivierten pflanzlichen *Shaker*-Kaliumkanäle eingruppiert werden. Funktionelle Eigenschaften dieser Kanäle führen zu einer weiteren Einteilung der *Shaker*-Familie. So gruppieren sich die Auswärtsgleichrichter in die Untergruppe der K_(out) und die Einwärtsgleichrichter in die Klasse der K_(in). Eine weitere Unterfamilie, die K_(weak), beinhaltet Vertreter, die eine schwache Spannungsabhängigkeit aufweisen. K_(out), K_(in) und K_(weak) stellen die drei Untergruppen der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle dar. Weiterhin finden sich innerhalb der *Shaker*-Kaliumkanäle regulatorische Proteine, die bei Heteromerisierung mit den K_(in)-Kanälen Auswirkungen auf ihre Transporteigenschaften haben können. Die alleinige Expression dieser regulatorischen Elemente weisen keine Transporteigenschaften auf, sodass diese Vertreter zusätzlich in eine Klasse, den K_(silent), eingeordnet werden können. Die Unterfamilie der K_(in)-Kanäle kann zudem in zwei kleinere Gruppen aufgeteilt werden, den K_(in) vom KAT1-Typ und den K_(in) vom AKT1-Typ. Die Namensgebung beruht dabei auf den ersten identifizierten Vertreter aus

Arabidopsis thaliana. Letztendlich können somit die pflanzlichen *Shaker*-Kaliumkanäle strukturell und funktionell in bis zu fünf Unterklassen gruppiert werden (Gomez-Porras et al., 2012).

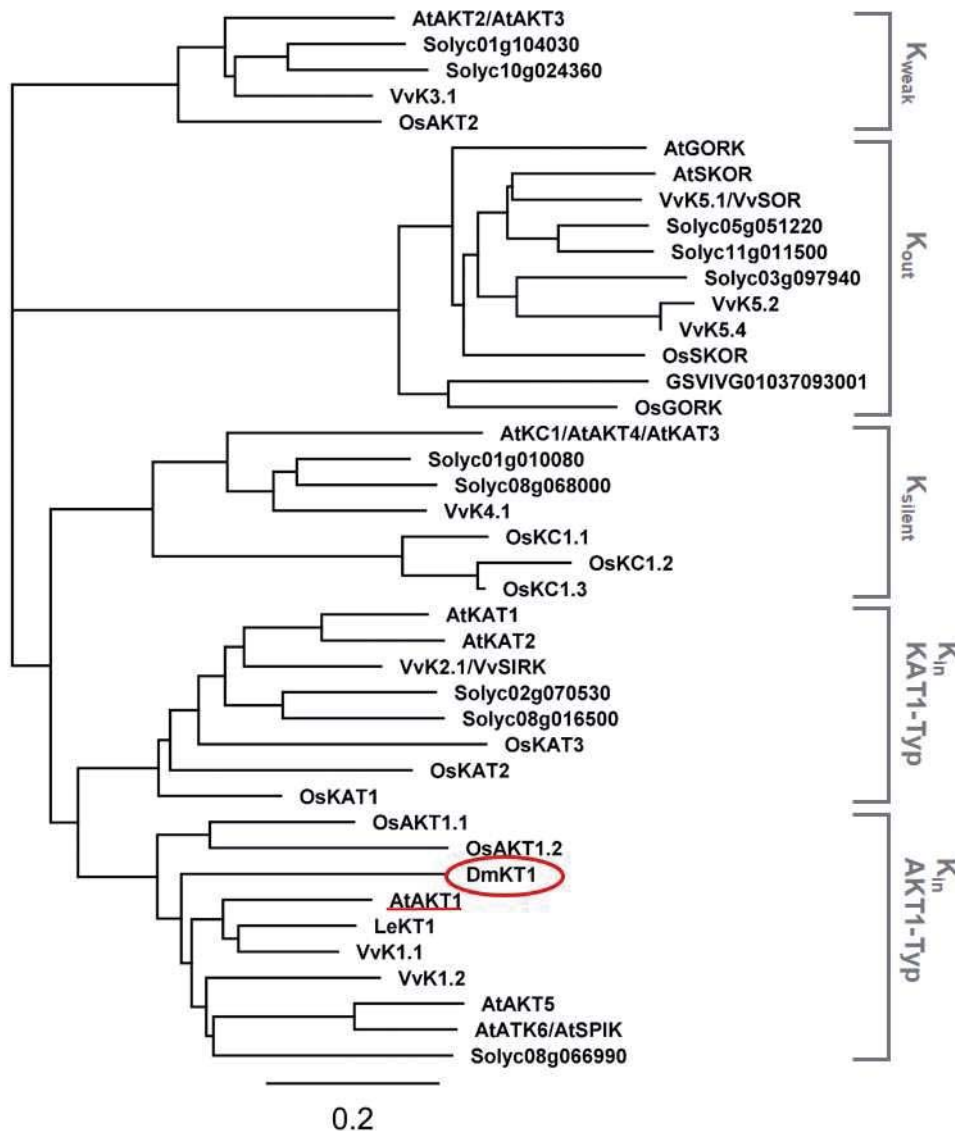


Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung von DmKT1

DmKT1 aus *Dionaea muscipula* konnte phylogenetisch in die $K_{(in)}$ -Gruppe vom AKT1-Typ der *Shaker*-ähnlichen K^+ -Kanäle eingeordnet werden. Bei dieser Klassifizierung wurden *Shaker*-Kaliumkanäle aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum* herangezogen. Der Kaliumeinwärtsgleichrichter der Venusfliegenfalle, *DmKT1*, wird umrandet dargestellt und der Orthologe K^+ -Kanal aus *Arabidopsis thaliana* ist mit einem Unterstrich gekennzeichnet. Im Anhang A werden die hier verwendeten Trivialnamen der Kanäle ihren Genbank-Nummern (Accession-Nummern) zugeordnet. Der Stammbaum konnte mit Hilfe der Software Geneious 8.1.4 basierend auf die frei zugänglichen Aminosäuresequenzen der *Shaker*-Kaliumkanäle erstellt werden.

Abbildung 3-1 zeigt die phylogenetische Einordnung von *DmKT1* aus *Dionaea muscipula* in die fünf Untergruppen der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle aus den Pflanzenspezies *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum*. Die Einteilung basierte auf

den Aminosäuresequenzen der in der Abbildung genannten Proteine. DmKT1 fand sich aufgrund seiner Sequenzhomologie in der K_(in)-Untergruppe vom AKT1-Typ wieder. Diese sogenannten Einwärtsgleichrichter weisen eine Hyperpolarisations-abhängige Kaliumpermeabilität auf. Der größte Verwandtschaftsgrad mit der höchsten Sequenzidentität von DmKT1 bestand mit 60 % zu VvK1.1 aus *V. vinifera*, mit 57.62 % zu LeKT1 aus *S. lycopersicum* und mit 56.80 % zu AKT1 aus *A. thaliana*. Eine Sequenzidentität von über 40 % ist ein zwingendes Kriterium für die phylogenetische Einordnung, wodurch eine Klassifizierung von DmKT1 in eine andere Untergruppe ausschied. Ein weiteres Merkmal der *Shaker*-Kanäle ist das universelle Motiv TXGYGD/E des Selektivitätsfilters (Becker et al., 1996). Bei einem Sequenzvergleich verschiedener *Shaker*-Kanäle konnte in DmKT1 an Position 281 das verantwortliche Motiv für die Kaliumpermeabilität ebenfalls identifiziert werden. Diese sich hier abzeichnende Zugehörigkeit von DmKT1 zur K_(in)-Familie vom AKT1-Typ sollte im Weiteren mittels elektrophysiologischen Methoden tiefgehend untersucht werden.

3.2.2 Klassifizierung des Transporters DmHAK5 in die HAK/KUP/KT-Familie

Proteine der HAK/KUP/KT-Familie sind putative K⁺/H⁺-Symporter und werden in sechs Untergruppen eingeteilt (Gomez-Porrás et al., 2012). Funktionell sind Vertreter dieser Familie wenig untersucht, sodass die Eingruppierung vor allem auf Basis von Sequenzhomologien geschieht. Die erste Unterklasse kann zusätzlich in Klasse I a und b unterteilt werden. In I a findet sich der HAK5-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*, der wie die meisten HAK-ähnlichen Transporter einen Ionentransport über die Plasmamembran vermittelt. Ein HAK/KUP/KT12-Protein aus *A. thaliana* aus der Untergruppe I b wurde im Chloroplastenproteom gefunden, während ein weiteres Mitglied der Gruppe II im Tonoplasten lokalisiert ist (Gomez-Porrás et al., 2012). Die phylogenetische Einordnung von HAK/KUP/KT-Transportern deutet auf eine große Divergenz innerhalb dieser Familie hin, die jedoch durch Funktionsanalysen der einzelnen Vertreter noch im Detail untersucht werden muss.

Abbildung 3-2 zeigt die phylogenetische Einordnung von DmHAK5 aus der Venusfliegenfalle innerhalb der HAK/KUP/KT-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum*. Aufgrund der Aminosäuresequenz gruppierte sich DmHAK5 zusammen mit AtHAK5 in die Unterklasse I a, der die Kaliumaufnahme über die Plasmamembran in *Arabidopsis* Wurzeln vermittelt (Gierth et al., 2005; Lebaudy et al., 2007; Rubio et al., 2008; Gomez-Porrás et al., 2012).

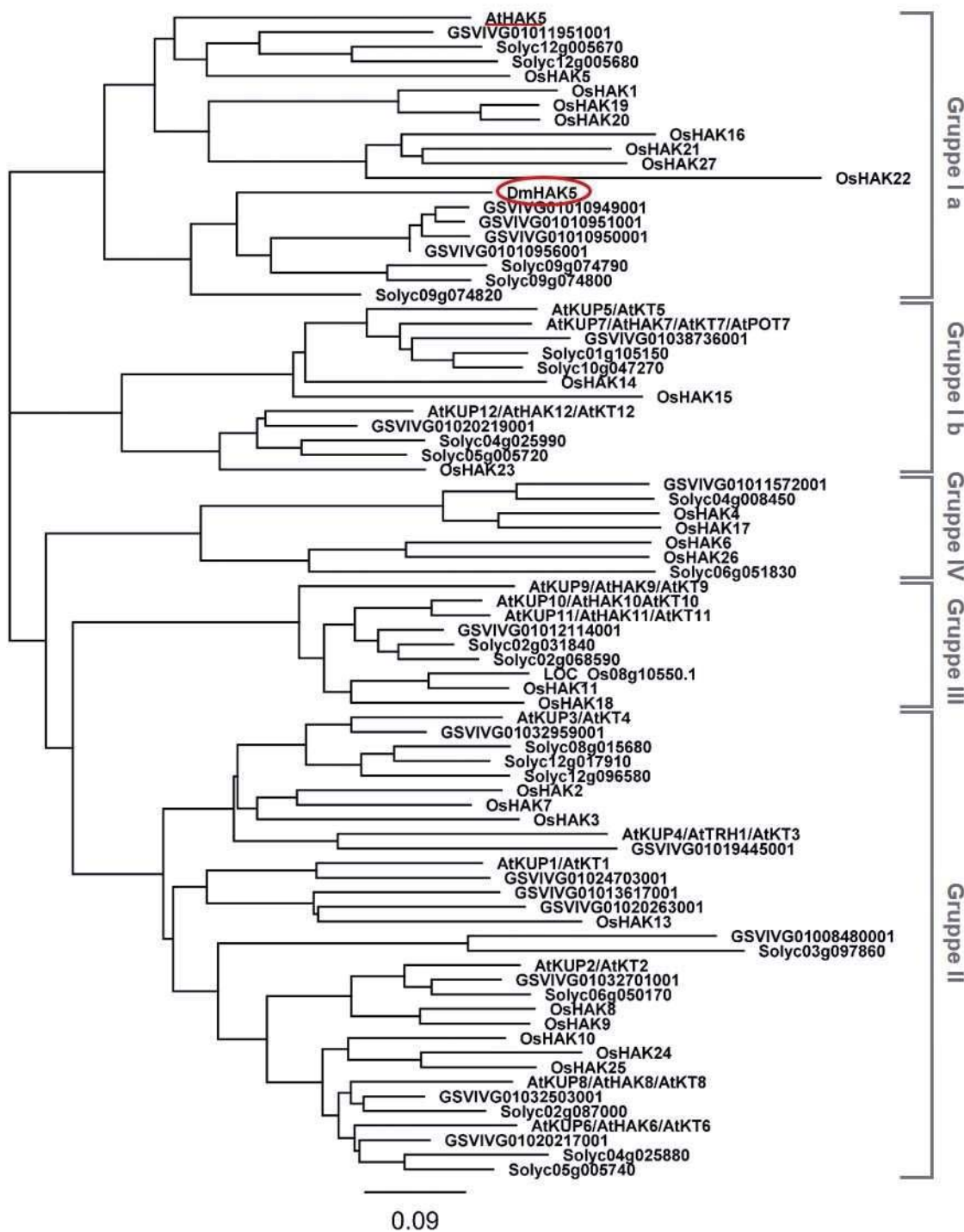


Abbildung 3-2: Phylogenetischer Stammbaum von HAK/KUP/KT-Transportproteinen

Die Eingruppierung von DmHAK5 aus *Dionaea muscipula* basierte auf Sequenzhomologien zu Vertretern der HAK/KUP/KT-Familie aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum*. Es ergab sich eine Zugehörigkeit von DmHAK5 (umrandet) zur Unterfamilie I a, in der sich auch der HAK5-Transporter aus *A. thaliana* (unterstrichen) eingliedert. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit der Software Geneious 8.1.4 erstellt. Im Anhang A sind die Transportproteine mit Genbank (Accession)-Nummern aufgelistet.

Die Sequenzanalysen von DmHAK5 zu AtHAK5 ergaben eine Identität von 50,83 %. Zu Mitgliedern der Gruppe I a von *Vitis vinifera* und *Solanum lycopersicum* lag sogar eine Identität

von 54 % bis 64 % vor. Die Homologie zu der Monokotyledonen *Oryza* Spezies war zwar etwas geringer, jedoch mit über 42 % immer noch über der Kennlinie zur phylogenetischen Einordnung. Aufgrund dessen konnte DmHAK5 eindeutig in die Gruppe I a der HAK/KUP/KT-Familie klassifiziert werden. Der somit putative K^+/H^+ -Symporter sollte im Folgenden auf seine genauen elektrophysiologischen Charakteristika hin untersucht und somit die phylogenetische Eingruppierung verifiziert werden.

3.3 Charakterisierung des Kaliumtransportmoduls DmKT1

Zur funktionellen Überprüfung der phylogenetischen Klassifizierung von DmKT1 in die $K_{(in)}$ -Kanäle vom AKT1-Typ wurden die Transporteigenschaften des Proteins mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (2.11) ermittelt. Des Weiteren wurde das Expressionsmuster anhand von Transkriptomanalysen untersucht, um Hinweise auf eine Beteiligung von DmKT1 bei der Kaliumaufnahme während des Beuteverdauens zu erhalten. Die unten aufgeführten Ergebnisse zu DmKT1 konnten bereits von Scherzer, Böhm et al. 2015 veröffentlicht werden (Scherzer, Böhm et al., 2015).

3.3.1 Expressionsverhalten von DmKT1

Transkriptomanalysen aus RNAseq Daten der Venusfliegenfalle wurden von der Bioinformatik der Universität Würzburg in einem Transkriptombrowser (TBro) zusammengestellt (Ankenbrand, 2015). Diese Datenbank ermöglichte es, das Expressionsverhalten von DmKT1 hinsichtlich verschiedenster Stimuli und hinsichtlich der Gewebs-spezifischen Expression zu analysieren und so Hinweise auf eine Beteiligung des K^+ -Kanals an der Kaliumaufnahme aus dem Beutetier zu erhalten.

Die Induktion von DmKT1-Transkripten in der Falle und der Drüse sollte mit der Stimulierung des Verdauungsprozesses in Relation gebracht werden (Abbildung 3-3 A). Dazu wurde das Transkriptionslevel von unbehandelten Fallen- und Drüsengewebe sowie von Fallen und Drüsen analysiert, die mit Insekt oder dem Reagenz Coronatin, ein Surrogat zur Insektenstimulierten Sekretion und Verdauung, behandelt wurden. Zu Vergleichsanalysen wurden die detektierten Transkriptmengen der Kontrollgewebe (Falle und Drüse) gleich Eins gesetzt, sodass die Betrachtungen der behandelten Fallen + Insekt und Drüsen + COR in einer x-fachen Transkriptänderung resultierten. So konnte auf die Stimulierung der Falle mit einem Beutetier eine 1.5-fache Erhöhung der DmKT1-Transkriptmenge im Vergleich zu unbehandelten Fallen detektiert werden. Im Vergleich von unstimulierten und mit COR

behandelten Drüsen wurde sogar eine Transkriptänderung von 3.1 in den stimulierten Drüsenkomplexen ermittelt. Diese Induktion von DmKT1 unter Verdauungs-stimulierenden Bedingungen deutet auf eine physiologische Funktion von DmKT1 während der Nährstoffaufnahme hin.

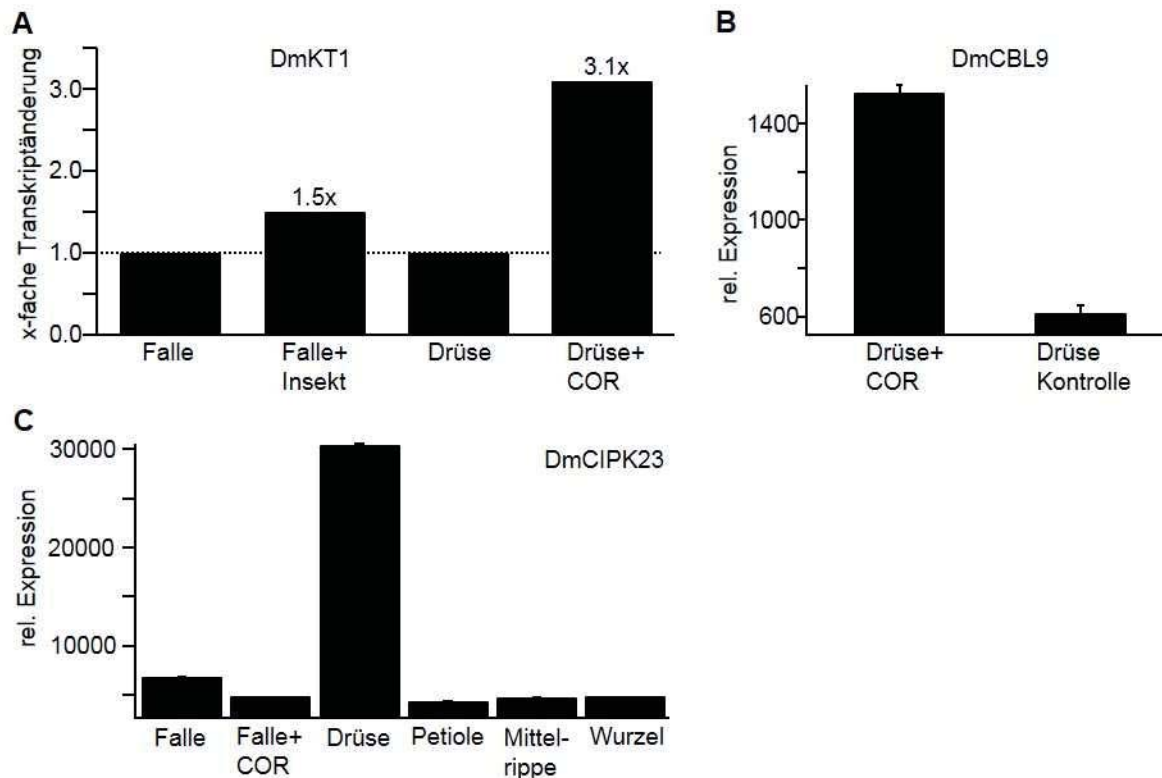


Abbildung 3-3: Expressionsanalysen des K⁺-Kanals DmKT1 und der *Dionaea* Orthologen zu AtCIPK23 und AtCBL9

Transkriptanalysen von DmKT1, DmCIPK23 und DmCBL9 basierend auf RNAseq Datenverarbeitung im Transkriptombrowser TBro der Venusfliegenfalle (zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg (Ankenbrand, 2015)). (A) Transkriptänderung des putativen Kaliumkanals DmKT1 in den Fallen und Drüsen der *Dionaea muscipula* 24 bis 48 h nach Stimulierung der Sekretion und Verdauung durch ein Insekt oder Coronatin (COR). (B) und (C) zeigen die relative Expression der Proteinkinase DmCIPK23 und dem Ca²⁺-Sensor DmCBL9. Die Expression des Calcineurin B-ähnlichen Kalziumsensors CBL9 aus *Dionaea* wurde bei Gabe von COR in den Drüsenkomplexen stimuliert (B). Die Kinase hingegen konnte im Gewebevergleich mit einer hohen Transkriptmenge im Drüsengewebe detektiert werden, sogar ohne, dass eine Stimulierung durch ein Insekt oder COR vorangegangen war (C).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das K⁺-Kanalprotein AKT1 aus *Arabidopsis thaliana* vom Sensor/Kinase-Komplex, CBL9/CIPK23, phosphoryliert und somit aktiviert wird (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Aufgrund dieser Tatsache wurde nach Orthologen von AtCIPK23 und AtCBL9 im Transkriptombrowser TBro von *Dionaea muscipula* gesucht und ihr Expressionsverhalten ermittelt. Hierbei konnten Orthologe der Kinase und des Sensors im Fallengewebe gefunden werden. Abbildung 3-3 B und C zeigen die relative Expression des Sensors, DmCBL9, und der Kinase, DmCIPK23. DmCBL9 war in seiner Expression vor allem in den Drüsen der Fallen stark durch Coronatin induziert (2.5-fache Erhöhung im Vergleich

zum Grundzustand). Die Kinase DmCIPK23 hingegen war ubiquitär, in der Falle, der Petiole, der Mittelrippe und Wurzel, vertreten und im Gegensatz zu DmCBL9 in der Falle nicht durch Coronatingabe in der Expression angeregt. Jedoch fand sich in den Drüsenkomplexen eine hohe Grundexpression, die unter Umständen, ohne eine weitere Induktion, eine physiologische Funktion erfüllt. Die Expressionsdaten der Kinase und des Sensors zeigten ebenso wie die Transkriptanalysen des Kanals DmKT1 eine verstärkte Expression in den Drüsen der Fallen im Vergleich zu anderen Fallengeweben und deuten somit auf eine Regulation von DmKT1 hin. Diese sollte im weiteren Verlauf elektrophysiologisch an *Xenopus* Oozyten untersucht werden. Jedoch lagen keine Konstrukte der aus *Dionaea* stammenden Kinase und dem Sensor vor. Am Beispiel des R-Typ Anionenkanals DmQUAC1 aus der Venusfliegenfalle konnte elektrophysiologisch bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des *Dionaea*-Kanals mittels der Kinase OST1 aus *Arabidopsis* erfolgen kann (Imes et al., 2013). Dies deutet auf eine Spezies-unabhängige Aktivierung von *Dionaea*-Proteinen mittels Kinasen hin, sodass im Falle von DmKT1 auf CIPK23 und CBL9 aus *Arabidopsis* zurückgegriffen wurde. Die verwendeten *Arabidopsis* Kinasen der CIPK-Familie und die Ca^{2+} -Sensoren des CBL-Typs wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jörg Kudla der Universität Münster zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Aktivierung des Kanals DmKT1

Aufgrund der bekannten Aktivierung von AKT1 aus *Arabidopsis* durch die Proteinkinase CIPK23 und dem Kalziumsensor CBL9 sollte ein ähnliches Verhalten von DmKT1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC) (2.11) und der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC) (2.10.1) untersucht werden.

Bei alleiniger Expression von DmKT1 in *Xenopus* Oozyten konnten bei einer angelegten Haltespannung von -100 mV und einem Lösungswechsel von Lithium- zu Kaliumionen keine makroskopischen Ströme beobachtet werden. Lag jedoch eine Koexpression von DmKT1 und dem Sensor/Kinase-Komplex AtCBL9/AtCIPK23 vor, so konnten Kalium vermittelte Einwärtsströme von bis zu -7 μ A aufgezeichnet werden (Abbildung 3-4 A). Dies lässt auf eine Interaktion von DmKT1 und AtCBL9/AtCIPK23 schließen, die in BIFC-Messungen bestätigt wurde. Die Koexpression von DmKT1::YC mit dem Fusionsprotein AtCIPK23::YN und dem nativen Protein AtCBL9 resultierte in einer deutlichen YFP-Fluoreszenz in der Peripherie von *Xenopus* Oozyten (Abbildung 3-4 B). Im Vergleich dazu war solch eine Interaktion und Fluoreszenz nicht bei einer Koexpression der *Arabidopsis* Kinase CIPK24 mit DmKT1 zu

verzeichnen, was sich auch in einem Fehlen von makroskopischen Kaliumströmen bei DmKT1/AtCBL9/AtCIPK24 exprimierenden Oozyten zeigte (Daten nicht gezeigt).

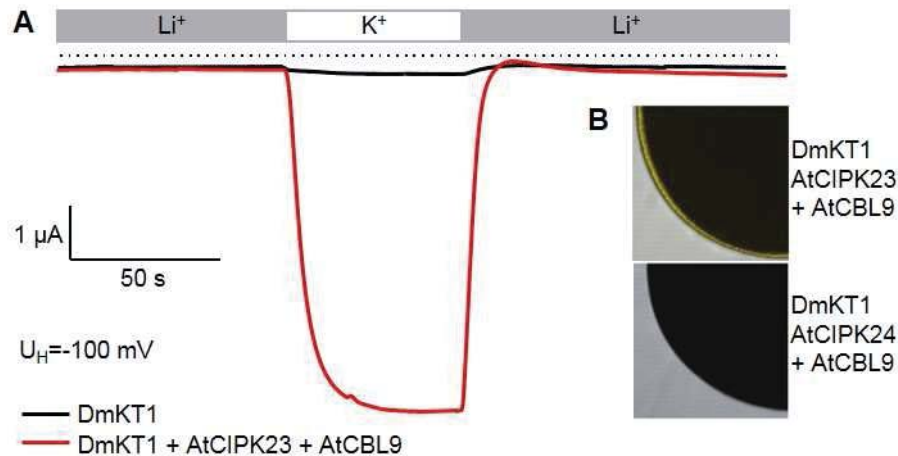


Abbildung 3-4: Aktivierung des *Dionaea*-Transportproteins DmKT1 durch den aus *Arabidopsis* stammenden Sensor/Kinasen-Komplex

(A) Stromantwort von repräsentativen Zellen bei einer Haltespannung U_H von -100 mV und einem Lösungswechsel von 100 mM LiCl zu 100 mM KCl. Die Koexpression von DmKT1, AtCIPK23 und AtCBL9 (rot) führte bei einem Ionenwechsel zu einem deutlichen Kaliumstrom, wohingegen die alleinige Expression von DmKT1 zu keinen makroskopischen Strömen führte (schwarz). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Nullstrom-Linie im Spannungsklemmenmodus. (B) zeigt die in BIFC-Messungen aufgezeichnete YFP-Fluoreszenz einer DmKT1::YC/AtCIPK23::YN/AtCBL9 exprimierenden Oozyte und deutet auf die Interaktion des Kanals mit dem AtCBL9/AtCIPK23-Komplex hin. Die Expression des Kanals, des Ca^{2+} -Sensors AtCBL9 und der Kinase AtCIPK24::YN führte zu keiner detektierbaren Fluoreszenz an der Oozyten Peripherie.

Für die folgenden Untersuchungen der Transporteigenschaften von DmKT1 wurde der Kanal, wenn nicht anders erwähnt, zur Aktivierung mit der Kinase AtCIPK23 und dem Kalziumsensorsprotein AtCBL9 in Oozyten koexprimiert und somit aktiviert. Dabei wurden keine BIFC-Konstrukte (2.5.3) verwendet.

3.3.3 DmKT1, ein Spannungs-abhängiger Kaliumkanal

Die typischen Charakteristika eines $K_{(in)}$ -Kanals vom AKT1-Typ sind u. a. Hyperpolarisations-aktivierte Kaliumströme. Zur Ableitung von DmKT1 vermittelten Stromantworten bei definierten Membranspannungen wurden unter variierenden Kaliumbedingungen Einfach- und Zweifachspannungspulsprotokolle verwendet, die in 2.11.5 beschrieben sind.

Nach heterologer Expression von DmKT1 konnten typische Stromantworten als Antwort auf Einfachspannungspulse bei einer externen Kaliumkonzentration von 10 (A) und 100 mM (B) detektiert werden (Abbildung 3-5 A und B). Hyperpolarisierende Membranspannungen induzierten makroskopische Kaliumeinwärtsströme, die eine Zeit-abhängige

Aktivierungskinetik aufwiesen. Bei einer externen Kaliumkonzentration von 100 mM fand ein erhöhter Einstrom statt, der nach 3 s in einem Gleichgewichtsstrom (engl. steady state, I_{ss}) relaxierte. Die Kalium- und Spannungsabhängigkeit, sowie die Einwärtsgleichrichtung von DmKT1 werden in dem Strom-Spannungs-Diagramm, bei dem die Gleichgewichtsströme gegen die applizierte Spannung aufgetragen sind, verdeutlicht (Abbildung 3-5 C). Bei einer Kaliumkonzentration von 100 mM aktivieren die Kanäle bei einer Spannung von ungefähr -50 mV. Da neben dem elektrischen Gradienten auch der chemische Kaliumgradient einen Einfluss auf den Ionenfluss über der Membran hat, führte eine variierende Kaliumkonzentration zu sich ändernden Stromamplituden. So konnte ein verstärkter Strom über der Membran beim einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal DmKT1 festgestellt werden, wenn die externe Kaliumkonzentration erhöht wurde. Die Gleichgewichtsströme von DmKT1 zeigten die erwartete Kaliumabhängigkeit bei externer Perfusion der Oozyten mit unterschiedlichen Kaliumlösungsbedingungen (5, 10, 50 und 100 mM) (Abbildung 3-5 C).

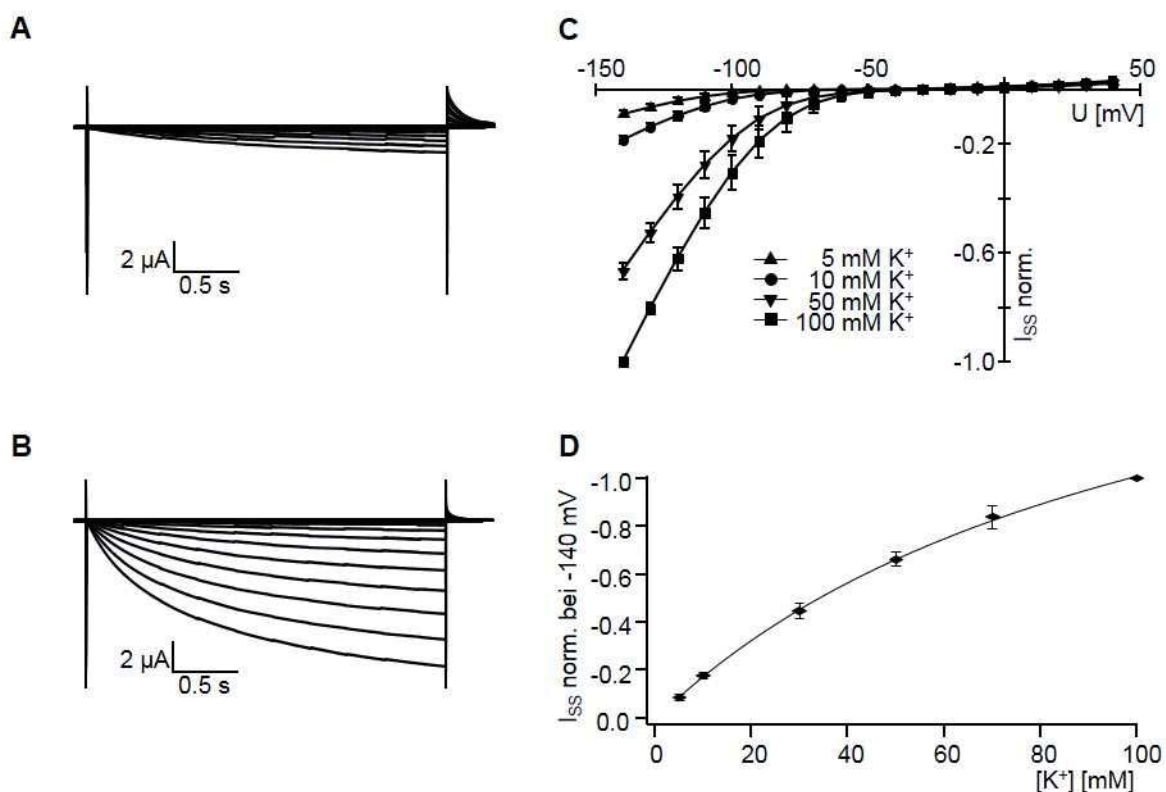


Abbildung 3-5: Stromantworten von DmKT1 bei variierenden externen Kaliumkonzentrationen (A) und (B) zeigen repräsentative Stromantworten einer Oozyte bei 10 (A) und 100 mM KCl (B) und einem pH-Wert von 4. Die Spannungs-kennlinien in (C) verdeutlichen die Spannungsabhängigkeit und die Erhöhung der Stromamplituden mit steigenden Kaliumkonzentrationen. Die I_{ss} wurden bei einem Membranpotential von -140 mV und einer 100 mM externen K^+ -Konzentration normalisiert ($n=6 \pm SD$). Normalisierte I_{ss} wurden in (D) gegen die steigenden Kaliumkonzentrationen aufgetragen und resultierten bei der Beschreibung mit der Michaelis-Menten-Gleichung in einem K_m von 108 mM ($n=5 \pm SD$).

In Abbildung 3-5 D sind die Gleichgewichtsströme bei -140 mV in Abhängigkeit von der applizierten Kaliumkonzentration (5 – 100 mM) gezeigt. Diese Darstellungsweise resultierte in einer Sättigungskurve, die mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (15) beschrieben werden konnte. Daraus ergab sich für DmKT1 ein K_m -Wert von 108.29 ± 7.34 mM für Kalium. Somit lag die halbmaximale Transportaktivität von DmKT1 im millimolaren Konzentrationsbereich, was auf ein nieder-affines Kaliumtransportsystem hin deutet.

Das einwärtsgleichrichtende Verhalten von DmKT1 zeigte die typischen Charakteristika der $K_{(in)}$ -Kanäle vom AKT1-Typ. Jedoch ist die Selektivität dieser Kanalklasse noch weitestgehend ungeklärt. Deshalb wurde die Permeabilität von DmKT1 exprimierenden Oozyten für eine Reihe von monovalenten Kationenlösungen untersucht. Bei der Applikation von Kaliumionen (100 mM) und einer angelegten Spannung von -140 mV konnten Gleichgewichtsströme bis zu -6 μ A aufgezeichnet werden. Die Alkalimetalle Lithium, Natrium, Rubidium und Cäsium hingegen führten zu keinem messbaren Einstrom. Das aufgrund seiner Größe für Kaliumkanäle impermeable Kation NMDG⁺, sowie das den Alkalimetallen chemisch ähnliche Ammonium konnte ebenfalls keinen makroskopischen Einstrom auslösen, sodass sich für DmKT1 eine strikte Kaliumselektivität vermuten lässt (Abbildung 3-6).

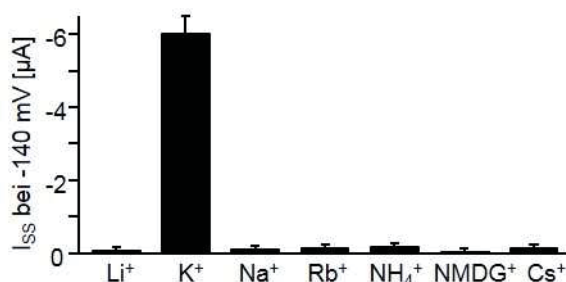


Abbildung 3-6: Selektivität von DmKT1

Die DmKT1 vermittelten Gleichgewichtsströme bei einer Membranspannung von -140 mV wurden in verschiedenen Kationenpuffern detektiert (LiCl, KCl, NaCl, RbCl, NH₄Cl, NMDG-Cl und CsCl je 100 mM). Ein Einstrom konnte nur in Kalium-beihaltenden Lösungen beobachtet werden ($n=4 \pm SD$).

Die Nernst-Gleichung (7) gibt das Gleichgewichtspotential bei einem gegebenen Ionenkonzentrationsgradienten an einer selektiven Membran wieder. Bei dieser Membranspannung ist die Summe aller Ionenströme über der Membran gleich Null. Ist ein Kanal zum Beispiel selektiv für Kaliumionen, so sollte sich das Kaliumgleichgewichtspotential über der Membran bei einer Änderung des Kaliumgradienten, wie von Nernst vorgegeben, verschieben. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (7) und unter der Annahme von einer 100 mM Kaliumkonzentration im Zytosol der Oozyte kann U_{rev} bei unterschiedlichen externen Kaliumkonzentrationen bestimmt werden. Liegt nun die aus Abbildung 3-6 vermutete strikte Kaliumselektivität von DmKT1 vor, so erfolgt eine Verschiebung der Umkehrspannung von 59.1 mV, wenn sich die externe Kaliumkonzentration um das 10-fache ändert. Unter Verwendung eines Zweifachspannungspulses wurden Umkehrpotentiale bei einer externen Kaliumkonzentration von 10 mM und 100 mM ermittelt. Im Falle von DmKT1 konnte so eine

Verschiebung des Umkehrpotentials U_{rev} von 53.80 ± 1.06 mV beobachtet werden ($n=6 \pm SD$). Dieses „Nernst-Verhalten“ unterstützt die Vermutung, dass es sich bei DmKT1 um einen Kalium selektiven Kanal handelt.

3.3.4 Der Einfluss von Protonen auf die Transporteigenschaften von DmKT1

Für pflanzliche *Shaker*-Kaliumkanäle ist bekannt, dass Protonen einen Einfluss auf ihre Transporteigenschaften für Kalium ausüben können. AKT2/3-ähnliche Kanäle aus der Klasse der $K_{(weak)}$ zeigen einen verringerten Kaliumstrom bei erhöhten Protonenkonzentrationen. Einzelkanalstudien mit der Patch Clamp-Technik zeigten, dass sich bei Ansäuerung des externen Mediums die Einzelkanalleitfähigkeit verringert und es so zu reduzierten Ganzzell-Kaliumströmen kommt (Marten et al., 1999). Im Gegensatz dazu erhöhen sich bei saurem pH-Wert die Gleichgewichtsströme bei Kaliumkanälen der $K_{(in)}$ -Klasse, wie KST1 und KAT1.

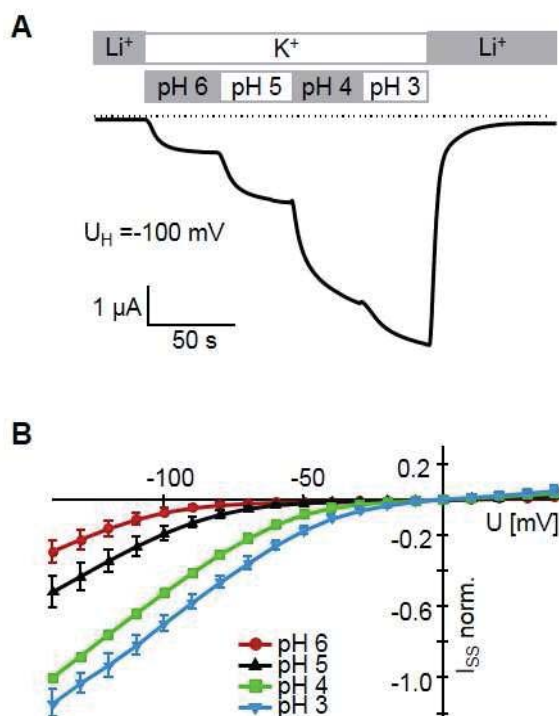


Abbildung 3-7: Gleichgewichtsströme von DmKT1 bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen

(A) Stromantwort bei einer Haltespannung von -100 mV in 100 mM KCl. Eine Zunahme der H^+ -Konzentration führte zu einer Erhöhung der Stromamplitude. (B) Stromspannungskennlinien gewonnen von 6 DmKT1 exprimierenden Oozyten $\pm SD$. I_{ss} wurden bei 100 mM KCl pH 4 auf -140 mV normiert und zeigten neben einer Zunahme des Stromflusses mit Erhöhung der H^+ -Konzentration auch eine Verschiebung der Aktivierungsschwelle zu positiven Spannungen.

Der Grund dafür ist eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ zu positiveren Spannungen (Hoth and Hedrich, 1999). Um eine Auswirkung von Protonen auf den Kaliumkanal DmKT1 der Venusfliegen-falle zu untersuchen, wurden die I_{ss} in Einfachspannungspuls-experimenten bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Die Messlösungen enthielten 100 mM KCl und wurden auf pH 3, 4, 5 oder 6 gepuffert (2.11.6).

Die dargestellte Stromspur wurde bei einer Haltespannung U_H von -100 mV und bei einem Lösungswechsel von Lithium zu Kalium aufgezeichnet (Abbildung 3-7 A). Unter konstanten Kaliumbedingungen führte eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Erhöhung der makroskopischen Stromantwort. Eine Zunahme der Gleichgewichtsströme bei steigenden H^+ -Konzentrationen konnte auch bei der statistischen Auswertung in Form von Stromspannungskennlinien beobachtet

werden (Abbildung 3-7 B). Gleichgewichtsströme von Spannungs-abhängigen Kanälen können mathematisch mit dem Wissen um die Einzelkanal-leitfähigkeit $i(U)$, die Anzahl der aktivierbaren Kanäle (N) und die Offenwahrscheinlichkeit (P_O) beschrieben werden (Gleichung (1)). Eine Änderung dieser Parameter führt folglich auch zu einer Änderung der Gleichgewichtsströme. Um herauszufinden welcher Parameter bei DmKT1 durch den pH-Wert beeinflusst wird, wurde zunächst die Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Protonenkonzentration untersucht. Bereits in Abbildung 3-7 B ist neben einer Änderung der Gleichgewichtsströme auch eine Verschiebung der Aktivierungsschwelle zu negativeren Spannungen mit steigendem pH-Wert zu sehen. Um diese Beobachtung genauer zu betrachten, sollte die halbmaximale Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ als Funktion der Membranspannung (Gleichung (3)) ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen die instantanen Ströme (I_T) des Folgepulses bestimmt. Daraufhin wurden die ermittelten I_T gegen die Spannung im Testpuls-Spannungsbereich aufgetragen und die resultierenden Datenpunkte mit einer Boltzmann Funktion beschrieben. Die so errechnete halbmaximale Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ stellt eine Kanal-spezifische Kenngröße dar.

Die Darstellung der relativen Offenwahrscheinlichkeit P_O in Abhängigkeit der angelegten Membranspannungen bei pH 3, 4, 5 und 6 resultierte in unterschiedlichen halbmaximalen Aktivierungsspannungen $U_{1/2}$ (Abbildung 3-8). Bei Ansäuerung des extrazellulären Mediums war eine deutliche Verschiebung von $U_{1/2}$ zu positiveren Membranpotentialen zu erkennen. So

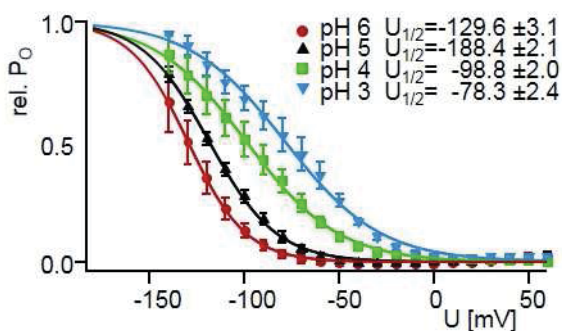


Abbildung 3-8: Bestimmung der relativen P_O und der halbmaximalen Aktivierungsspannung

Zur Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit P_O und der halbmaximalen Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ wurden DmKT1 exprimierende Oozyten mit jeweils 100 mM KCl bei den indizierten pH-Werten perfundiert. I_T wurden gegen die Spannung aufgetragen und mit einer Boltzmann Funktion beschrieben. Daraus ergaben sich die in der Graphik angezeigten $U_{1/2}$ bei den entsprechenden pH-Werten ($n=4 \pm SD$).

verschob sich zum Beispiel, bei einer Erniedrigung des pH-Wertes von 6 auf 3 $U_{1/2}$ um 51.3 mV zu positiveren Spannungen. Als Konsequenz aus diesem H^+ -abhängigen Schaltverhalten von DmKT1 fließt bei einer gegebenen Membranspannung ein größerer Strom, sobald ein niedrigerer pH-Wert vorliegt.

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass das Schaltverhalten des Kaliumkanals aus *Dionaea muscipula* von der extern vorliegenden H^+ -Konzentration abhängig ist. Ob sich die Einzelkanalleitfähigkeit und eventuell die Anzahl der aktivierbaren Kanäle auch pH-abhängig ändern, bleibt noch zu klären.

3.3.5 K⁺-Konzentrationen im niederen mM Bereich lassen DmKT1 verstummen

Die offene Pore eines Ionenkanals ist prinzipiell in beide Richtungen für permeierende Ionen durchgängig. Allein der elektrochemische Gradient des permeierenden Ions bestimmt die Richtung und Intensität des Transports. Liegt beispielsweise das Membranpotential positiv vom Umkehrpotential für das permeierende Kation, so sind Auswärtsströme zu beobachten, während ein Membranpotential negativ von U_{rev} einen Einwärtsstrom erzwingt. Durch das Spannungs-abhängige Schalten von *Shaker*-Kaliumkanälen erreichen diese Kanäle eine Gleichrichtung des Kaliumstroms. Diese Gleichrichtungseigenschaften sind aber nicht unter allen Umständen perfekt. Im Fall von AKT1 aus *Arabidopsis* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Kaliumausstrom bei externen Kaliumkonzentrationen von <1 mM auftritt. Dieser Kaliumausstrom wäre bei dem Wurzelhaar exprimierten Kaliumkanal von Nachteil für die Pflanze. Detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen haben schließlich ergeben, dass dieser Kaliumverlust durch die Heteromerisierung von AKT1 Untereinheiten mit AtKC1 Untereinheiten vermieden wird. Die regulatorische Untereinheit AtKC1 führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativeren Membranpotentialen und nimmt zusätzlich Einfluss auf die Kalium-abhängige Stabilität der Pore des Kanalkomplexes. So schützt sich *Arabidopsis thaliana* unter Kaliummangelbedingungen vor einem Kaliumverlust durch AKT1 (Duby et al., 2008; Geiger et al., 2009; Sharma et al., 2013).

DmKT1 in *Dionaea muscipula* Fallen ist ebenfalls geringen Kaliumkonzentrationen während des Beuteverdaus und des Resorptionsprozesses ausgesetzt, wenn der Hauptanteil der Kaliumionen bereits aufgenommen ist. Aus diesem Gedankenspiel ergeben sich folgende Fragen: (i) Wie ist das Transportverhalten von DmKT1 unter geringen Kaliumbedingungen und (ii) wie gelingt es DmKT1 einen Kaliumverlust zu verhindern? Zur Beantwortung dieser Fragen sollten zunächst etwaige Auswärtsströme bei geringen externen Kaliumkonzentrationen untersucht werden.

Jedoch konnten DmKT1 vermittelte makroskopischer Kaliumeinströme nur bei der Perfusion mit 10 mM KCl detektiert werden, wohingegen weder Ein- noch Auswärtsströme bei 1 mM Kalium im Testspannungsbereich zu beobachten waren (Abbildung 3-9 A und B). Lediglich bei schnellen Spannungssprüngen, ausgehend von DmKT1 aktivierenden (hyperpolarisierenden) Membranpotentialen zurück zur Haltespannung von 0 mV, konnten künstliche transiente Auswärtsströme erzwungen werden (Insertionen Abbildung 3-9 A und B). Aufgrund des anliegenden chemischen Gradienten für Kaliumionen ist ein größerer Ausstrom bei 1 mM als bei 10 mM Kalium im externen Medium zu erwarten. Jedoch zeigten die Vergrößerungen der Stromantworten in Abbildung 3-9 das Gegenteil. In 1 mM Kalium waren die DmKT1 vermittelten Auswärtsströme kleiner als in 10 mM KCl, obwohl der chemische Gradient stärker nach außen gerichtet war. Dies lässt vermuten, dass DmKT1 den Kaliumverlust unter geringen

externen Kaliumbedingungen reduzieren kann, ohne dass eine AtKC1 orthologe Untereinheit mit DmKT1 interagiert.

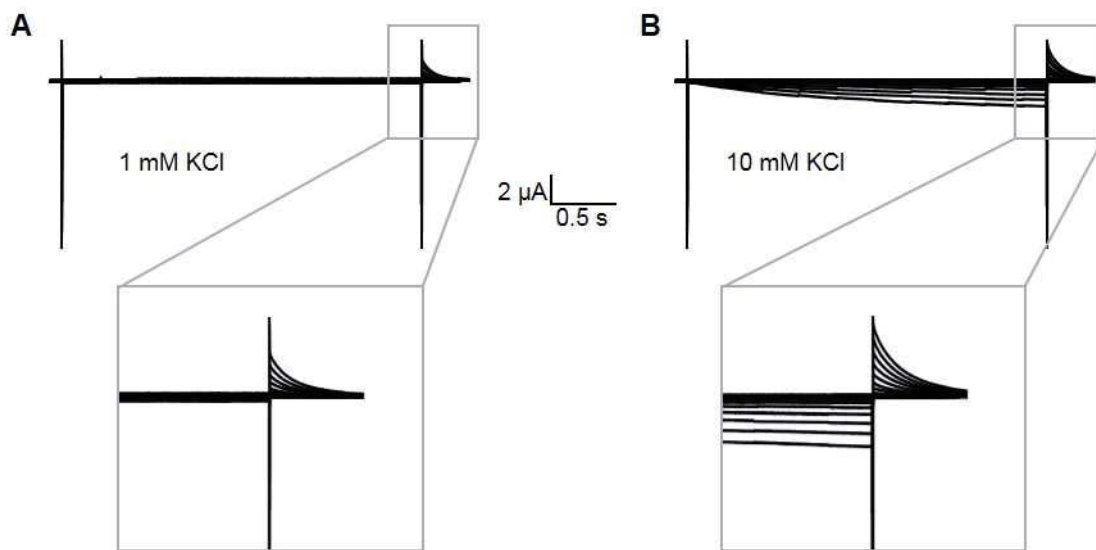


Abbildung 3-9: DmKT1 vermittelt keine Kaliumauswärtsströme

(A) und (B) zeigen repräsentative Stromantworten nach Applikation von Einfachspannungspulsen in der Anwesenheit von 1 (A) oder 10 mM KCl (B) in der Badlösung. Makroskopische Einwärtsströme waren nur in 10 mM KCl zu verzeichnen. Die Insertionen verdeutlichen die erzwungenen Kaliumausströme bei 0 mV.

Gleichgewichtsströme können durch die Kenntnis der folgenden drei Parameter beschrieben werden: Einzelkanalleitfähigkeit $i(U)$, Anzahl der aktivierbaren Kanäle (N) und die Offenwahrscheinlichkeit P_o (siehe auch Gleichung (1)). Im Folgenden wurde zunächst die Kaliumabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von DmKT1 untersucht. Die relative Offenwahrscheinlichkeit ($rel. P_o$) wurde bei externen Kaliumkonzentrationen von 10, 50 und 100 mM bestimmt und ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

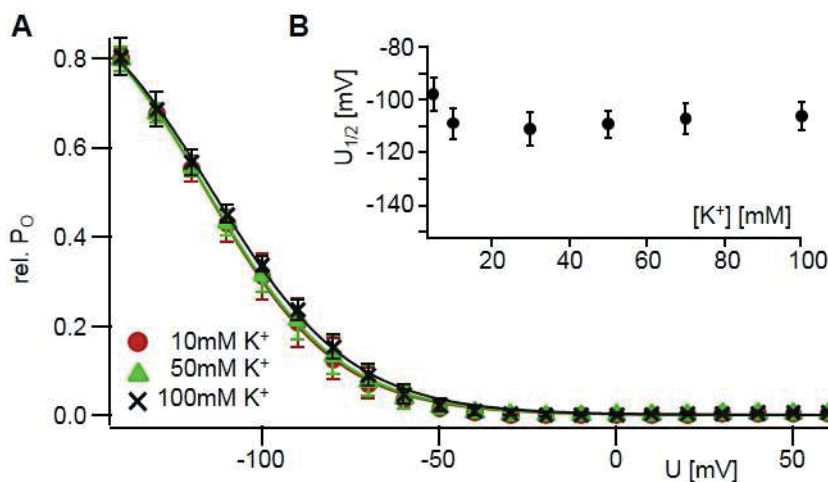


Abbildung 3-10: Bestimmung der $rel. P_o$ bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen

(A) Die Datenpunkte der $rel. P_o$ aufgetragen gegen die Spannung bei 10, 50 und 100 mM K^+ wurden mit einer Boltzmann Funktion beschrieben und resultierten in keiner K^+ -abhängigen Verschiebung von $U_{1/2}$. (B) Die ermittelten $U_{1/2}$ zeigten in Abhängigkeit der $[K^+]$ ein nahezu lineares Verhalten. (A und B; $n=4 \pm SD$)

Die Auftragung der relativen Offenwahrscheinlichkeit gegen die Spannung verdeutlichte, dass das Schaltverhalten von DmKT1 in diesem Kaliumkonzentrationsbereich nicht von der externen K^+ -Konzentration abhängt (Abbildung 3-10 A). Eine Beschreibung der Kurven mit einer Boltzmann Funktion resultierte in halbmaximalen Aktivierungspotentialen von -115.36 ± 1.3 mV bei 10 mM, -115.16 ± 1.3 mV in 50 mM und -113.79 ± 1.6 mV in 100 mM Kalium. In Abbildung 3-10 B sind die ermittelten $U_{1/2}$ eines breiteren Kaliumkonzentrationsbereichs von 5 mM bis 100 mM gegen die Kaliumkonzentration aufgetragen. Diese Darstellung zeigte ein nahezu lineares Verhalten von $U_{1/2}$, sodass von keiner Beeinflussung der relativen Offenwahrscheinlichkeit durch variierenden Kaliumbedingungen ausgegangen werden konnte. Somit muss sich nach Gleichung (1) entweder die Einzelkanalleitfähigkeit oder die Anzahl der aktivierbaren Kanäle Kaliumabhängig ändern. Die Einzelkanalleitfähigkeit lässt sich nur durch Rauschanalysen oder durch Einzelkanalmessungen mit der Hilfe von Patch Clamp-Experimenten bestimmen. Deshalb wurde zunächst das Augenmerk auf die Anzahl der aktivierbaren Kanäle (N), durch die Veranschaulichung der durch DmKT1 verursachten Leitfähigkeiten unter verschiedenen Kaliumkonzentrationen, gerichtet. Die treibenden Kräfte für einen Ionenstrom sind zum einen das Membranpotential und zum anderen der chemische Gradient des permeierenden Ions. Möchte man nun die Leitfähigkeit eines Kanals bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationsgradienten bestimmen, so müssen die treibenden Kräfte bei allen getesteten Ionengradienten konstant gehalten werden. Dazu wurde die „cord conductance“ G (2.12.3) zur Hilfe genommen. Bei der Bestimmung der „cord conductance“ wird der chemische Konzentrationsgradient mathematisch eliminiert, sodass nur eine Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung bestehen bleibt.

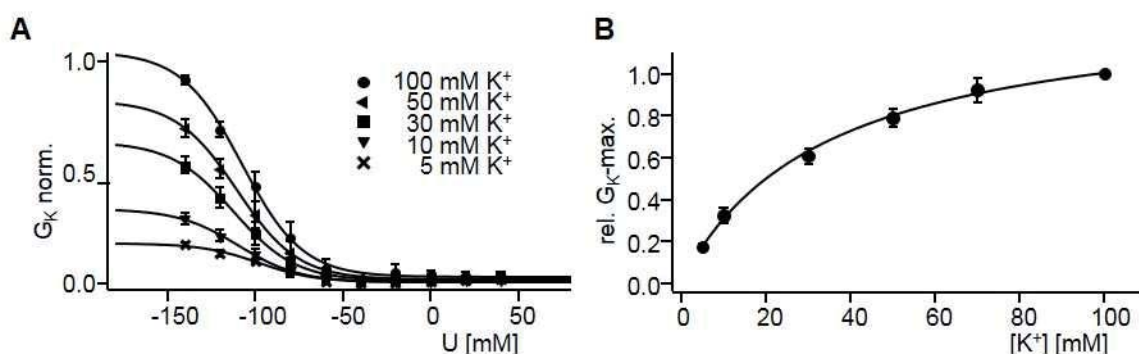


Abbildung 3-11: Bestimmung der „cord conductance“ von DmKT1

(A) Die auf G_{Kmax} bei 100 mM Kalium normalisierten G_K für den K^+ -Konzentrationsbereich von 5 bis 100 mM wurden gegen die angelegte Membranspannung aufgetragen und mit einer Boltzmann Funktion beschrieben. Mit abnehmenden Ionenkonzentrationen verringerte sich die Leitfähigkeit G_K von DmKT1 für Kalium. Die aus (A) resultierenden maximalen „cord conductances“ G_{Kmax} der jeweiligen Konzentrationen ergaben als Funktion der externen Kaliumkonzentration eine Sättigungskurve, die mit einer Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden konnte (B). Daraus konnte eine halbmaximale Kaliumkonzentration $K_{0.5}$ von 34 mM errechnet werden. ($n=5 \pm SD$)

In Abbildung 3-11 A wurde die „cord conductance“ G_K für die K^+ -Konzentrationen von 5 bis 100 mM mit Gleichung (9) bestimmt. Die dafür benötigten Umkehrpotentiale U_{rev} wurden in Zweifachspannungsexperimenten nach einer Voraktivierung der Kanäle bei -100 mV ermittelt. Da allerdings in 5 mM für eine genaue Bestimmung von U_{rev} ein zu geringer Stromfluss vorlag, wurden die Umkehrpotentiale von 10 bis 100 mM extrapoliert. Somit konnte das Umkehrpotential für 5 mM Kalium im externen Medium und die „cord conductance“ G_K für die jeweiligen Kaliumkonzentrationen und Spannungen bestimmt werden. Zur Darstellung wurden die ermittelten G_K auf die maximale „cord conductance“ G_{Kmax} bei 100 mM Kalium normalisiert und gegen die angelegten Spannungen aufgetragen. Die Datenpunkte konnten mit Hilfe einer Boltzmann Funktion beschrieben werden. Dabei ergab sich aus der Boltzmann Funktion zusätzlich die halbmaximale Aktivierungsspannung $U_{1/2}$ für 100 mM K^+ von 106.28 ± 5.4 mV und für 10 mM K^+ von 108.88 ± 5.8 mV. Vergleicht man diese $U_{1/2}$ mit denen zuvor in Abbildung 3-10 bestimmten, so lagen alle $U_{1/2}$ im ähnlichen Spannungsbereich und zeigten keine Verschiebung bei wechselnden K^+ -Bedingungen. Abbildung 3-11 A zeigt, dass sich mit abnehmender externer Ionenkonzentration die Leitfähigkeit von DmKT1 für Kalium reduziert. Bei einer Konzentrationserniedrigung von 100 auf 5 mM verringert sich die Leitfähigkeit um ca. 82 %. Die aus Abbildung 3-11 A resultierenden maximalen „cord conductances“ G_{Kmax} der jeweiligen K^+ -Bedingungen wurden in Abbildung 3-11 B gegen die applizierten Kaliumkonzentrationen aufgetragen. Die Sättigungskurve konnte mit einer Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden und lieferte eine halbmaximale Leitfähigkeit bei 34 mM externen Kaliums.

Zuvor konnte gezeigt werden, dass die rel. Offenwahrscheinlichkeit nicht von der externen Kaliumkonzentration abhängt. Unter der Annahme einer konstanten Einzelkanalleitfähigkeit deuten die Ergebnisse der „cord conductance“-Bestimmungen und des resultierenden $K_{0.5}$ -Wertes auf eine Kalium-abhängige Beeinflussung der Anzahl der aktivierbaren Kanäle (N) hin. Bei 34 mM Kalium im Außenmedium war nur die Hälfte der DmKT1-Proteine aktiv. Kaliummangel könnte also zu einer Reduktion der aktivierbaren DmKT1-Kanäle in der Plasmamembran führen. Dies würde auch die relativ geringen Auswärtsströme unter niedrigen externen Kaliumbedingungen erklären.

Zusammenfassend deuten die elektrischen Eigenschaften und das Expressionsmuster von DmKT1 darauf hin, dass DmKT1 das nieder-affine K^+ -Aufnahmesystem repräsentiert.

3.4 Untersuchung der Transporteigenschaften von DmHAK5

Um Komponenten des hoch-affinen Kaliumtransportsystems in *Dionaea* zu finden, wurde in der Transkriptomdatenbank (TBro) (Ankenbrand, 2015) nach Transportern der HAK/KUP/KT-Familie gesucht, die in den Fallen exprimiert sind. Dabei wurde der AtHAK5 Orthologe Kaliumtransporter DmHAK5 identifiziert und kloniert. Da bislang keine elektrophysiologischen Analysen eines HAK-Transporters gelangen, sollte der *Dionaea* Orthologe, DmHAK5, mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (2.11) im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten analysiert werden. Die resultierenden und im Folgenden vorgestellten Daten konnten von Scherzer, Böhm et al. 2015 veröffentlicht werden (Scherzer, Böhm et al., 2015). Wie bereits für DmKT1 sollte jedoch zuvor ein Einblick auf die Genaktivität von DmHAK5 gewonnen werden, um Hinweise auf seine Beteiligung bei der Kaliumaufnahme in den Fallen zu erhalten.

3.4.1 Expressionsanalysen des *Dionaea* Transporters DmHAK5

Das Expressionsverhalten von DmHAK5 wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) von Dr. Christina Larisch, Lehrstuhl Botanik I der Universität Würzburg, bestimmt und soll im Folgenden kurz beschrieben werden. DmHAK5-Transkripte konnten im Gewebe der Mittelrippe, der Petiole, der Fallen und der Drüsen detektiert werden. Auf Stimulierung des Verdauungs- und Resorptionsprozesses mit dem chemischen Substitut Coronatin (COR) konnte eine Induktion der relativen Expression von DmHAK5 im Fallengewebe und in den isolierten Drüsenkomplexen aufgezeichnet werden (Abbildung 3-12 A). Zur Bestätigung wurde auf Daten des Transkriptombrowser von *Dionaea muscipula* (TBro) zurückgegriffen (Ankenbrand, 2015). Dabei wurden die detektierten Transkripte von DmHAK5 in Fallen und Drüsen gleich eins gesetzt, um die x-fachen Änderung auf die Stimuli Insekt und COR zu erhalten. Wurden *Dionaea* Fallen mit Insekten gefüttert, so konnte eine 5.5-fache Transkripterhöhung von DmHAK5 beobachtet werden. Dies war konform mit der in qRT-PCR ermittelten Erhöhung der Genaktivität im Fallengewebe. Drüsen, die mit COR behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu unbehandelten Drüsen eine fast 18-fache Steigerung der Transkriptrate auf (Abbildung 3-12 B).

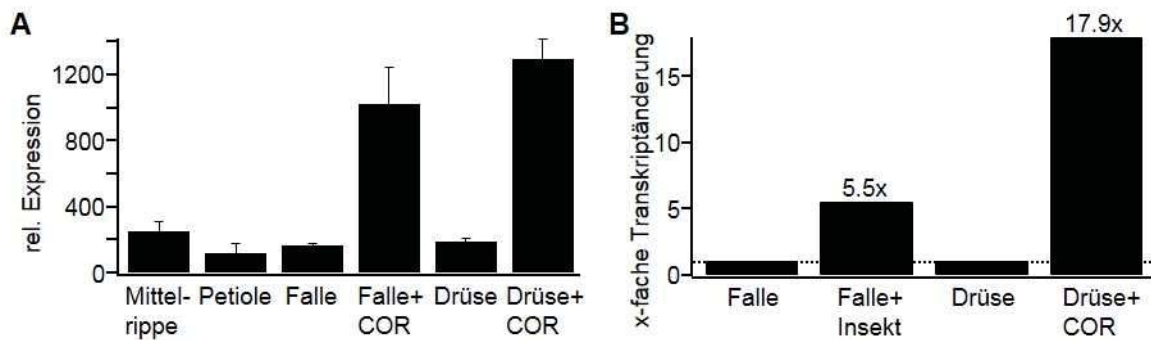


Abbildung 3-12: Gewebs-spezifische Expression und Induktion von DmHAK5

(A) Mittels qRT-PCR konnte die Gewebs-spezifische relative Expression von DmHAK5 in Relation zu 10000 Molekülen DmACT1 (*Dionaea Actin 1*) ermittelt werden. In stimulierten Geweben der Falle und Drüse wurde die Expression von DmHAK5 24 h nach COR-Gabe induziert. (B) Transkriptomdaten zu DmHAK5 aus TBro zeigen ebenfalls eine DmHAK5-Transkripterhöhung in Fallen und Drüsen nach Stimulation durch ein Insekt oder durch COR-Gabe (nach 24 bis 48 h). Um die x-fache Transkriptänderung zu erhalten, wurden die detektierten Transkripte in unstimulierten Geweben gleich eins gesetzt (verdeutlicht durch gestrichelte Linie). Die Daten zu (A) wurden von Dr. Christina Larisch zur Verfügung gestellt und sind, wie die Daten zu (B), die aus dem Transkriptombrowser TBro (Ankenbrand, 2015) stammen, in (Scherzer, Böhm et al., 2015) veröffentlicht.

Die Induktion der DmHAK5-Transkripte in Fallen und speziell im Drüsengewebe deutet auf eine physiologische Rolle und Funktion in den Drüsen nach Auslösen der Verdauungs- und Aufnahmeprozesse hin. Für genauere Einblicke in die Funktion und Regulation des Transporters, wurden seine Transporteigenschaften in *Xenopus* Oozyten analysiert.

3.4.2 Ähnlich wie DmKT1 wird DmHAK5 durch den AtCBL9/AtCIPK23-Komplex aktiviert

Die heterologe Expression des putativen K^+/H^+ -Transporters DmHAK5 in *Xenopus* Oozyten führte bei der Applikation von Kalium im Außenmedium zu keinem detektierbaren Stromfluss über der Membran. Es ist bekannt, dass Kaliumtransportsysteme oft einer posttranslationalen Regulation unterliegen. Als ein Beispiel kann die Aktivierung von AKT1 aus *Arabidopsis* Wurzeln durch die CBL-interagierende Proteinkinase AtCIPK23 herangezogen werden (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Gleichermäßen konnte für den *Dionaea* Orthologen DmKT1 in den zuvor aufgeführten Ergebnissen eine Regulation und Aktivierung mittels CBL9/CIPK23 aus *Arabidopsis* gezeigt werden. Dies und die Tatsache, dass auch Mitglieder der HAK-Transporter als Kaliumaufnahme-systeme beschrieben sind (Gierth et al., 2005; Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006; Qi et al., 2008), legte die Vermutung einer posttranslationalen Regulation von HAK-Proteinen nahe. Somit sollte in *Xenopus* Oozyten eine mögliche Regulation oder Aktivierung von DmHAK5 mit Hilfe von Koexpressionsstudien untersucht werden. Dazu wurde, wie schon zuvor für DmKT1, DmHAK5 zusammen mit der

Proteinkinase AtCIPK23 und dem Kalziumsensor AtCBL9 aus *Arabidopsis thaliana* in Oozyten exprimiert. Unter Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Bedingungen sollten die koexprimierenden Oozyten im Vergleich zur alleinigen Expression von DmHAK5 und nicht-injizierten Kontrolloozyten vermessen werden.

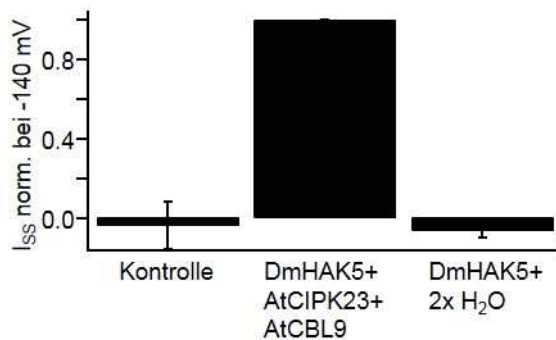


Abbildung 3-13: Aktivierung von DmHAK5 durch einen CBL/CIPK Ca^{2+} -Sensor/Kinase-Komplex

I_{ss} wurden bei einer Spannung von -140 mV in 2 mM KCl aufgenommen und auf die Ströme von DmHAK5/AtCBL9/AtCIPK23 koexprimierenden Oozyten normalisiert. Makroskopische Einwärtsströme konnten nur bei einer Koexpression des Transporters mit dem Sensor/Kinase-Komplex aufgezeichnet werden, aber nicht bei Kontrolloozyten oder der alleinigen Expression von DmHAK5 ($n=6 \pm SD$).

Die auf -140 mV normalisierten Ströme der DmHAK5/AtCBL9/AtCIPK23 koexprimierenden Oozyten bei 2 mM Kalium im Außenmedium sind Abbildung 3-13 gezeigt. Bei alleiniger Injektion der Transporter cRNA mit Wasser anstelle von AtCIPK23 und AtCBL9 (zum Volumenausgleich) konnten keine makroskopischen Kaliumströme verzeichnet werden. Die Stromantwort war vergleichbar mit nicht-injizierten Kontrolloozyten, die ebenfalls keine elektrische Erregung durch die Gabe von 2 mM Kalium aufwiesen. Messungen bei einer angelegten Spannung von -60 mV und einem Lösungswechsel von Lithium zu Kaliumionen verdeutlichten, dass Einwärtsströme nur im Falle einer Koexpression des Transporters mit AtCBL9/AtCIPK23 und nur unter Kaliumlösungsbedingungen auftraten (Abbildung 3-14 A rot). Die resultierenden Einwärtsströme befanden sich in der Größenordnung von ca. -400 nA, wohingegen keine Stromamplitude bei Kontrolloozyten zu verzeichnen war (Abbildung 3-14 A schwarz). Diese Aktivierung von DmHAK5 durch AtCBL9/AtCIPK23 konnte mittels bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC) auf eine physikalische Interaktion der Proteine zurückgeführt werden. Dazu wurden die Fusionsproteine DmHAK5::YC und AtCIPK23::YN sowie das native Protein AtCBL9 in *Xenopus* Oozyten koexprimiert. Lagen diese drei Komponenten durch Koexpression in *Xenopus* Oozyten vor, so konnte eine eindeutige YFP-Fluoreszenz in der Peripherie der Oozyten detektiert werden. Wurde allerdings die Kinase AtCIPK23::YN durch die verwandte Kinase AtCIPK24::YN ersetzt, war keine YFP-Fluoreszenz zu verzeichnen. Die eindeutigen Stromantworten im System der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik und die aufgezeichneten Floreszenzen deuten auf eine Interaktion des Transporters DmHAK5 mit der Kinase AtCIPK23, die mit dem Kalziumsensor AtCBL9 einen Komplex bildet, und auf eine resultierende Aktivierung des Transportproteins bei Perfusion mit Kalium-haltigen Puffern hin. Beachtet man die Expression von DmHAK5 und die gleich lokalisierte Expression der *Dionaëa* Orthologen DmCIPK23 und

DmCBL9 aus Abbildung 3-3 B und C, so kann auch *in planta* eine Interaktion der Proteine und eine Aktivierung von DmHAK5 während der Beuteverdauung angenommen werden.

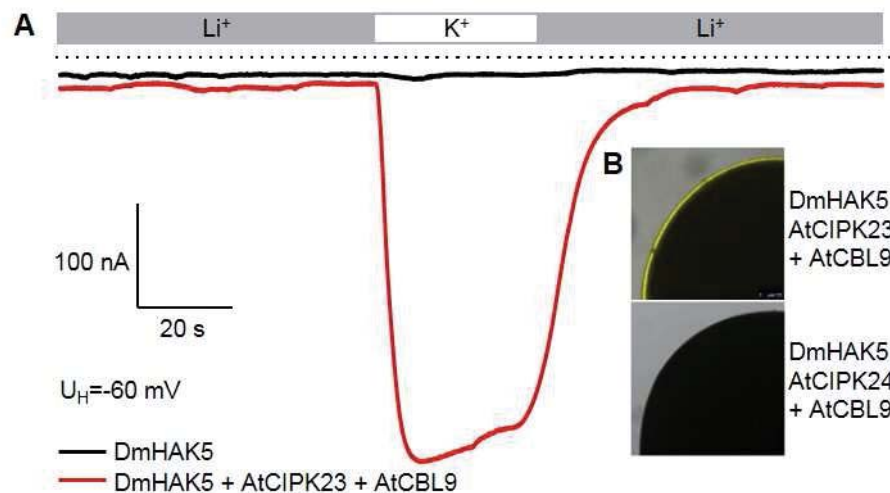


Abbildung 3-14: Interaktion des AtCBL9/AtCIPK23-Komplexes mit DmHAK5 aktiviert den Kaliumtransport

(A) Stromamplitude einer repräsentativen DmHAK5/AtCBL9/AtCIPK23 exprimierenden Oozyte (rot) bei eine Spannung von -60 mV. Bei einem Lösungswechsel von 2 mM Li⁺ zu 2 mM K⁺ konnten makroskopische Einwärtsströme bis ca. -400 nA aufgezeichnet werden. Bei alleiniger Expression von DmHAK5 und gleichem Messverfahren traten keine detektierbaren Ströme auf (schwarz). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Nullstrom-Linie im Spannungsklemmenmodus. In (B) sind BIFC-Messungen von DmHAK5::YC/AtCBL9 exprimierenden Oozyten zusammen mit den Kinasen AtCIPK23::YN (oben) oder AtCIPK24::YN (unten) dargestellt. Bei Koexpression mit AtCIPK23::YN konnte eine YFP-Fluoreszenz an der Oozytenmembran aufgenommen werden, die auf die Interaktion des Transporters mit dem AtCBL9/AtCIPK23-Komplex hindeutet. Die Expression des Transporters, dem Sensor und der Kinase AtCIPK24::YN führte hingegen zu keiner detektierbaren Fluoreszenz.

3.4.3 DmHAK5 weist eine hohe Affinität zu Kaliumionen auf und besitzt ein breites Substratspektrum

In planta Studien weisen HAK-Transporter als hoch-affine Kaliumtransporter aus, die jedoch keine strikte Selektivität für Kalium besitzen (Gierth et al., 2005; Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006). Durch die Identifizierung des DmHAK5 aktivierenden Komplexes AtCBL9/AtCIPK23 war es nun zum ersten Mal möglich, einen HAK5 Transporter isoliert in einem heterologen Expressionssystem auf seine Transportcharakteristika hin zu untersuchen. Wenn im Folgenden DmHAK5 exprimierende Zellen/Oozyten erwähnt werden, handelt es sich um die aktive Form des Proteins, die durch eine Koexpression mit AtCBL9/AtCIPK23 bewerkstelligt wurde.

Um die Selektivität von DmHAK5 zu untersuchen, wurden Sorbitollösungen mit dem pH-Wert von 4 verwendet, die jeweils 2 mM der monovalenten Kationen, Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, NH₄⁺ und NMDG⁺, enthielten. Bei einer angelegten Spannung von -60 mV wurde die Stromantwort

von DmHAK5 exprimierenden Oozyten (rot) und Kontrollloozyten (schwarz) bei den jeweils indizierten Kationen aufgezeichnet (Abbildung 3-15 A). Bei Applikation von Kalium- oder Rubidiumionen konnten makroskopische Einwärtsströme bei DmHAK5 exprimierenden Zellen verzeichnet werden, die eine ähnliche Stromamplitude zeigten. Im Gegensatz dazu waren die DmHAK5 vermittelten Ströme in Ammonium- und Cäsiumlösungen um 50 bis 65 % reduziert. Die Kationen Li^+ , Na^+ und NMDG^+ hingegen lösten keinen Stromfluss über der Membran aus. Dies war ebenso der Fall für Kontrollloozyten, die jedoch in keiner der verwendeten Kationenlösungen eine Stromantwort zeigten. Diese Beobachtungen ließen sich durch die Messungen mehrerer Zellen bei einer Spannung von -140 mV quantifizieren (Abbildung 3-15 B). Somit zeigte sich für DmHAK5 eine Permeabilitätsreihe von $\text{K}^+ \geq \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+$.

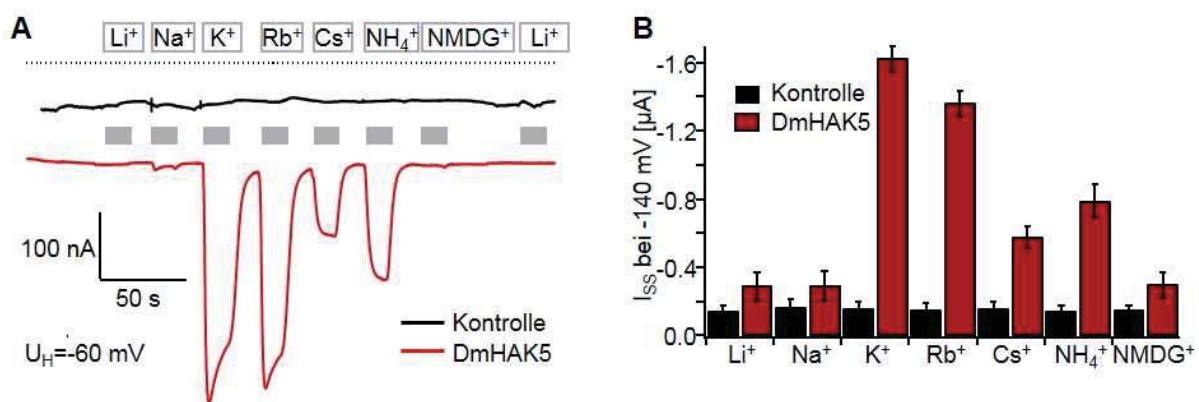


Abbildung 3-15: Selektivität des Transporters DmHAK5

(A) Repräsentative Ströme bei -60 mV einer Kontrollzelle (schwarz) und einer DmHAK5 exprimierenden Oozyte (rot) bei der Perfusion mit jeweils 2 mM der indizierten monovalenten Kationen. K^+ und Rb^+ resultierten in einem vergleichbaren Einwärtsstrom, wohingegen Cs^+ und NH_4^+ verringerte Stromamplituden aufzeigten. In Na^+ , Li^+ und NMDG^+ haltigen Puffern wurden keine Ströme induziert. Die Kontrollzelle wies keinen Stromfluss bei Lösungsänderungen auf. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Nullstrom-Linie. (B) zeigt die gemittelten Ergebnisse der Gleichgewichtsstrommessungen, die bei -140 mV mit den identischen Badlösungen wie in (A) aufgezeichnet wurden ($n=7 \pm \text{SD}$).

Aus den Selektivitätsmessungen ergaben sich die höchste Permeabilität von DmHAK5 für Kalium- und Rubidiumionen. Da Rubidium physiologisch nicht relevant für Pflanzen ist, jedoch Kalium ein wichtiger Makronährstoff darstellt, sollte nun die Affinität von DmHAK5 zu seinem Hauptsubstrat Kalium bestimmt werden. Zur Bestimmung der Affinität von DmHAK5 zu seinem Substrat wurde der K_m -Wert ermittelt. Die Sättigungskinetik der Kalium-abhängigen Ströme wurde dazu mit einer Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben. Der daraus resultierende K_m -Wert wird oft zur Eingruppierung eines Proteins in ein hoch- oder nieder-affines Transportsystem herangezogen.

In Einfachspannungspulsexperimenten wurden die I_{SS} von DmHAK5 exprimierenden Oozyten in einen Kaliumkonzentrationsbereich von 20 bis 2000 μM bestimmt. Die aufgezeichneten Gleichgewichtsströme bei -140 mV wurden auf die am höchsten verwendete Konzentration

von 2000 μM normiert und gegen die applizierten Kaliumkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 3-16).

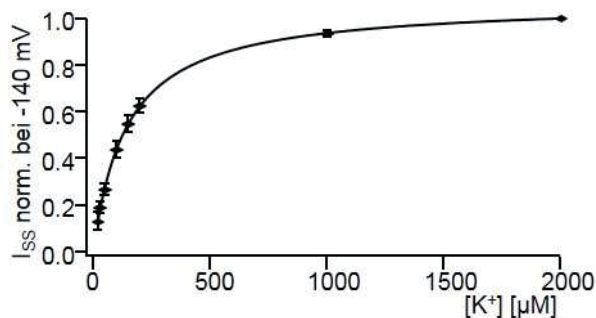


Abbildung 3-16: DmHAK5 vermittelt einen hoch-affinen Kaliumtransport

Die auf 2 mM K^+ normierten I_{SS} bei -140 mV wurden gegen die applizierte K^+ -Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte resultierten in einer Sättigungskurve, die mit einer Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden konnte. Daraus ergab sich für DmHAK5 ein K_m -Wert von $127.38 \pm 2.8 \mu\text{M}$ für Kalium ($n=6 \pm \text{SD}$).

Die Kalium-abhängigen Gleichgewichtsströme, die in Abbildung 3-16 dargestellt sind, resultierten in einer Sättigungskurve. Bei Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (15) ergab sich für den Transporter DmHAK5 ein K_m -Wert von $127.38 \mu\text{M}$ für Kaliumionen. Dieser im mikromolaren Bereich liegende K_m -Wert deutet auf einen hoch-affinen Kaliumtransport über DmHAK5 hin. Somit findet schon bei geringen extrazellulären Ionenkonzentrationen ein durch DmHAK5 vermittelter effizienter Kaliumtransport über der Membran statt. Das aus der Beute freigesetzte Kalium kann somit über DmHAK5 hoch-affin in die Drüsen transportiert werden, wohingegen DmKT1 mit einem K_m -Wert von 108 mM für K^+ den nieder-affinen Transport vermittelt.

3.4.4 DmHAK5 vermittelt keinen Na^+ -Transport, zeigt sich jedoch permeabel für NH_4^+

Verschiedene Versuchsansätze (zum Beispiel Rb^+ -Aufnahmestudien und Untersuchungen zu Membranpotentialänderungen) an Mutantenlinien oder im heterologen System der Hefe konnten bislang die Frage nach einer Natriumleitfähigkeit der HAK-Transporter nicht genau klären. So können in der Literatur verschiedene Aussagen gefunden werden. Zum einen sollen Natriumionen die Kaliumpermeabilität stimulieren und HAK-Transporter der Unterfamilie I a sollen sogar im nieder-affinen Konzentrationsbereich Natrium transportieren können (Spalding et al., 1999; Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006). Zum anderen konnte für AtHAK5 und verwandte pilzartige HAK-Transporter keine Natriumleitfähigkeit bewiesen werden, wohingegen ein Mitglied der Untergruppe IV als ein hoch-affiner Natriumtransporter charakterisiert wurde (Nieves-Cordones et al., 2010; Gomez-Porrás et al., 2012). Die Frage nach der Natriumleitfähigkeit sollte nun für den *Dionaëa* Transporter DmHAK5 elektrophysiologisch analysiert werden. Im gleichen Versuchsansatz sollte auch das Transportverhalten für Ammonium betrachtet werden, da das durch HAK-Transporter

vermittelte hoch-affine Kaliumaufnahmesystem in *Arabidopsis* durch externes Ammonium inhibiert werden kann (Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006; Qi et al., 2008).

DmHAK5 exprimierende Oozyten wurden in Einfachspannungspulsexperimenten abwechselnd in einer Sorbitol-basierenden Lösung, einer 100 mM Na⁺- und einer 100 mM NH₄⁺-Lösung vermessen. Dabei diente die Sorbitollösung als Negativkontrolle, da diese keine permeablen Ionen enthielt. Wurden dieser Lösung jedoch 2 mM Kalium hinzugesetzt, führte dies zu einem Einstrom und diente somit als Positivkontrolle. Im Fall von 100 mM Na⁺ oder 100 mM NH₄⁺ konnten nur in Ammonium eindeutige durch DmHAK5 vermittelte Gleichgewichtsströme bei -140 mV aufgezeichnet werden. Die Perfusion mit Natriumionen führte zu keiner sich von der Negativkontrolle unterscheidenden Stromamplitude (Abbildung 3-17 A). Wurde der Natriumlösung jedoch 2 mM K⁺ zugesetzt, so erfolgte ein Einstrom, dessen Amplitude vergleichbar mit der aufgezeichneten Positivkontrolle war. Dies verdeutlicht, dass im Falle von Natrium- und Kaliumionen nur K⁺ als permeables Substrat für DmHAK5 dient und der Transporter weder eine Natriumleitfähigkeit aufweist, noch durch Na⁺ reguliert wird. Im Gegensatz dazu führte eine Applikation von Kalium zu der Ammonium-haltigen Lösung zu keiner Erhöhung der Stromantwort. 100 mM NH₄⁺ ± 2 mM K⁺ resultierten in Einwärtsströmen mit vergleichbarer Amplitude.

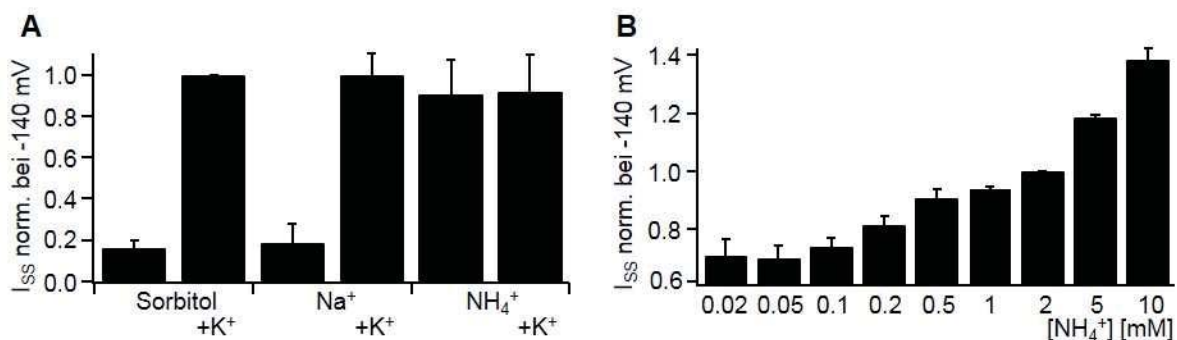


Abbildung 3-17: Transportverhalten von DmHAK5 in Natrium- und Ammoniumlösungen

(A) I_{ss} wurden in Sorbitol-, Na⁺- oder NH₄⁺-basierenden Lösungen bei -140 mV aufgezeichnet. Nur bei der Perfusion mit der 100 mM NH₄⁺-Lösung konnte ein eindeutiger Einstrom durch DmHAK5 beobachtet werden. Die reinen Sorbitol- oder Na⁺-haltigen Lösungen führten zu keinem signifikanten Stromfluss. Die Applikation von 2 mM K⁺ resultierte bei allen Lösungsbedingungen in identischen DmHAK5 vermittelten Stromantworten. I_{ss} wurden auf die Stromantwort in Sorbitol + 2 mM K⁺ bei -140 mV normalisiert (n=7 ±SD). (B) zeigt die auf 2 mM NH₄⁺ und -140 mV normalisierten I_{ss} in Abhängigkeit der Ammoniumkonzentration. Mit steigenden NH₄⁺-Konzentrationen konnten Erhöhungen der Stromamplituden bei -140 mV detektiert werden (n=7 ±SD).

Die Ammoniummessungen aus Abbildung 3-17 A und die Selektivitätsmessungen (Abbildung 3-15) deuten auf eine Ammoniumpermeabilität von DmHAK5 und nicht auf einen inhibitorischen Effekt hin. Deshalb sollte der durch Ammonium verursachte Stromfluss zusätzlich in Abhängigkeit der Ionenkonzentration betrachtet werden. DmHAK5 exprimierende Oozyten wurden mit Ammonium in einem Konzentrationsbereich von 0.02 bis 10 mM

perfundiert und die Gleichgewichtsströme wurden bei -140 mV aufgezeichnet (Abbildung 3-17 B). Es zeigte sich, dass mit ansteigenden Ammoniumkonzentrationen die Einwärtsströme zunahm und bis 10 mM NH_4^+ keine Sättigung erreichten. Deshalb konnte die NH_4^+ -Konzentration mit halbmaximaler Aktivität (K_m -Wert) nicht bestimmt werden. Im Gegensatz zu den aus der Literatur bekannten Daten für AtHAK5, ist bei DmHAK5 kein Block des Ionentransports, sondern eine eindeutige Leitfähigkeit des Proteins für NH_4^+ zu erkennen.

3.4.5 DmHAK5, ein K^+/H^+ -gekoppelter Transport

Als Transportmechanismus für hoch-affine Kaliumtransporter der HAK-Familie wird ein K^+/H^+ -Symport vermutet, sodass hauptsächlich der elektrochemische Protonengradient die treibende Kraft für den Transport von Kalium darstellt. An einem Mitglied der Untergruppe II, der in der Vakuole lokalisiert ist, konnte ein K^+/H^+ -gekoppelter Transport mit einer Stöchiometrie von 1:1 gezeigt werden (Grabov, 2007). Aus diesem Grund sollte nun die Protonenabhängigkeit von DmHAK5 aus der Venusfliegenfalle analysiert werden, um Hinweise auf einen Kotransport von Kalium und Protonen zu erhalten.

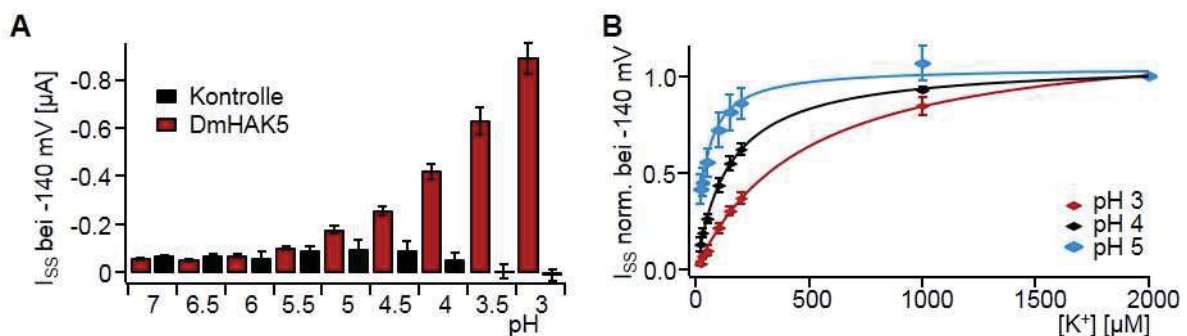


Abbildung 3-18: pH-Abhängigkeit von DmHAK5

(A) I_{ss} bei -140 mV von DmHAK5 exprimierenden Oozyten und Kontrollzellen. Die applizierte Kaliumkonzentration blieb konstant bei 100 mM und die Protonenkonzentration wurde variiert. Die Stromantworten von DmHAK5 stiegen im Vergleich zu denen der Kontrollzellen mit sinkendem pH-Wert ($n=5 \pm \text{SD}$). In (B) wurde die Kaliumkonzentration von 20 bis 2000 μM erhöht und die H^+ -Konzentration wurde konstant bei pH 5, 4 oder 3 gehalten. Die DmHAK5 vermittelten I_{ss} bei -140 mV wurden auf 2000 μM KCl normiert und gegen die ansteigende K^+ -Konzentration aufgetragen. Die resultierenden Sättigungskurven wurden mit Michaelis-Menten beschrieben und ergaben K_m -Werte von $39.31 \pm 4.5 \mu\text{M}$ für pH 5, von $143.75 \pm 1.8 \mu\text{M}$ für pH 4 und von $473.37 \pm 18.1 \mu\text{M}$ für pH 3 ($n \geq 4 \pm \text{SD}$).

Dazu wurden die Gleichgewichtsströme von DmHAK5 exprimierenden Zellen (rot) und Kontrollloozyten (schwarz) unter konstanten und sättigenden Kaliumbedingungen aber variierenden Protonenkonzentrationen bestimmt. Die pH-Werte reichten vom neutralen Bereich bei pH 7 bis zum stark sauren pH von 3, ein pH-Wert, der auch in den geschlossenen Fallen während des Verdauungsprozesses auftritt. Die durch DmHAK5 vermittelten Gleichgewichtsströme bei -140 mV wiesen ab einem pH von 5 Einwärtsströme auf, die mit

steigender Protonenkonzentration stark zunehmen (Abbildung 3-18). Kontrollzellen zeigten bei keinem gestesteten pH-Wert makroskopische Stromantworten. Im Gegensatz dazu erhöhte sich bei DmHAK5 die Stromamplitude um das 5-fache bei einer Änderung des pH-Wertes von pH 5 auf pH 3. Somit war mit steigender H^+ -Konzentration ein verstärkter Kaliumfluss zu beobachten (Abbildung 3-18), was die Hypothese des K^+/H^+ -Symports unterstützt.

Bei einem umgekehrten Versuchsaufbau mit einer steigenden Kaliumkonzentration und gleichbleibenden pH-Werten von 3, 4 oder 5 konnte interessanterweise eine H^+ -abhängige Änderung des ermittelten K_m -Wertes beobachtet werden. Bei jedem verwendeten pH-Wert der Lösungen stieg der durch DmHAK5 verursachte Gleichgewichtsstrom mit der Erhöhung der K^+ -Konzentration. In allen drei Fällen ergab sich eine Sättigungskurve, die mit der Michaelis-Menten-Gleichung (15) beschrieben werden konnte. Für pH 4 resultierte daraus ein K_m -Wert von $143 \mu M$ für Kalium, der in der gleichen Größenordnung des hoch-affinen Transportes liegt, wie der in 3.4.3 zuvor ermittelte K_m von $127 \mu M$. Jedoch führte eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einem „nieder-affineren“ K_m -Wert von über $400 \mu M$. Wurde im Gegensatz dazu der pH auf 5 erhöht, so ergab sich ein K_m von $39 \mu M$, was für einen sehr hoch-affinen Transport spricht. Eine H^+ -abhängige Verschiebung der Affinität ist für Zuckertransporter, wie ZmSUT1 aus Mais, bekannt (Carpaneto et al., 2005). Allerdings steigt die Affinität mit Abnahme des pH-Wertes an und steht somit im Gegensatz zu den hier aufgeführten DmHAK5 Daten.

Um Einfluss auf die treibende Kraft des Protonengradienten zu nehmen, wurde die H^+ -Konzentration im Zytosol der Oozyten erhöht und somit der H^+ -Gradient erniedrigt. DmHAK5- und Kontrollloozyten wurden für ca. 10 min mit einer 10 mM NaAc-Lösung perfundiert. Bei einem pH-Wert von 5.6 der externen Lösung liegt Acetat protoniert (ungeladen) vor und kann somit die Membran passieren. Im Zytosol herrscht anfänglich ein pH-Wert von 7.5, sodass unter diesen Bedingungen das Acetat deprotoniert wird und es zu einer internen Ansäuerung kommt. Zudem ist die deprotonierte Form des Acetats nicht mehr membrangängig und verbleibt in der Oozyte. Nach der internen Ansäuerung wurde mit Einfachspannungspulsen der Gleichgewichtsstrom bei $-140 mV$ in 2 mM Kalium aufgezeichnet.

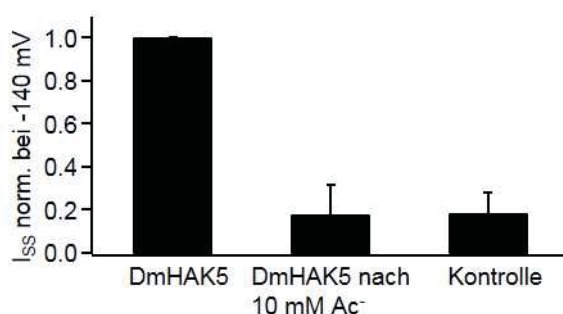


Abbildung 3-19: Intrazelluläre Ansäuerung führt zu verminderten Strömen

Die normierten I_{ss} von DmHAK5- und Kontrollloozyten in 2 mM K^+ pH 5 bei $-140 mV$. 2 mM K^+ führten zu Einwärtsströmen in DmHAK5 exprimierenden Oozyten, die durch eine vorherige Ansäuerung mit Acetat zum Erliegen kamen. Die noch vorhandene Stromamplitude war vergleichbar mit der Stromantwort der Kontrollloozyten ($n=6 \pm SD$).

In einer 2 mM pH 5 Kaliumlösung war vor der Ansäuerung ein ausgeprägter Einwärtsstrom in DmHAK5 exprimierenden Oozyten zu verzeichnen. Dieser kam jedoch nach der Ansäuerung zum Erliegen, sodass die Stromantwort von DmHAK5 in 2 mM K⁺ pH 5 nach Acetatgabe eine vergleichbare Amplitude wie der Strom von Kontrollzellen in 2 mM K⁺ pH 5 aufwies (Abbildung 3-19). Dieses Verhalten konnte auch für Kaliumlösungen mit einem pH von 3 oder 4 beobachtet werden. In Abbildung 3-19 ist die Stromantwort auf Lösungen mit einem pH von 5 als Beispiel aufgeführt. Das Herabsetzen des H⁺-Gradienten über die Oozytenmembran führte also unter Kaliumsättigungsbedingungen bei allen getesteten pH-Werten von 3, 4 und 5 zum Erliegen der DmHAK5 vermittelten Stromamplitude.

Um weitere Anzeichen für einen sekundär-aktiven Transportmechanismus von DmHAK5 zu erhalten, wurde die Temperaturabhängigkeit des Proteins ermittelt. Carrier vollführen im Gegensatz zu Ionenkanälen eine ausgeprägte Konformationsänderung beim Transportvorgang und sind somit Temperatur-sensitiv. Dies zeigt sich in einer starken Erhöhung des Stromflusses mit ansteigender Temperatur. Für Kanäle ist ein Q₁₀-Wert von ≤2 typisch, während bei Carriern der Q₁₀-Wert weitaus höher liegt (2.12.6).

Um die Temperaturabhängigkeit von DmHAK5 zu beobachten, wurden DmHAK5 exprimierende Oozyten mit einer 2 mM Kaliumlösung bei pH 3 perfundiert und die Temperatur über einem Bereich von 10 bis 20 °C bzw. 20 bis 30 °C variiert. In Abbildung 3-20 sind die aufgezeichneten Gleichgewichtsströme bei -140 mV und den angelegten Temperaturen von 10, 20 und 30 °C zu erkennen. Die I_{SS} stiegen mit zunehmenden Temperaturen an und resultierten über den Spannungsbereich von -100 bis -140 mV und dem Temperaturbereich von 10-30 °C in einem Q₁₀-Wert von 6.87. Dieser deutlich über 2 liegende Q₁₀-Wert zeigt, dass der Transportprozess von DmHAK5 dem eines Transporters/Carriers entspricht. Die hier aufgeführten Daten zur Temperaturabhängigkeit von DmHAK5 lieferten somit weitere Hinweise, dass es sich bei diesem Protein um einen K⁺/H⁺-Symporter handelt.

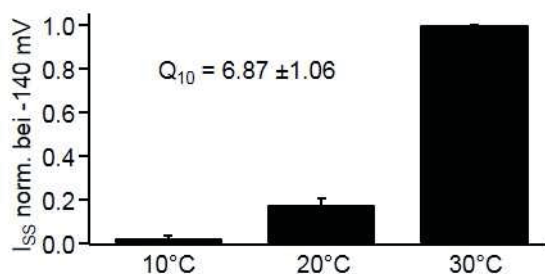


Abbildung 3-20: Temperaturabhängigkeit von DmHAK5

Bei einem Membranpotential von -140 mV und einem pH-Wert von 3 wurden K⁺-induzierte Ströme bei 10, 20 und 30 °C aufgezeichnet. Mit der Erhöhung der Temperatur stiegen auch die Einwärtsströme durch DmHAK5 an. Der Q₁₀-Wert von 6.87 ± 1.1 wurde im Bereich der makroskopischen Ströme bei Spannungen von -100 bis -140 mV berechnet (n=6 ±SD).

3.5 Das Zusammenspiel von DmKT1 und DmHAK5

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl DmKT1 und als auch DmHAK5 in den Drüsen exprimiert sind und dass ihre Expression während des Verdauungsprozesses stark stimuliert werden. Sie stellen beide Kaliumtransportmodule dar, die unter der posttranslationalen Kontrolle der Ca^{2+} -abhängigen Kinase CIPK23 stehen. Neben dieser Gemeinsamkeit weisen sie allerdings stark unterschiedliche Affinitäten zu ihrem Substrat Kalium auf. Um weitere Hinweise auf ihre physiologische Funktion während des Verdauungsprozesses zu erhalten, sollten *in planta* Studien durchgeführt und mit den Daten aus den Oozytenexperimenten verglichen werden.

3.5.1 Biphasische K^+ -Aufnahme in Drüsenzellen wird vom DmKT1-DmHAK5 Kaliumtransportmodul bewerkstelligt

Die nun folgenden *in planta* Studien wurden von Dr. Elzbieta Król durchgeführt und freundlicherweise für die abschließende Betrachtung des Kaliumtransportmoduls in Drüsenzellen der Venusfliegenfalle zur Verfügung gestellt.

Ein Kationenfluss über die Membran führt im Falle eines Einstroms zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Durch Einstichmessungen mit Mikroelektroden in mit Coronatin stimulierten Drüsenzellen der Venusfliegenfalle wurde das Membranpotential als Antwort auf wechselnde externe Kaliumbedingungen bestimmt. Das Ruhepotential einer stimulierten Drüse lag bei ca. -140 mV. Die Membranspannung in einem variierenden Kaliumkonzentrationsbereich von 1 bis 120 mM wurde aufgezeichnet. Die sich vom Ruhepotential ausgehende, ändernde Membranspannung ist in Abbildung 3-21 als Δ (delta) Depolarisation gegen die applizierte Kaliumkonzentration aufgetragen (rot). Die Depolarisation erhöhte sich mit steigenden Kaliumkonzentrationen. Zudem zeigte sich ein biphasischer Kurvenverlauf aus zwei Konzentrations-abhängigen Komponenten. Wurden die einzelnen Sättigungskurven mit einer Michaelis-Menten-Gleichung (15) beschrieben, so ergab sich für die hoch-affine Komponente im K^+ -Bereich von 1 bis 3 mM ein EC_{50} -Wert von 0.48 ± 0.38 mM. Für die nieder-affine Komponente konnte ein EC_{50} -Wert von 65.48 ± 33.7 mM ermittelt werden. Diese EC_{50} -Werte geben die halbmaximalen Aktivitäten der Kaliumaufnahmesysteme in Drüsenzellen wieder. Die in Einstichmessungen untersuchte Kaliumaufnahme an stimulierten Fallen von *Dionaea muscipula* deuten auf das Mitwirken eines hoch- und eines nieder-affinen Transportsystems hin.

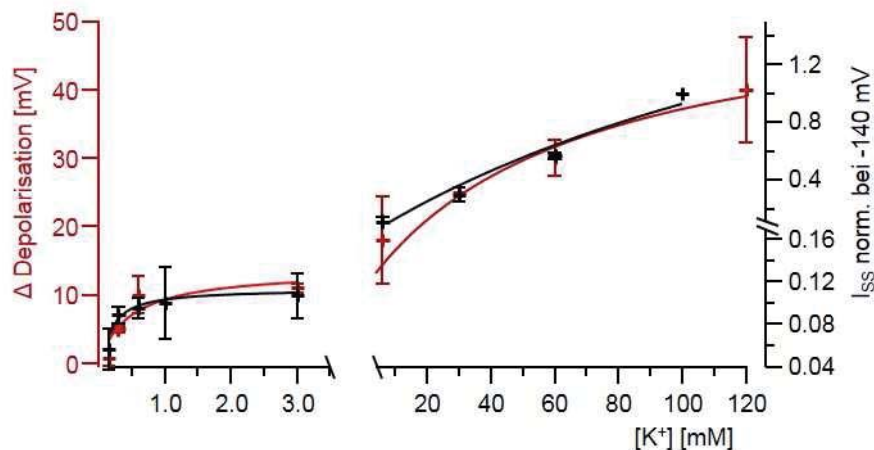


Abbildung 3-21: K⁺-abhängige Membranpotentialänderungen in *Dionaea* Drüsen im Vergleich zu K⁺-abhängigen Stromantworten in DmKT1/DmHAK5 koexprimierenden Oozyten

In Einstichexperimenten wurde die Depolarisation der Membran von COR-stimulierten Drüsenzellen aufgezeichnet (rot) und gegen die applizierte Kaliumkonzentration von 1 bis 120 mM aufgetragen. Mit zunehmender K⁺-Konzentration kam es zu einer steigenden Depolarisation. Die Datenpunkte ergaben im K⁺-Bereich von 1 bis 3 mM und im Bereich von 6 bis 120 mM jeweils Sättigungskurven, die unabhängig voneinander mit einer Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben wurden. Daraus resultierten halbmaximale Depolarisationen, die EC₅₀-Werte (Dr. Elzbieta Król). In schwarz gekennzeichnet sind die normalisierten I_{SS} bei -140 mV von DmKT1/DmHAK5 koexprimierenden Oozyten. Auch diese stiegen mit zunehmender Kaliumkonzentration an und zeigten ebenfalls einen biphasischen Charakter. (3 ≤ n ≤ 8 ±SD)

Um die Situation der Fallen während des Verdauungsprozesses nachzustellen, wurden die Transportproteine DmKT1 und DmHAK5 in Oozyten koexprimiert und in Einfachspannungspulsexperimenten mit Kaliumkonzentrationen von 1 bis 100 mM vermessen. Die aufgezeichneten Gleichgewichtsströme wurden auf eine Konzentration von 100 mM K⁺ und -140 mV normalisiert und sind in Abbildung 3-21 in schwarz dargestellt. Die Gleichgewichtsströme stiegen mit der Kaliumkonzentration an und wiesen ebenfalls einen biphasischen Verlauf auf. Betrachtet man die Kaliumkonzentrationsmessungen der einzelnen Proteine (3.3.3 und 3.4.3), so ist die Summe der einzelnen Transportkinetiken unter variierenden Kaliumkonzentrationen vergleichbar zum biphasischen Kurvenverlauf der Koexpressionsstudien an *Xenopus* Oozyten. Zudem entsprachen die K⁺-abhängigen Kinetiken von DmHAK5 und DmKT1 den hoch- und nieder-affinen Komponenten der *in planta* Messungen. Somit können erste Rückschlüsse auf die physiologische Rolle der Transportproteine gezogen werden und es kann vermutet werden, dass die hoch- und nieder-affine Kaliumresorption in *Dionaea* Fallen durch DmHAK5 (hoch-affin) und DmKT1 (nieder-affin) vermittelt wird.

3.6 DmHKT1 repräsentiert ein Transportmodul zur Natriumaufnahme in *Dionaea* Fallen

Während der Beuteverdauung in den Fallen von *Dionaea muscipula* werden erhebliche Konzentrationen (bis zu 30 mM) an Natriumionen freigesetzt (Ajai A. I., 2013; Finke, 2013). Nach dem Wiederöffnen der Fallen befinden sich keine Rückstände oder Salzablagerungen der Beute in den Fallen oder auf dem Fallengewebe. Dies führt zur Annahme, dass *Dionaea* Fallen neben Transportproteinen für Kalium, Ammonium und weiteren Nährstoffen auch über ein Aufnahmemodul für Natriumionen verfügt (Scherzer et al., 2013; Scherzer, Böhm et al., 2015). Diese Annahme sollte nun im Folgenden untersucht und bestätigt werden.

3.6.1 Aufnahme von Natrium in das Fallengewebe

Um zu zeigen, dass Natrium ins Fallengewebe aufgenommen wird und das deshalb keine Natriumchloridrückstände an der Oberfläche der Falleninnenseite zu finden sind, wurden Aufnahmestudien zum einen von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rennenberg der Universität Freiburg und zum anderen von Christian Lorey durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

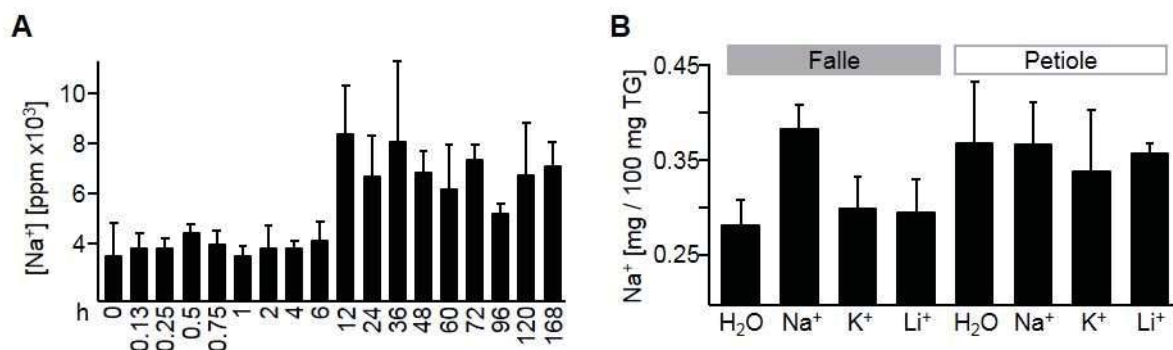


Abbildung 3-22: Natriumaufnahme von sekretierenden Venusfliegenfallen

(A) Mit COR-stimulierte Fallen wurden mit Insektenpulver gefüttert und der Natriumgehalt über die Zeit mit Hilfe von ICP-OES Technik bestimmt. 12 h nach Stimulierung der Verdauungsphase und Fütterung ist ein deutlicher Anstieg in der Na⁺-Konzentration des Fallengewebes zu verzeichnen. Die Probenentnahme wurde von Jörg Kruse (AG Rennenberg, Universität Freiburg), die Analyse von Elfriede Reisberg (AG Hedrich, Universität Würzburg) durchgeführt (n=3 ±SD). (B) In einem zweiten Ansatz wurde der Natriumgehalt in stimulierten Fallen und den korrespondierenden Petiolen mit Hilfe der AAS-Technik untersucht. 24 h nach der Stimulierung der Sekretion durch COR wurden die Fallen mit Wasser, Natrium, Kalium und Lithium gefüttert. Es war ein Anstieg der Na⁺-Konzentration in den mit Na⁺ gefütterten Fallen zu erkennen. Der Na⁺-Gehalt der Petiolen blieb jedoch unverändert. Die Analysen wurden von Christian Lorey (AG Hedrich, Universität Würzburg) durchgeführt (n=5 ±SD).

In Abbildung 3-22 A wurde der Verdauungsprozess in *Dionaea* Fallen mit Coronatin stimuliert und zum Zeitpunkt t = 0 h mit einem Insektenpulver gefüttert. Dieses Insektenpulver wurde schon in früheren Aufnahmestudien verwendet und enthielt ca. 5 mM Na⁺ (Kruse et al., 2014).

Der Natriumgehalt wurde nach dem Trocknen und dem Aufschluss der Fallen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe der optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-OES) bestimmt. 12 h nach Fütterung war ein deutlicher Anstieg der Na⁺-Konzentration zu verzeichnen, der über die nachfolgende gemessene Zeit (t = 168 h) nicht zum Ausgangslevel zurückkehrte. In einem weiteren Ansatz (Abbildung 3-22 B) wurden stimulierte Fallen mit unterschiedlichen Ionenlösungen gefüttert und der Natriumgehalt mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) in den Fallen und den dazu gehörigen Petiolen bestimmt. Die Ionenkonzentration der Beutetiere unterscheidet sich je nach Art und Größe der Beute. Um in dieser zweiten Analyse den beschriebenen Konzentrationen von Finke et al. 2002, 2013 nahe zu kommen, wurden die zu testenden Ionen in einer Konzentration von 1.15 µmol (30 mM) appliziert und die Na⁺-Konzentration nach 3 Tagen bestimmt (Finke, 2002, 2013). Fallen, die mit Kalium oder Wasser und Lithium als Kontrolle gefüttert wurden, zeigten einen vergleichbaren Natriumgehalt. Fallen, die mit Natrium gefüttert wurden, wiesen eine stark erhöhte Na⁺-Konzentration in den Fallen auf, vergleichbar mit dem steigenden Natriumgehalt der Fallen aus Versuchsansatz A (Abbildung 3-22 A). Interessanterweise blieb die Na⁺-Konzentration in den Petiolen konstant und war nicht durch die Na⁺-Fütterung in den Fallen beeinflusst. Diese Studien deuten auf eine Aufnahme von Natrium während der Resorptionsphase hin. Dennoch werden diese Ionen nicht weiter in die Petiolen transportiert und scheinen im Fallengewebe zu verbleiben.

3.6.2 Phylogenie und Expression von DmHKT1

Nachdem mit Hilfe der EST-Datenbank ein putativer Na⁺-Kanal identifiziert und kloniert werden konnte (Tabelle 3-1), sollte durch Sequenzanalysen eine Eingruppierung des Proteins in eine Transporterklasse erfolgen. Das Vergleichen der Aminosäuresequenzen von bereits bekannten Na⁺-Transportproteinen aus den Pflanzenspezies *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum* und dem aus *Dionaea* stammenden Protein DmHKT1, ergab eine phylogenetische Einordnung in Mitglieder der HKT-Familie (Abbildung 3-23). Innerhalb der HKT-Familie kann aufgrund einer Aminosäure in der ersten Porenregion und der damit verbundenen Transporteigenschaft zwischen zwei Untergruppen unterschieden werden. Für Vertreter der Gruppe I ergibt sich somit das Sequenzmotiv S-G-G-G für die vier Porendomänen, wohingegen Gruppe II G-G-G-G als Abfolge aufweist (Maser et al., 2002b; Platten et al., 2006). DmHKT1 besitzt an Position 84 ein Serin und zeigt innerhalb der gesamten ersten Porendomäne die charakteristische Sequenzabfolge von Mitgliedern der Untergruppe I auf. Deshalb konnte DmHKT1 phylogenetisch eindeutig in die Unterklasse I der HKT-Familie eingruppiert werden. Dies gibt auch der Verwandtschaftsgrad von DmHKT1 zu

den im Stammbaum aufgeführten Proteinen wieder. Eine Identität von über 50 % zu den HKT-Proteinen aus *Vitis vinifera* und die Homologie zu AtHKT1 mit >40 % bestätigt, dass es sich bei DmHKT1 um einen Vertreter der Untergruppe I handelt. Hingegen zeigt DmHKT1 nur einen Verwandtschaftsgrad von <40 % mit den Reisorthologen der Gruppe II.

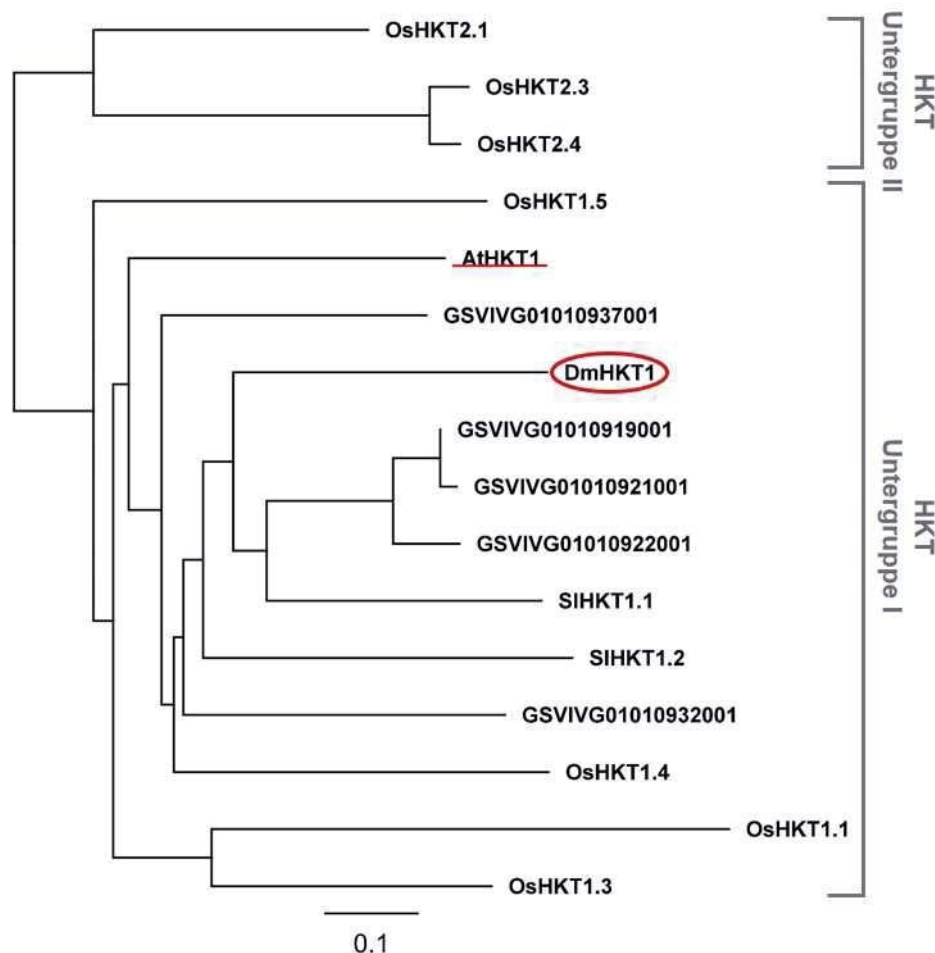


Abbildung 3-23: Phylogenetische Klassifizierung von DmHKT1

Die Eingruppierung von DmHKT1 aus der Venusfliegenfalle basiert auf Sequenzhomologien zu Mitgliedern der HKT-Transportproteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum*. Innerhalb dieser Familie konnte DmHKT1 (umrandet) der Untergruppe I zugeordnet werden und fand sich somit in der gleichen Klasse wie HKT1 aus *Arabidopsis* (unterstrichen) wieder. Der Stammbaum wurde mit der Software Geneious 8.1.4 erstellt und aus Anhang A sind die Transportproteine mit Genbank (Accession)-Nummern zu entnehmen.

Während die Untergruppe II HKTs beinhaltet, die Natrium und/oder Kalium transportieren, sind die Mitglieder der Untergruppe I Natrium-spezifische Transportproteine. Durch die phylogenetische Klassifizierung von DmHKT1 als Mitglied der Untergruppe I der HKT-Proteine ist der *Dionaea muscipula* HKT1 ein aussichtsreicher Kandidat, der für die Na⁺-spezifische Aufnahme während der Nährstoffresorption verantwortlich sein könnte. Um seine Beteiligung an der Natriumresorption zu klären, sollte mit Hilfe von Expressionsstudien das Transkriptmuster von DmHKT1 analysiert werden. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

wurde von Dr. Christina Larisch und Katharina von Meyer, Lehrstuhl für Botanik I der Universität Würzburg, durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

Unter unstimulierten Bedingungen war DmHKT1 nur moderat in der Mittelrippe, der Petiole, der Fallen und den Drüsen exprimiert. Jedoch stieg die Expressionsrate mit der Coronatin-Stimulierung der *Dionaea* Fallen im Fallen- und Drüsengewebe um ein Vielfaches (bis zu 16-fach) an (Abbildung 3-24 A). Die Induktion der DmHKT1-Transkripte in den Fallen und Drüsen erreichte das Maximum 4 h nach der Sekretionsstimulierung mittels COR. Im Fallengewebe hielt diese erhöhte Expression bis zu 36 h an (Abbildung 3-24 B).

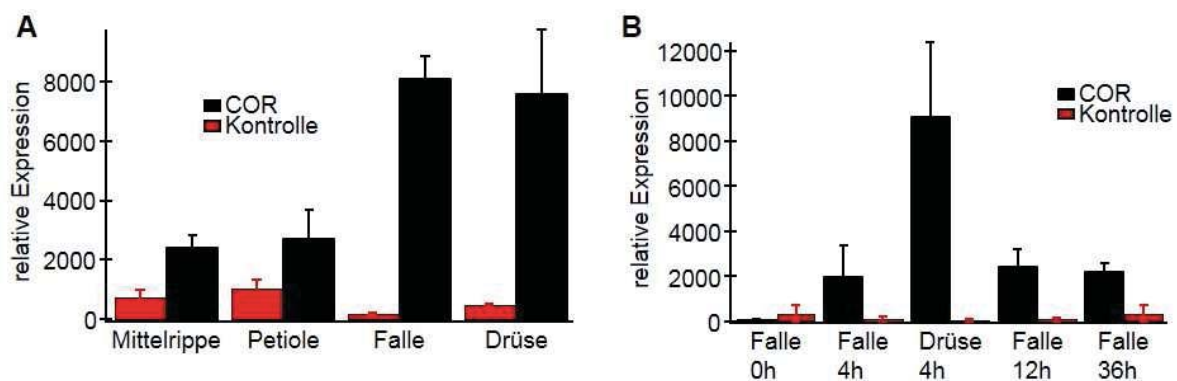


Abbildung 3-24: Gewebs-spezifische Expression von DmHKT1 nach Stimulierung der Sekretion (A) zeigt die relative Expression von DmHKT1 in Relation zu 10000 Molekülen DmACT1 (*Dionaea* Actin 1) im Gewebe der Mittelrippe, der Petiole, der Falle und der Drüsen. In unstimuliertem Gewebe (rot) lag eine geringe Transkriptmenge an DmHKT1 vor. Diese wurde durch die Stimulierung der Sekretion (schwarz) vor allem in der Falle und den Drüsen um ein Vielfaches induziert ($n \geq 3 \pm SD$). Der zeitliche Verlauf der induzierten Expression von DmHKT1 ist in (B) dargestellt. Auch hier zeigten unstimulierte Fallen und Drüsen (rot) keine Expressionsveränderung über die Zeit. Im Gegensatz dazu war bei stimulierten Fallen und Drüsen (schwarz) nach 4 h ein eindeutiger Anstieg in der Expression zu erkennen, der im Fallengewebe bis zu 36 h nach der Stimulierung bestehen blieb ($n \geq 3 \pm SD$).

Das Fallen- und Drüsen-spezifische Expressionsmuster von DmHKT1 lässt auf seine Beteiligung an der Natriumaufnahme aus dem Beutetier schließen. Die Expression des Transportproteins im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten soll einen Einblick in seine Transportcharakteristika geben und somit die physiologische Funktion beim Resorptionsprozess der Fallen klären.

3.6.3 DmHKT1 vermittelt Na^+ -abhängige Strom- und Membranspannungsantworten

Vertreter der Untergruppe I der HKT-ähnlichen Proteine weisen eine spezifische Leitfähigkeit für Natrium auf. In Einfachspannungspulsexperimenten sollte nun die Natriumleitfähigkeit für DmHKT1 der Venusfliegenfalle untersucht werden. DmHKT1 exprimierende Oozyten wurden mit 100 mM Natriumchlorid umspült und die Stromantwort oder Depolarisation der Membran

wurde aufgezeichnet. Nicht injizierte Oozyten wiesen keinen Stromfluss bei Applikation von Natriumionen auf, wohingegen DmHKT1 exprimierende Zellen eine deutliche Stromantwort zeigten (Abbildung 3-25 A und B). Die Stromantwort (Abbildung 3-25 B) wurde in einem Spannungsbereich von +60 bis -200 mV aufgezeichnet und zeigte deutlich einen Natriumeinstrom bis zu $-20 \mu\text{A}$ sowie einen Ausstrom bis zu $5 \mu\text{A}$. Im Gegensatz zu dem davor beschriebenen Kaliumkanal DmKT1 besitzt DmHKT1 kein Spannungs-abhängiges Schaltverhalten und vermittelt deshalb je nach dem anliegenden elektrochemischen Na^+ -Gradienten Natriumströme in beide Stromrichtungen.

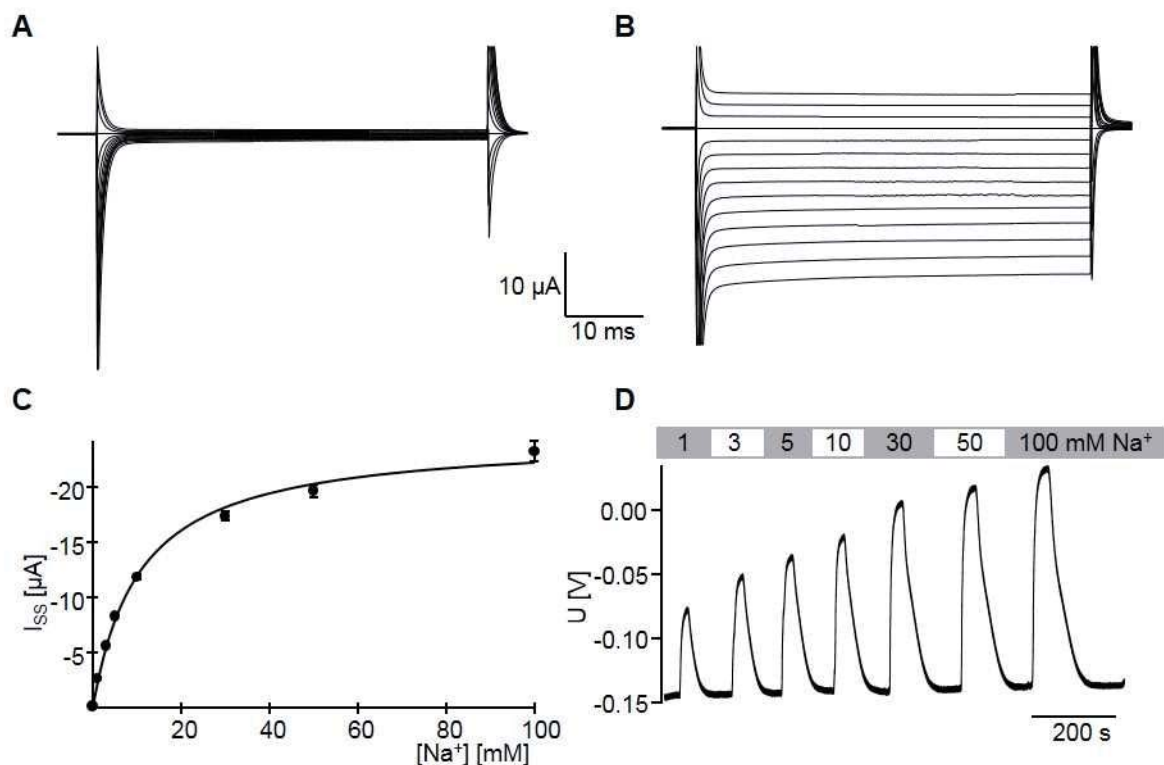


Abbildung 3-25: Stromantwort und Depolarisation von DmHKT1 exprimierenden Oozyten

Stromantwort einer repräsentativen Kontrolloozyte (A) sowie einer DmHKT1 exprimierenden Zelle (B) in einem Spannungsbereich von +60 bis -200 mV in Anwesenheit von 100 mM NaCl. (C) Die durch DmHKT1 vermittelten Gleichgewichtsströme bei -140 mV sind gegen die applizierten steigenden Na^+ -Konzentrationen von 0 bis 100 mM aufgetragen. Der in Sättigung gehende Kurvenverlauf konnte mit der Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden und resultierte in einem K_m -Wert von $10.57 \pm 1.0 \text{mM}$ für Natrium ($n=3 \pm \text{SD}$). (D) Neben den Stromantworten konnten im Stromklemmenmodus die Membranspannung einer repräsentativen Zelle bei variierenden Na^+ -Konzentrationen (1 bis 100 mM) aufgezeichnet werden. Eine steigende externe Ionenkonzentration führte zu einer Erhöhung der Depolarisation der Oozytenplasmamembran.

In Abbildung 3-25 C und D sind die DmHKT1 vermittelten Na^+ -abhängigen Ströme und Depolarisationen der Plasmamembran dargestellt. Die Stromamplitude stieg mit steigender extrazellulärer Natriumkonzentration und verlief in einer Sättigungskurve, sodass sich mit Hilfe einer Michaelis-Menten-Gleichung (15) ein K_m -Wert von DmHKT1 zu Natriumionen von 10 mM ermitteln lässt (Abbildung 3-25 C). Der durch DmHKT1 verursachte Natriumeinstrom in die

Oozytenzellen hatte eine Depolarisation der Plasmamembran zur Folge, die ebenfalls eine Natriumabhängigkeit aufwies (Abbildung 3-25 D). In einem Konzentrationsbereich von 1 bis 100 mM Na⁺ depolarisierte die Membran von -150 bis zu +5 mV bei der Applikation von 100 mM Na⁺. Wurde das Substrat durch andere monovalente Ionen wie Li⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ und dem für Kationenkanäle nicht permeierenden NMDG⁺ Kation ersetzt, so konnte die strikte Selektivität von DmHKT1 aufgezeigt werden (Abbildung 3-26 A). Das resultierende Strom-Spannungs-Diagramm verdeutlicht nochmals, dass DmHKT1 kein Spannungs-abhängiges Schaltverhalten besitzt.

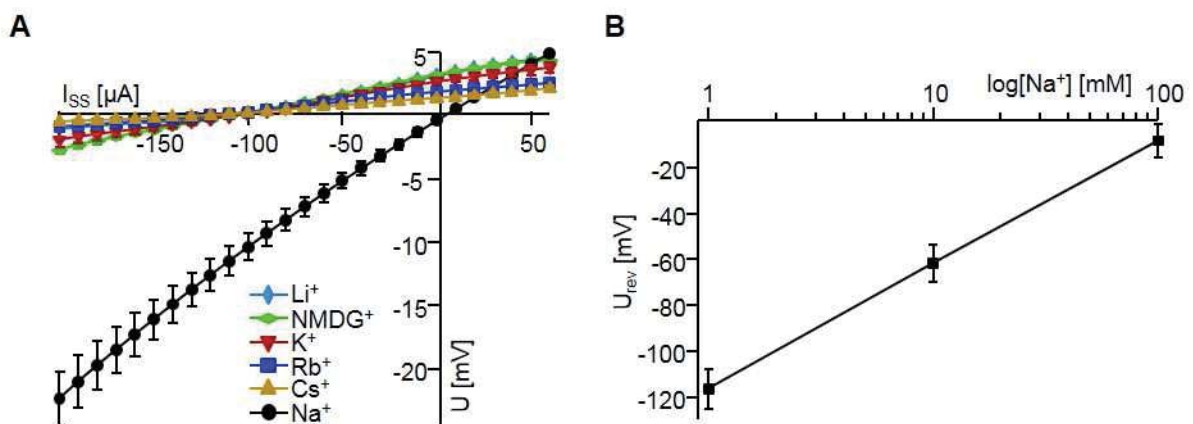


Abbildung 3-26: Selektivität von DmHKT1 der Venusfliegenfalle

(A) Strom-Spannungs-Kennlinien von DmHKT1 in einem Spannungsbereich von +60 bis -200 mV und verschiedenen monovalenten Kation (wie in Graphik angegeben). Ein durch DmHKT1 vermittelter Einstrom war nur bei der Applikation von Natrium zu erkennen ($n=5 \pm SD$). (B) Die ermittelten Umkehrpotentiale (U_{rev}) wurden gegen die logarithmische Skalierung der externen Natriumkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte konnten mit einer linearen Funktion beschrieben werden und weisen somit auf eine strikte Na⁺-Selektivität von DmHKT1 hin ($n=3 \pm SD$).

Des Weiteren kann Abbildung 3-26 entnommen werden, dass ein Einstrom nur in Natrium enthaltenden Puffern zu verzeichnen war. Ausströme hingegen konnten auch bei Änderungen der externen Ionen beobachtet werden. Da injizierte Oozyten während der Expression in einer mit 96 mM versetzten Natriumlösung inkubierten, konnten DmHKT1 exprimierende Zellen mit diesem Ion intrazellulär angereichert werden, sodass es bei Spannungen positiv vom Umkehrpotential des jeweiligen Ions zu einem Natriumausstrom kam. Diese Anreicherung des Oozytenzytosols mit Natrium führte letztendlich zu einem Austausch von Kalium und Natrium, sodass Messungen der Natriumkonzentration bei DmHKT1 exprimierenden Zellen einen Gehalt von 81 mM ergaben. Dies erklärt, dass bei Applikation von 100 mM Na⁺ ein Umkehrpotential von -8.3 ± 4.5 mV erreicht wurde. Wurde nun die extrazelluläre Natriumkonzentration variiert und das resultierende Umkehrpotential bestimmt, so ist zu erkennen, dass mit einer 10-fachen Na⁺-Änderung das Umkehrpotential eine Nernst-Verschiebung von 54.67 ± 0.94 mV (von 1 zu 10 mM NaCl) und 53.33 ± 0.94 mV (von 10 zu 100 mM NaCl) aufwies. Somit zeigten die Umkehrpotentiale aufgetragen gegen die

logarithmische Skalierung der Substratkonzentration ein lineares Verhalten, welches die perfekte Natriumselektivität von DmHKT1 widerspiegelt (Abbildung 3-26 B).

Das Transportverhalten von DmHKT1 führt zu der Annahme, dass der *Dionaëa* Kanal wie auch der Orthologe *Arabidopsis* AtHKT1 in einem Kanalmodus anstelle eines Transporter- bzw. Carriermodus fungiert (Xue et al., 2011). Dies sollte durch die Bestimmung des Temperaturabhängigen Q_{10} -Wertes bestätigt werden. Zudem sollte, obwohl während der Verdauung das Sekret stark ansäuert (Escalante-Perez et al., 2011), ein Einfluss von Protonen ausgeschlossen werden.

3.6.4 DmHKT1 ist trotz seiner widersprüchlichen Namensgebung ein Kanal

Während der Beuteverdauung wird der „externe Magen“ der Venusfliegenfalle stark angesäuert, da die Sekretion mit einem ins Falleninnere gerichteten Protonenfluss einhergeht (Escalante-Perez et al., 2011). Die beiden zuvor erläuterten Kaliumtransportproteine zeigten zum einen einen Kotransport von Protonen und Kalium im Falle von DmHAK5 und zum anderen eine Säureaktivierung bei DmKT1. Im Gegensatz dazu kann Abbildung 3-27 A entnommen werden, dass der Natriumkanal DmHKT1 nicht von einer externen Änderung der Protonenkonzentration beeinflusst wurde. Die Stromamplituden der bei -140 mV aufgezeichneten Gleichgewichtsströme in 100 mM Natrium waren bei pH 4, 6 und 8 von gleicher Intensität, sodass eine Ansäuerung des „Magens“ keine Auswirkung auf DmHKT1 vermittelte Natriumströme haben sollte.

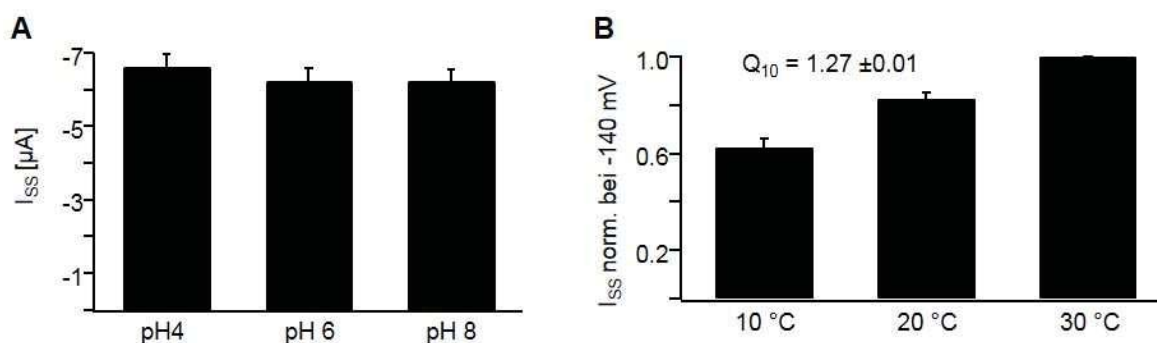


Abbildung 3-27: Der Einfluss von H⁺ und der Temperatur auf den DmHKT1 vermittelten Na⁺-Strom

(A) DmHKT1 I_{ss} bei -140 mV in 100 mM NaCl und den angezeigten pH-Werten. Die Stromamplituden zeigten keine H⁺-Abhängigkeit und wiesen bei pH 4, 6 und 8 ca. -6 µA auf ($n=4 \pm SD$). (B) Die auf 100 mM Na⁺ bei -200 mV und 30 °C normalisierten I_{ss} und einem Membranpotential von -140 mV wurden bei 10, 20 und 30 °C aufgezeichnet. Die Natriumströme stiegen nur moderat mit der Erhöhung der Temperatur. Der Q_{10} -Wert von 1.27 ± 0.01 wurde in einem Spannungsbereich von -50 bis -200 mV berechnet ($n=5 \pm SD$).

Die ersten beschriebenen HKT-Proteine wurden als K^+ -Transporter beschrieben und somit als hoch-affine K^+ -Transporter, HKT, benannt (Schachtman and Schroeder, 1994). Mittlerweile konnte den Proteinen der Unterfamilie II eine Funktion im gekoppelten K^+ und Na^+ Transport und denen der Klasse I ein reiner Natriumtransport zugeschrieben werden (Almeida et al., 2013), sodass die Namensgebung widersprüchlich zur Funktion ist. Da die phylogenetische Klassifizierung und das zuvor ermittelte „Nernst-Verhalten“ von DmHKT1 auf eine Funktion des Proteins als Natriumkanal hindeuteten, wurde dies nun mit der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit bestätigt (Abbildung 3-27 B) (2.12.6). Die Gleichgewichtsströme in Natrium waren durch eine Änderung der Temperatur von $10^\circ C$ auf $20^\circ C$ und auf $30^\circ C$ kaum beeinflusst. Bei $10^\circ C$ war die Stromamplitude nur um ca. 40 % geringer als bei $30^\circ C$. Dies führte letztendlich zu einem Q_{10} -Wert von 1.27. Dieser deutlich unter 2 liegende Q_{10} -Wert zeigt, dass der Ionentransport über DmHKT1 einem passiven, durch einen Kanal vermittelten Transport entspricht und bestätigt somit, dass DmHKT1 als ein Natriumkanal und nicht als Transporter/Carrier fungiert.

3.6.5 Ein Glycin in der ersten Porendomäne führt zu einer Änderung der Selektivität

Schon 2002 konnte gezeigt werden, dass das Serin in der ersten Porendomäne der Klasse I HKT-Proteine eine entscheidende Rolle bei ihrer Selektivität für Natrium spielt. Wird dieses zu einem Glycin mutiert, so entsteht neben einer Natriumleitfähigkeit auch eine Permeabilität für Kalium (Maser et al., 2002b). Mit diesem Hintergrundwissen sollte nun im Folgenden die Auswirkung der Mutation des Serins zu einem Glycin am DmHKT1-Kanal der Venusfliegenfalle analysiert werden. Durch den Abgleich der DmHKT1 Aminosäuresequenz mit den Proteinen der Untergruppe I aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum* konnte an Position 84 das Serin der ersten Porendomäne identifiziert werden (Anhang B). Mittels gerichteter Mutagenese (2.2.5) konnte diese Aminosäure zu einem Glycin mutiert und die Transportcharakteristika des resultierenden Konstruktes konnten im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten ermittelt werden.

Abbildung 3-28 A stellt den Vergleich der Gleichgewichtsströme des DmHKT1 Wildtyps (WT) und der Mutante S84G bei $-140 mV$ dar. In beiden Fällen konnte für das Kontrollion Lithium keine Stromantwort detektiert werden. Wurde mit $100 mM$ Natrium perfundiert, vermittelte der WT bei der angelegten Spannung von $-140 mV$ einen Natriumeinstrom bis zu ca. $-15 \mu A$. Auch die Mutante wies einen Natriumfluss in die Oozyten auf, jedoch war dieser um ca. $\frac{1}{3}$ reduziert. Wie aus der Literatur zu erwarten, zeigte DmHKT1 S84G im Gegensatz zum Wildtyp bei der Applikation von $100 mM$ Kalium ebenfalls eine Stromantwort, die in ihrer Amplitude

vergleichbar mit dem Stromfluss in Natrium war. Diese Natrium- und Kaliumleitfähigkeit der Mutante konnte bei der Aufzeichnung der Strom-Spannungs-Kennlinie bestätigt werden. Über den angelegten Spannungsbereich von +60 bis -200 mV konnten Natrium- sowie Kaliumströme detektiert werden. Der Austausch des Testions gegen Li^+ , NMDG^+ , Rb^+ oder Cs^+ führte zu keinen signifikanten und messbaren Stromantworten, sodass die Mutante S84G nur hinsichtlich des Kations Kalium eine Selektivitätsänderung erfuhr (Abbildung 3-28 B). Bei der schrittweisen Erhöhung der externen Kaliumkonzentration von 0 bis 100 mM erreichte der durch die Mutante vermittelte Kaliumstrom bei einer Konzentration von 50 mM einen Maximalwert von ca. $-3.5 \mu\text{A}$. Bis zu 50 mM K^+ verlief der Einstrom ähnlich einer Sättigungskurve, jedoch reduzierte sich der Stromfluss bei extern vorliegenden Kaliumkonzentrationen >50 mM. Somit wurde in 100 mM Kalium nur eine Stromamplitude von -2 bis $-2.5 \mu\text{A}$ erreicht. Die Datenpunkte der Stromantwort bis 100 mM K^+ in Abbildung 3-28 C wurden mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (15) beschrieben. Daraus resultierte eine Affinität der Mutante von 8.46 ± 2.9 mM zu Kalium. Durch die reduzierten Ströme bei höheren Kaliumkonzentrationen erschien die Michaelis-Menten-Beschreibung im Konzentrationsbereich >50 mM etwas ungenau, sodass zusätzlich die Gleichgewichtsströme bis 50 mM K^+ auf gleicher Weise gefittet wurden. Daraus ergab sich ein K_m -Wert von 14.76 ± 3.3 mM für Kaliumionen. Beide ermittelten K_m -Werte liegen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich und sind vergleichbar mit dem errechneten K_m -Wert für den DmHKT1 WT Kanal von 10 mM für Natrium (Abbildung 3-25). Die zuvor untersuchten Kalium- sowie Natriumströme von DmHKT1 S84G wurden in einer Lösung mit jeweils 100 mM des zu testenden Ions aufgezeichnet. Da jedoch in Kalium die Konzentrations-abhängigen Einstrome mit einem Maximalstrom und anschließender Reduktion der Amplitude einhergingen, sollten die I_{SS} bei -140 mV und einer Ionenkonzentration von 10 mM beobachtet werden (Abbildung 3-28 D). Die makroskopischen Einwärtsströme wurden auf -140 mV und einer Na^+ -Konzentration von 10 mM normiert. Interessanterweise zeigte sich bei diesem Versuchsansatz, dass der Einstrom in 10 mM Kalium im Vergleich zu 10 mM Na^+ verdoppelt wurde. Wurden jeweils 10 mM beider Ionen gleichzeitig appliziert (10 mM Na^+ + 10 mM K^+), d.h. es lag die doppelte Konzentration an permeierenden Ionen vor, so addierte sich scheinbar der Na^+ - und K^+ -Strom. Solch ein additiver Effekt könnte das Resultat eines ungekoppelten Natrium- und Kaliumtransportes sein. Um detaillierter Einblicke in die Ionenpermeation und die gegenseitige Beeinflussung des Na^+ und K^+ Transportes in der DmHKT1 S84G Mutante zu erhalten, sollte der anormalen Molfraktionseffekt (AMFE) (2.12.4) betrachtet werden.

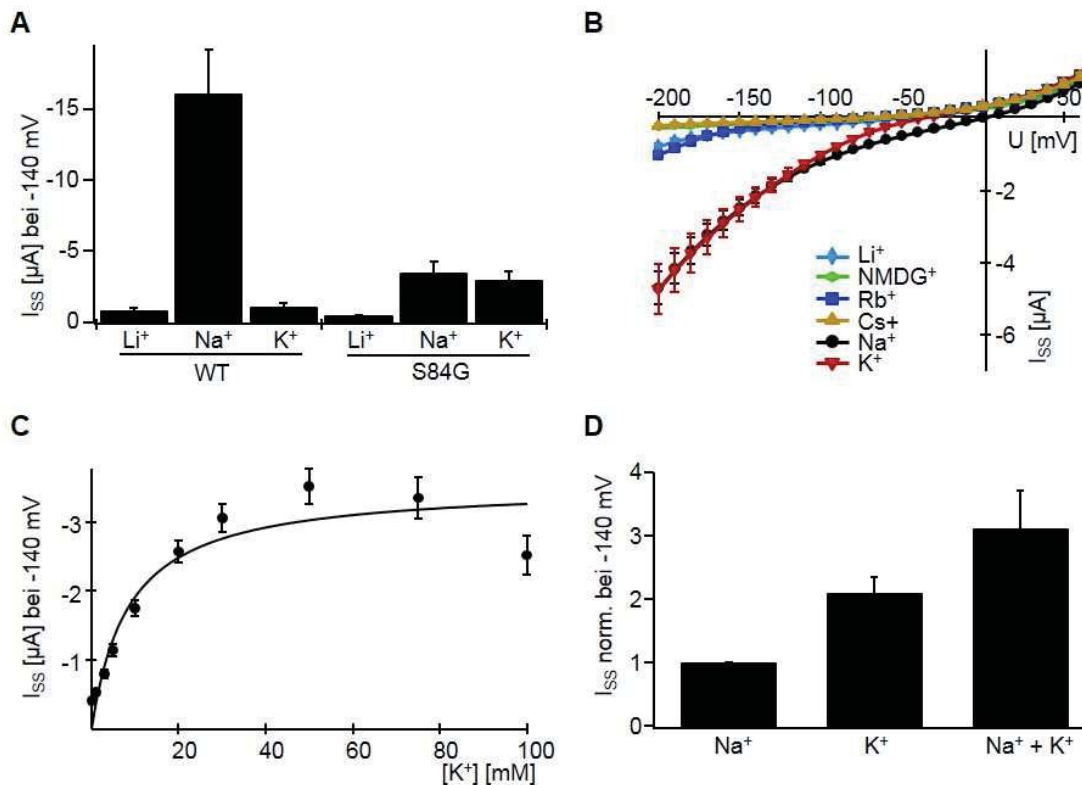


Abbildung 3-28: Die Mutation S84G führt zu einer Kalium- und Natriumleitfähigkeit von DmHKT1 (A) DmHKT1 WT und S84G I_{ss} bei -140 mV in 100 mM Na⁺ und K⁺. Li⁺ diente hierbei als Kontrolllösung. WT exprimierende Zellen wiesen nur in einer Na⁺-Lösung Einwärtsströme von bis zu -15 μA auf. Bei der Mutante S84G war dieser Na⁺-Einstrom ca. um das 3-fache reduziert, jedoch war zusätzlich bei Perfusion mit Kalium-haltiger Lösung ein Einstrom mit nahezu gleicher Stromamplitude zu verzeichnen ($n \geq 3 \pm SD$). In (B) ist die Strom-Spannungskennlinie der DmHKT1 S84G Mutante bei 100 mM der verschiedenen monovalenten Ionensorten in einem Spannungsbereich von +60 bis -200 mV dargestellt. Die erweiterte Leitfähigkeit bezieht sich nur auf das Ion Kalium, in Li⁺, NMDG⁺, Rb⁺ und Cs⁺ waren keine deutlichen Stromantworten zu erkennen. (C) Die I_{ss} der S84G Mutante erreichten bei der Applikation von steigenden K⁺-Konzentrationen bei 50 mM ihr Maximum. Bei Konzentrationen über 50 mM reduzierte sich die Stromantwort ($n=4 \pm SD$). Eine Beschreibung der Sättigungskurve mit einer Michaelis-Menten Gleichung ergab einen K_m -Wert für Kalium von 8.46 bis zu 14.76 mM. In (D) sind die auf 10 mM Natrium und -140 mV normalisierten S84G I_{ss} bei 10 mM Na⁺, 10 mM K⁺ und 10 mM Na⁺ + 10 mM K⁺ abgebildet. Bei der Applikation beider Ionensorten lag eine Addition der jeweiligen Na⁺- und K⁺-Stromamplitude vor ($n \geq 3 \pm SD$).

Zur Bestimmung des AMFEs wurden die Gleichgewichtsströme der S84G Mutante bei einer Spannung von -140 mV und bei gegenläufigen Ionenkonzentrationen aufgezeichnet (Abbildung 3-29). Ausgehend von einer 50 mM Kaliumlösung wurde die Kaliumkonzentration erniedrigt und zu gleichen Anteilen durch Natrium ersetzt, sodass die Endlösung 50 mM NaCl besaß. Der Stromfluss nahm mit steigenden Natrium- und zugleich abnehmenden Kaliumkonzentrationen ab und zeigte einen linearen Verlauf, sodass die Datenpunkte mit einer Geraden beschrieben werden konnten. Solch ein lineares Verhalten bei der Applikation von Ionenmischungen verdeutlicht, dass im Falle von DmHKT1 S84G kein anormaler Molfraktionseffekt (AMFE) vorliegt. Somit scheint keine gegenseitige Beeinflussung der Natrium- und Kaliumionen beim Transport durch die S84G Pore stattzufinden.

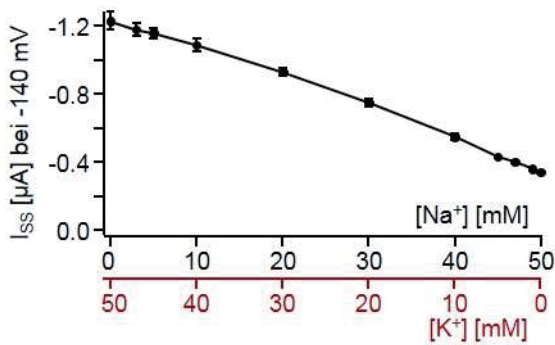


Abbildung 3-29: Messung des anomalen Molfraktionseffekts (AMFE) der S84G Mutante

Die DmHKT1 S84G vermittelten I_{ss} wurden bei einer Spannung von -140 mV und gegenläufigen Ionenkonzentrationen aufgezeichnet. Die perfundierte Lösung enthielt zu Beginn 50 mM K⁺, welches reduziert und durch Na⁺ ersetzt wurde. Der unter diesen Bedingungen resultierende Einstrom wies ein lineares Verhalten und somit keinen AMFE auf ($n=3 \pm SD$).

3.6.6 DmHKT1 S84A

Alanin ist eine aliphatische Aminosäure mit einem Alkylrest als Seitengruppe. Somit verliert Alanin im Vergleich zu Serin die durch die funktionelle Hydroxygruppe polare Seitenkette. Jedoch liegt bei Alanin eine größere Seitenkette als bei Glycin vor und da die Seitenketten der Aminosäuren dominierend für die Struktureigenschaften sind, gruppiert sich Alanin zwischen dem kleinen, apolaren Glycin und dem polaren Serin ein. Ein Glycin an Stelle 84 im DmHKT1 Protein führte zu der zuvor beschriebenen Selektivitätsänderung, sodass nun folgend an Position 84 ein Alanin eingefügt und die Mutante hinsichtlich ihrer Selektivität untersucht werden sollte.

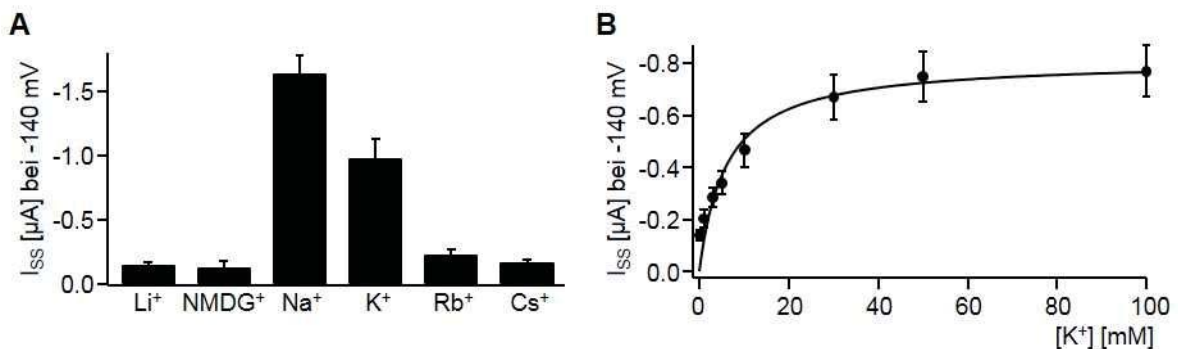


Abbildung 3-30: Selektivität der Mutante S84A

(A) Die I_{ss} der Mutante DmHKT1 S84A wurden bei -140 mV und unterschiedlichen monovalenten Kationen je 100 mM (wie indiziert) aufgezeichnet. Nur in Na⁺ oder K⁺ enthaltenden Lösungen konnten makroskopische Einwärtsströme verzeichnet werden. Jedoch war die Stromamplitude in Kalium im Vergleich zu Natrium ca. um $\frac{1}{3}$ verringert ($n \geq 3 \pm SD$). (B) Die I_{ss} bei -140 mV der S84A Mutante stiegen mit zunehmenden K⁺-Konzentrationen an und gingen ab 30 mM in Sättigung. Wurde dieser Verlauf mit einer Michaelis-Menten-Funktion beschrieben, resultierte daraus ein K_m -Wert von 6.05 ± 1.7 mM für Kalium ($n=4 \pm SD$).

In diesem Versuchsansatz wurde die DmHKT1 S84A exprimierenden Oozyten mit verschiedenen monovalenten Kationenlösungen mit einer Konzentration von jeweils 100 mM perfundiert (Abbildung 3-30 A). Die Mutante S84A wies ein ähnliches Selektivitätsverhalten

wie die Glycinmutation an Position 84 auf. Nur in Anwesenheit von Natrium und Kalium war bei -140 mV eine Stromantwort zu verzeichnen. Ein Unterschied konnte nur in der Stromamplitude in 100 mM Kalium detektiert werden. Während S84G bei 100 mM Na⁺ oder 100 mM K⁺ eine ungefähr gleiche Stromhöhe aufwies, zeigte die Mutante S84A in Kalium im Vergleich mit Natrium einen verringerten Einwärtsstrom. Wurde der K_m-Wert von DmHKT1 S84A zu Kaliumionen ermittelt, so ergab sich ein K_m-Wert von 6 mM, der in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich lag, wie der zuvor beschriebene K_m-Wert der S84G Mutante (Abbildung 3-30 B). Interessanterweise zeigten die Kaliumeinwärtsströme bei sättigenden Kaliumkonzentrationen im Gegensatz zu DmHKT1 S84G kein Maximum und keine Reduktion der Ströme bei höheren externen K⁺-Konzentrationen. Im Falle von S84A war der Stromverlauf sättigend und blieb bis zu einer gemessenen Konzentration von 100 mM K⁺ im Außenmedium konstant.

Die Mutationen des Serins an Stelle 84 zu einem Glycin oder zu einem Alanin und die dadurch veränderten Selektivitätseigenschaften können Rückschlüsse auf die Struktur bzw. auf die Anordnung dieser Aminosäuren und ihrer Seitenketten in der ersten Porendomäne zulassen. Die Ergebnisse werden in der Diskussion anhand von 3D-Strukturmodellen von DmHKT1 besprochen.

3.6.7 Wird DmHKT1 posttranslational reguliert?

Frühere Studien im Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg bezogen sich auf den aus *Arabidopsis thaliana* stammenden Na⁺-Kanal AtHKT1. Dabei wurde ein Augenmerk auf eine mögliche posttranslationale Regulation des Transportproteins gelegt. Mutationen von putativen Phosphorylierungsstellen zu einem Alanin oder Aspartat führten in den meisten Fällen zu einer Reduktion des AtHKT1 Stroms. Die Koexpression des Kanals mit Gemischen aus den Kinasen der CIPK-Familie und den Sensorproteinen der CBL-Klasse resultierte ebenfalls in einer reduzierten Stromamplitude oder sogar in keiner messbaren Stromantwort, sobald das Sensorprotein CBL2 anwesend war. Jedoch wurden die AtHKT1 vermittelten Natriumströme erhöht, wenn zusätzlich zum Kanalprotein der Sensor/Kinase-Komplex CBL9/CIPK23 exprimiert wurde. Leider führten diese verschiedensten Versuchsansätze zu stark kontroversen Ergebnissen und variierten mit dem Expressionsverhalten und der Charge der gewonnenen *Xenopus* Oozyten, sodass eine exakte Aussage über eine mögliche Regulation nicht gezogen werden konnte (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Dietmar Geiger und Dr. Sönke Scherzer). Am *Dionaea* HKT1 sollte nun nochmals ein Versuch unternommen werden, um eine mögliche Regulation des Proteins durch Phosphorylierungsereignisse zu entschlüsseln. Ein Problem stellte dabei

jedoch dar, dass DmHKT1 wie zuvor auch schon AtHKT1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten bereits ohne Koexpression von Kinasen aktiv war. Die Koexpression mit CIPK-Kinasen führte weder zu einer Erhöhung noch zu einer Erniedrigung der DmHKT1 vermittelten Stromantwort, sodass im System der *Xenopus* Oozyten keine Beeinflussung des Kanalproteins durch Kinasen aufgezeichnet werden konnte. Aus diesem Grund sollten putative Phosphorylierungsstellen identifiziert und mutiert werden. Die Aminosäuresequenz von DmHKT1 wurde mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers analysiert. So wurden drei putative Phosphorylierungsstellen identifiziert. Dabei handelte es sich um ein Threonin an Position 142 und ein Tyrosin an Stelle 176, die sich beide in der zytosolischen Schleife zwischen der Transmembranen 2 und 3 befinden. Ein weiteres Tyrosin liegt in der dem Zytosol zugewandten Schleife zwischen der Transmembranen 4 und 5 an Position 292. Im Falle von Serinen, die ebenfalls Phosphorylierungsstellen darstellen können, werden Aspartate eingefügt um eine Phosphorylierung nachzuahmen und Alanine um diese zu zerstören bzw. keine Phosphorylierung zu ermöglichen. Diese Herangehensweise sollte in einem ersten Versuchsansatz für die Aminosäuren Threonin 142, Tyrosin 176 und Tyrosin 292 übernommen werden. Somit wurden T142, Y176 und Y292 jeweils mit einem Aspartat und einem Alanin ersetzt. Diese Mutanten von DmHKT1 konnten dann im System der *Xenopus* Oozyten hinsichtlich ihres Natriumstroms mit dem Wildtypen verglichen werden (Abbildung 3-31).

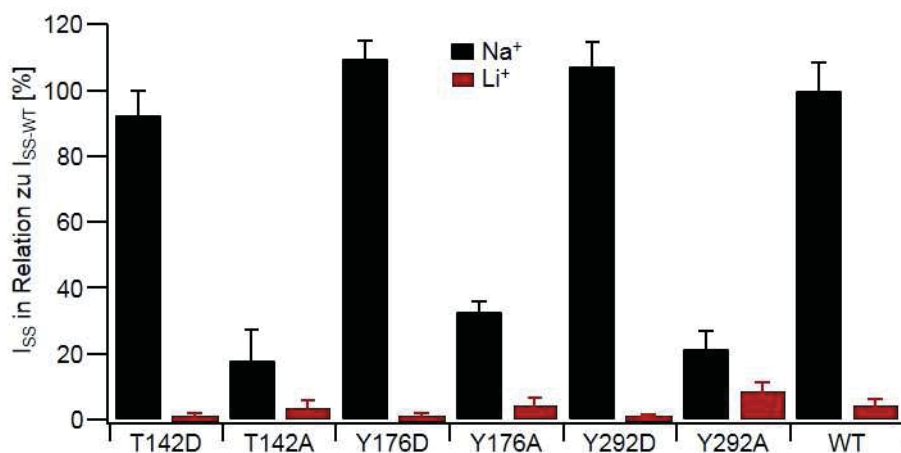


Abbildung 3-31: Veränderung putativer Phosphorylierungsstellen im DmHKT1 Protein

In dieser Abbildung sind die I_{ss} bei -140 mV der DmHKT1 Phosphorylierungsmutanten und dem DmHKT1 WT in 100 mM Li^+ als Kontrollion (rot) und 100 mM Na^+ als Testion (schwarz) dargestellt. Die I_{ss} des Wildtypen in 100 mM $NaCl$ wurden auf 100 % gesetzt und die I_{ss} der Mutanten stehen in Relation zum I_{ss-WT} in %. Alle Aspartat-Mutanten wiesen eine WT-ähnliche Stromantwort in Natrium auf. Bei den Alanin-Mutanten hingegen war der Natriumeinstrom bei allen Mutanten zwischen 60 und 80 % reduziert ($n \geq 3 \pm SD$).

Die Gleichgewichtsströme der Aspartat- und Alanin-Mutanten sind prozentual in Relation zum WT-Strom bei -140 mV in einer 100 mM Lithiumkontrolllösung und Natriumlösung dargestellt. Es wurde auf eine prozentuale Darstellung der Ströme zurückgegriffen um den Einfluss der

unterschiedlichen Chargen und somit das unterschiedliche Expressionsverhalten der Oozyten zu minimieren. Die Aspartat-Mutanten der drei putativen Phosphorylierungsstellen T142, Y176 und Y292 wiesen einen Natriumeinstrom von ca. 90 bis 110 % auf und zeigten somit eine vergleichbare Stromantwort wie der DmHKT1 WT. Wurde an Stelle T142 ein Alanin eingefügt, so war der Natriumeinstrom im Vergleich zum WT um 80 % und im Vergleich zu T142D um 70 % reduziert. Auch der Austausch der Tyrosine an Position 176 und 191 zu Alaninen führte zu erniedrigten Natriumströmen. Beide Alanin-Mutanten zeigten im Vergleich zu den korrespondierenden Aspartat-Mutanten einen um ca. 70 % verringerten Stromfluss. Diese Reduktion im Strom liefert erste Hinweise, dass eine eventuelle Phosphorylierung des DmHKT1 Proteins seine Transportaktivität beeinflusst. Allerdings muss dies in zukünftigen Versuchsansätzen bestätigt und detailliert untersucht werden, sodass die Regulation der DmHKT1 Aktivität durch Phosphorylierungsprozesse zum jetzigen Zeitpunkt nur als eine Hypothese begriffen werden sollte.

4. Diskussion

Die Venusfliegenfalle, *Dionaea muscipula*, ist in der Lage an Nährstoff verarmten Standorten zu wachsen. Um diese Nährstoffarmut zu kompensieren, übt diese Pflanze eine karnivore Lebensweise aus, da das Fangen und Zersetzen von Tieren, wie Arthropoden, eine Vielzahl von anorganischen Kationen und Anionen, organischem Stickstoff, Phosphat oder Kohlenstoff in Form von freien Aminosäuren, Peptiden und Kohlenhydraten mit sich bringt (Punzo, 1989, 1990). Die mit der Karnivorie einhergehenden speziellen Eigenschaften, wie der aktive Fangmechanismus und die anschließende Nährstoffresorption, verdeutlichen ihre Besonderheit innerhalb der Angiospermen. Nach zwei mechanischen Reizen, die über die an der Falleninnenseite befindlichen Triggerhaare wahrgenommen und in elektrische Signale übersetzt werden, erfolgt der schnelle Schließmechanismus der Fallen. Die durch das Insekt verursachten chemischen Reize, in Form von Stickstoff-haltigen Substanzen, Bestandteilen des Exoskeletts und mechano-elektrischen Signalen (Aktionspotentiale), stimulieren die Drüsenkomplexe. Dies führt zur Induktion des sekretorischen Systems, das das saure hydrolytische Sekret mit einer Vielzahl von Chitinasen, Proteasen, Nukleasen, Lipasen und Phosphatasen in den „externen Magen“ entlässt (Escalante-Perez et al., 2011; Schulze et al., 2012). Die sich anschließende Nährstoffaufnahme aus der Beute erfolgt über Plasmamembran-ständige Transportproteine oder Endozytose, wobei beide Prozesse auf transkriptionaler Ebene durch die Sekretion stimuliert werden (Rea and Whatley, 1983; Adlassnig et al., 2012). Da im Bezug auf die genomischen Grundlagen der Venusfliegenfalle noch große Wissenslücken bestehen, ist auch die der Nährstoffresorption zugrunde liegende molekulare Basis weitestgehend unverstanden. Dennoch konnte zuletzt ein Ammoniumtransporter aus *Dionaea muscipula* identifiziert werden, der in der Plasmamembran der Drüsen lokalisiert ist und dort in seiner Expression während der Verdauung induziert wird (Scherzer et al., 2013). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der saure Protease-Mix des Sekrets zur Ammoniumfreisetzung aus der organischen Verbindung Glutamin führt. Das daraus resultierende Kation wird über den Ammoniumtransporter DmAMT1 in die Drüsenzellen aufgenommen und steht der Pflanze somit als Makronährstoff zur Verfügung. Einen weiteren wichtigen Makronährstoff stellt Kalium dar, da diese K^+ -Ionen in Pflanzen eine entscheidende Rolle in physiologischen und osmotischen Prozessen spielen (Sharma et al., 2013). Kalium ist neben dem Kation Natrium zu einem großen Anteil in der *Dionaea* Beute vertreten und beide Kationen werden während der Verdauung freigesetzt (Punzo, 1990; Ajai A. I., 2013; Finke, 2013). Im Anschluss der Verdauungs- und Resorptionsphase zeigt das Wiederöffnen der Fallen, dass jegliche Substanzen und Ionen der Beute rückstandslos aufgenommen werden. Dies führt zur Annahme, dass Transportmodule für Kalium und Natrium in dem Prozess der Resorption involviert sind. Im Rahmen dieser Arbeit galt es, die

dabei beteiligten Proteine zu identifizieren und elektrophysiologisch zu charakterisieren, um mit diesem Hintergrundwissen die physiologische Funktion dieser Resorptionsmodule entschlüsseln zu können.

4.1 DmKT1 und DmHAK5 sind Repräsentanten des biphasischen Kaliumaufnahme-systems in *Dionaea* Fallen

Die Identifizierung des *Dionaea* Ammoniumtransporters DmAMT1, einem Ortholog zum Ammoniumtransporter 1 aus *Arabidopsis* Wurzeln (AtAMT1;1), verdeutlicht die Parallelen zwischen der Nährstoffresorption an Wurzelhaaren von nicht-karnivoren Pflanzen und der Nährstoffaufnahme in den Fallen von *Dionaea muscipula*. Aufnahme-prozesse an der Wurzel und den Wurzelhaaren sind vor allem an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gut beschrieben. Das hauptverantwortliche Kaliumaufnahme-system besteht aus dem Kanal AKT1 und dem Transporter AtHAK5. Dabei wird die Kaliumaufnahme bei externen K^+ -Konzentrationen $<10 \mu M$ dem hoch-affinen System AtHAK5 zugeschrieben, während bei hohen extrazellulären Konzentrationen ($>500 \mu M$) der Kanal AKT1 die Aufnahme dominiert (Aleman et al., 2011; Sharma et al., 2013; Cherel et al., 2014). *In planta* Studien an *Dionaea* Fallen legten ein induzierbares Kaliumaufnahme-system mit biphasischer Kinetik nahe (Abbildung 3-21) (Scherzer, Böhm et al., 2015). Um die Kaliumaufnahme auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden die Proteine DmKT1 und DmHAK5 als Orthologe zu AKT1 und AtHAK5 identifiziert und kloniert. Aufgrund von Sequenzvergleichen konnte DmKT1 den pflanzlichen *Shaker-K⁺*-Einwärtsgerichtern vom AKT1-Typ und DmHAK5 der Untergruppe I a der HAK/KUP/KT-Transporter zugordnet werden (Abbildung 3-1, Abbildung 3-2). Diese phylogenetischen Eingruppierungen konnten über Funktionsstudien im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten bestätigt werden.

4.1.1 K^+ -Transportmodule in den Drüsen der Venusfliegenfalle unterliegen einer transkriptionalen und posttranslationalen Regulation

Aufgrund der phylogenetischen Einordnung von DmKT1 in die AKT1-ähnlichen *Shaker*-Kanäle und DmHAK5 in Kaliumtransporter vom HAK-Typ stellen beide Proteine potentielle Kandidaten für die Vermittlung der Kaliumaufnahme dar. Um dies zu ermöglichen, ist eine Lokalisation in dem entsprechenden Gewebe von großer Relevanz. Nachdem das Beutetier in den Klappfallen der Venusfliegenfalle gefangen ist, wird es dort durch die Ausscheidung des hydrolytischen Sekrets in seine einzelnen Bausteine zersetzt. Die sekretierenden Drüsen

dienen zugleich auch der Nährstoffresorption (Joel et al., 1983). Die Sekretion des Verdauungssaftes und auch die Nährstoffaufnahme finden erst nach der Stimulation der Drüsenkomplexe durch gewisse Elicitoren aus dem Beutetier statt (Darwin, 1875; Rea and Whatley, 1983). Dabei kann es sich um chemische Komponenten, wie Stickstoff-haltige Substanzen oder wiederholte elektrische und mechanische Reize handeln (Robins, 1976; Krol et al., 2012). Diese Stimulierung wird über das Signalmolekül OPDA sowie Jasmonat und seine Derivate wahrgenommen. Bei exogener Gabe dieser Verbindungen setzt, auch ohne, dass sich ein Beutetier in der Falle befindet, die Synthese und Exozytose der lytischen Enzyme ein. Das Phytotoxin Coronatin, welches in seiner Funktion als ein Analogon zu Jasmonderivaten wirken kann (Brooks et al., 2005), initiiert bei exogener Applikation den langsamen Fallenschluss, die Ausbildung des externen Magens und den Sekretions- sowie Verdauungsmechanismus. Somit kann diese Substanz als artifizielle „Beute“ verwendet werden und wirkt als Elicitor für die Transkription der an der Nährstoffaufnahme beteiligten Proteine (Escalante-Perez et al., 2011; Schulze et al., 2012; Scherzer et al., 2013).

Eine durch Insekt oder Coronatin stimulierte Expression konnte für DmKT1 und DmHAK5 im Drüsengewebe gezeigt werden. Die Transkriptanzahl stieg jeweils nach vorheriger Einleitung der Sekretions- und Resorptionsprozesse um ein Vielfaches an (Abbildung 3-3, Abbildung 3-12). Diese Lokalisation und Induktion der Transportertranskripte in den Fallen und speziell im Drüsengewebe deutet auf eine physiologische Funktion der Proteine bei der Nährstoffaufnahme hin.

Neben transkriptionaler Regulation unterliegen viele Transportproteine auch einer posttranslationalen Regulation. So werden zum Beispiel S-Typ Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie, der Na^+/H^+ -Antiporter SOS1, der Kaliumkanal AKT2, der Nitrattransporter NRT1.1 und auch der R-Typ Anionenkanal QUAC1 aus *Arabidopsis* durch Pflanzen-spezifische Kinasen der CIPK-, CPK- oder SnRK-Familie phosphoryliert und somit reguliert (Hedrich, 2012). Für AtQUAC1 konnte in *Arabidopsis* Schließzellen und *Xenopus* Oozyten eine Aktivierung durch die, sich in der ABA-Signalkaskade befindenden Kinase OST1, gezeigt werden (Imes et al., 2013). Interessanterweise konnte im gleichen Ansatz, mit Hilfe des heterologen Expressionssystems der *Xenopus* Oozyten, ebenfalls eine Aktivierung des *Dionaee*-Orthologen Anionenkanals DmQUAC1 durch die aus *Arabidopsis* stammende Kinase OST1 festgestellt werden. Dies verdeutlicht die Spezifität und Konservierung der OST1-QUAC1-Aktivierung über Speziesgrenzen hinaus (Imes et al., 2013). *In planta* Studien zeigten, dass die mit CBLs (Calcineurin B-ähnliches Protein) interagierende Proteinkinase CIPK23 ein wichtiger regulatorischer Bestandteil der Kaliumaufnahme über die Wurzel ist. Der Verlust ihrer Aktivität beeinträchtigte die Kaliumaufnahme aufgrund der fehlenden Regulation von Transportproteinen auf posttranslationaler Ebene. Zum Beispiel wird die Aktivität und

somit die Leitfähigkeit des Kaliumeinwärtsgleichrichters AKT1 über Kalzium-sensor/Proteinkinase-Komplexe reguliert, wodurch eine Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen, wie Kaliummangel, ermöglicht wird (Hedrich and Kudla, 2006; Xu et al., 2006). Die Parallelen zwischen der Nährstoffaufnahme in Wurzeln und in Fallen, sowie die Homologie von DmKT1 zu AKT1, legten eine CBL/CIPK vermittelte Regulation des *Dionaea* Kanals nahe. Analysen des Venusfliegenfalle-Transkriptom ergaben Orthologe zu AtCBL9 und AtCIPK23, dem Sensor/Kinase-Komplex aus *Arabidopsis*. Dabei zeigte die Kinase DmCIPK23 eine konstitutive Drüsen-spezifische Expression. Der Ca²⁺-Sensor DmCBL9 hingegen verhielt sich hinsichtlich seiner Genaktivität wie der Kaliumkanal DmKT1. Beide Gene wurden nach einem Beutefang in den Drüsen verstärkt transkribiert. Somit unterlag nicht nur der Kanal, sondern auch der Sensor/Kinase-Komplex einer transkriptionalen Regulation (Abbildung 3-3). Durch diese starke Kopplung im Expressionsverhalten von DmKT1 und DmCBL9 wurde eine posttranslationale Aktivierung des K⁺-Kanals durch den CBL/CIPK-Komplex sehr wahrscheinlich. Die Koexpression von DmKT1 mit CIPK23 und CBL9 aus *Arabidopsis* in *Xenopus* Oozyten erlaubte, die Aktivierung des Kanals in einem vom Pflanzenhintergrund isoliertem System zu beobachten. Tatsächlich war der *Arabidopsis* CBL/CIPK-Komplex in der Lage DmKT1 aus der Venusfliegenfalle zu aktivieren, was erneut die Spezies übergreifende Konservierung von Signalkomplexen bestätigt und somit die Bedeutung solcher regulatorischer Mechanismen verdeutlicht (Abbildung 3-4).

Neben Kanalproteinen sind auch sekundär-aktive Transporter an der Kaliumresorption in der Wurzel nicht-karnivorer Pflanzen beteiligt. Auch in den Fallen/Drüsen von *Dionaea* konnte ein Mitglied der HAK/KUP/KT-Familie identifiziert werden, das aufgrund seiner Sequenz-homologie zu AtHAK5 aus *Arabidopsis*, DmHAK5 benannt wurde. Die Charakteristika von Mitgliedern der HAK/KUP/KT-Familie konnten bislang nur in Hefekomplementations- sowie mittels *in planta* Studien untersucht werden, da keine Funktionalität der Transporter im Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten vorlag (Kim et al., 1998). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität der HAK-Proteine von Umweltbedingungen, wie Kaliummangel, abhängig ist und dies nicht nur mit einer Regulation der Expression einhergehen kann, sondern auch eine posttranslationale Regulation erfordert. So vermutete Rubio et al. 2014 für AtHAK5 aus *Arabidopsis* eine posttranslationale Regulation in Form von Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsereignissen oder durch andere regulatorische Protein-Protein-Interaktionen (Rubio et al., 2014). So wurde für einen Vertreter der HAK-ähnlichen Transporter aus Gerste in Rb⁺-Aufnahmestudien im Hefesystem eine Regulation des HvHAK1 durch die Hefe-endogene HAL4/5 Kinase und die PPZ1 Phosphatase diskutiert (Fulgenzi et al., 2008). Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Aktivierung

von DmHAK5 durch den AtCBL9/AtCIPK23-Komplex an *Xenopus* Oozyten beobachtet werden (Abbildung 3-13). So wurde zum ersten Mal eine detaillierte elektrophysiologische Untersuchung der Transportcharakteristika eines HAK-Transporters ermöglicht.

Dieser Ca^{2+} -Sensor/Kinase-Komplex aktiviert somit nicht nur den AKT1-ähnlichen Kaliumkanal DmKT1, sondern auch den Transporter DmHAK5 aus der HAK-Familie und konnte so für beide Kaliumaufnahmesysteme als regulatorischer Schlüsselkomplex identifiziert und definiert werden. Die Drüsen der Venusfliegenfalle weisen also ein durch den Beutefang induzierbares biphasisches System zur Kaliumresorption auf, welches auf transkriptionaler und posttranslatiionaler Ebene detailliert gesteuert werden kann. Ob HAK5 Orthologe aus den Modellpflanzen *Arabidopsis*, Mais oder Reis ebenfalls durch die Kinase CIPK23 und das Calcineurin B-ähnliche Protein CBL9 aktiviert werden können, bleibt in Zukunft noch zu klären.

4.1.2 DmKT1 ist ein hoch-selektiver Kaliumkanal mit Spannungs- und pH-abhängigem Schaltverhalten

DmKT1 wies die typischen Transportmerkmale eines Spannungs-abhängigen Kaliumeinwärtsgleichrichters auf (Gaymard et al., 1996; Sharma et al., 2013). Wie auch weitere Mitglieder der *Shaker*-ähnlichen Kaliumkanäle vom AKT1-Typ, vermittelte DmKT1 bei hyperpolarisierenden Potentialen einen einwärtsgerichteten Kaliumfluss, der von der extrazellulären Substratkonzentration beeinflusst bzw. abhängig war. Somit wird eine Kaliumaufnahme in das Zytosol der Zelle bei Spannungen negativer als -50 mV ermöglicht (Abbildung 3-5).

Da der Verdau eines Beutetiers mit der Freisetzung einer Vielzahl verschiedener Nährstoffe einhergeht und vor allem Kalium- und Natriumionen in einer ähnlichen Konzentration vorliegen (Ajai A. I., 2013; Finke, 2013), erscheint die selektive Aufnahme von Nährsalzen von zentraler Bedeutung. Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung von DmKT1 bewies dieser Kanal eine strikte Selektivität für Kalium und ließ selbst chemisch ähnliche Kationen der Alkalimetall-Reihe nicht permeieren (Abbildung 3-6). Neben einem makroskopischen Einwärtsstrom, der nur bei der Applikation von Kalium auftrat, bestätigte auch die Verschiebung des Umkehrpotentials um nahezu 60 mV bei einer 10-fachen Kaliumkonzentrationsänderung im Badmedium, dass es sich bei DmKT1 um einen K^+ -selektiven Kanal handelt. Dies ist vergleichbar mit dem „Nernst-Verhalten“, das AKT1 aus *Arabidopsis* bei der Expression in Sf9-Zellen aufwies (Gaymard et al., 1996). Der durch DmKT1 vermittelte Kaliumfluss richtete sich nach dem elektrochemischen Gradienten für

Kalium. Die Affinität des Proteins zu seinem Substrat lag mit einem K_m -Wert von 108 mM im nieder-affinen Konzentrationsbereich (Abbildung 3-5).

Hinsichtlich der Ammoniumpermeabilität von *Shaker*-Einwärtsgleichrichtern lassen sich in der Literatur verschiedene Ansätze finden. Wie auch für DmKT1 gezeigt werden konnte, wird AKT1 aus *Arabidopsis* als nicht-sensitiv für Ammonium beschrieben. Es liegt weder eine Permeabilität noch eine Inhibierung durch Ammonium vor, sodass in *Arabidopsis thaliana* oft NH_4^+ zur Unterscheidung des hoch-affinen Kaliumtransportsystems, der durch den NH_4^+ -sensitiven AtHAK5 vermittelt wird, und dem nieder-affinen Kaliumtransport durch AKT1 herangezogen wird (Spalding et al., 1999; Lebaudy et al., 2007; Rubio et al., 2008; Aleman et al., 2011). Auch bei der Kaliumaufnahme in Wurzeln der Gerste wird von einer NH_4^+ -sensitiven und -insensitiven Transportkomponente gesprochen (Santa-Maria et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigen K^+/Rb^+ -Aufnahmeexperimente an den Wurzeln von Mais zwar ebenfalls zwei Transportkomponenten mit unterschiedlichen Kinetiken, jedoch scheint die im nieder-affinen Substratbereich arbeitende Komponente permeabel für Ammonium und Kalium zu sein. Zudem wird der Kaliumtransport beider Komponenten durch Ammoniumionen beeinflusst (Vale et al., 1988). Etwas später konnte für den AKT1-Orthologen Kanal aus Mais, dem der nieder-affine Transport zugeschrieben werden kann, in Patch Clamp-Analysen an Koleoptilen-Protoplasten die Ammoniumleitfähigkeit bestätigt werden. Diese ist im Vergleich zu Kalium 30-40 % reduziert, sodass der Kaliumkanal eine geringere Permeabilität für Ammonium als für Kalium aufzeigt (Hedrich et al., 1995a). Um diese aufgeführten Selektivitäten oder Permeabilitäten der Kaliumaufnahmemodule verschiedener Spezies zu untersuchen, wurden oft Aufnahmestudien mit Rubidium herangezogen. Es ist bekannt, dass viele Kaliumkanäle, darunter auch die Einwärtskanäle des KAT1-Typs, eine Permeabilität für Rubidiumionen zeigen (Becker et al., 1996; Hille, 2001) und das Rb^+ physiologisch Kalium ersetzen kann. Deshalb wurde in *in planta* Studien oftmals Rubidium als Tracer für Kalium eingesetzt. Diese Vorgehensweise ist jedoch fraglich, da sich zeigte, dass Kaliumkanäle aus Maiskoleptilen und der hier untersuchte DmKT1 aus den Fallen von *Dionaea muscipula* keine Rubidiumleitfähigkeit aufweisen (Hedrich et al., 1995a). Dies bedeutet unter anderem, dass Aufnahmestudien mit Rb^+ für AKT1-ähnliche Kaliumkanäle vorsichtig betrachtet werden müssen und dass die Selektivität der zu untersuchenden Transportproteine vorher bekannt sein sollte. Wie bereits erwähnt, repräsentiert DmKT1 aus der Venusfliegenfalle einen hoch-selektiven Kaliumkanal ohne eine messbare Leitfähigkeit für Rubidium. Deshalb kann im Falle von *Dionaea muscipula* Rubidium nicht als Tracer für die durch den Kanal vermittelte Kaliumaufnahme während der Resorptionsphase verwendet werden. Die Tatsache, dass AKT1-ähnliche Kaliumkanäle keine Rubidiumleitfähigkeiten besitzen (wie zum Beispiel

DmKT1, AKT1 aus *Arabidopsis* und SKT1 aus der Kartoffel; persönliche Auskunft von Prof. Dr. Geiger, Lehrstuhl Botanik I, Universität Würzburg) erklärt die kontroversen Befunde in der Literatur zur Ammoniumleitfähigkeit von Wurzelmembranen, sobald diese mit Rb^+ -Aufnahmestudien analysiert wurden. Da in diesem Fall nur die Transporter vermittelten Ionenaufnahmen untersucht und die Kanal-basierten Flüsse völlig vernachlässigt wurden.

Mit der Ansäuerung des „externen Magens“ sind die an der Nährstoffresorption beteiligten Kanäle wie DmKT1 mit einer erhöhten Protonenkonzentration konfrontiert. Von den pflanzlichen *Shaker* einwärtsgerichteten Kaliumkanälen ist bekannt, dass die Proteine eine Säure-induzierte Verschiebung ihrer Offenwahrscheinlichkeit aufweisen und somit ihre Aktivität zu positiveren Membranpotentialen verschieben (Hedrich et al., 1995b; Hoth et al., 1997). Dies konnte ebenfalls für den DmKT1 der Venusfliegenfalle ermittelt werden. Somit konnte der erhöhte Stromfluss unter sauren externen Bedingungen auf die Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit zurückgeführt und ein Kotransport mit Protonen ausgeschlossen werden (Abbildung 3-7, Abbildung 3-8). Bezieht man nun die Tatsache mit ein, dass das ausgeschleuste Verdauungsssekret angesäuert wird und einen pH-Wert von <3 erreichen kann (Escalante-Perez et al., 2011), bedeutet dies für die durch DmKT1 vermittelte Kaliumaufnahme, dass mit fortschreitender Verdauung sich das Spannungs-abhängige Schaltverhalten zu immer positiveren Spannungen verschiebt. Somit wird eine konstante Kaliumaufnahme durch DmKT1 ermöglicht, solange der elektrochemische Kaliumgradient den Einstrom von Kalium begünstigt.

4.1.3 DmKT1 vermeidet einen Kaliumverlust bei geringen externen Kaliumkonzentrationen

Unter der Voraussetzung, dass die Kaliumkonzentration im Zytoplasma von Drüsenzellen ca. 100 mM beträgt und das an diesen Zellen ein Membranpotential von -120 bis -140 mV anliegt, so kann rein thermodynamisch betrachtet eine passive Kaliumaufnahme durch den Kanal DmKT1 bis zu einer externen K^+ -Konzentration von 1 mM stattfinden. Unterhalb dieser Konzentration würde aufgrund des auswärtsgerichteten elektrochemischen Gradienten ein Kaliumausstrom aus den Zellen vorliegen. Für Transportaktivitätsanalysen bei variierenden extrazellulären K^+ -Konzentrationen an *Arabidopsis* AKT1 und KAT1 hat sich die Bestimmung der Spannungs-abhängigen Kanalleitfähigkeit (engl. cord conductance) als ein hilfreiches Werkzeug heraus kristallisiert (Hertel et al., 2005; Geiger et al., 2009). Bei der Berechnung der „cord conductance“ für DmKT1 ergab sich eine Verringerung der Leitfähigkeit um ca. 82 % bei einer Reduktion der externen K^+ -Konzentration von 100 auf 5 mM. Bei Betrachtung der

abnehmenden Maximalleitfähigkeit in Relation zum externen Kaliumgehalt, konnte eine halbmaximale Leitfähigkeit bei einer anliegenden Kaliumkonzentration von 34 mM errechnet werden. Da die Offenwahrscheinlichkeit der DmKT1-Kanäle durch eine externe Kaliumänderung nicht betroffen war, sollte die Reduktion der Kanalleitfähigkeit durch die Anzahl der aktivierbaren Kanäle beeinflusst sein. Biophysikalische Analysen an *Arabidopsis* KAT1 und AKT1 zeigten, dass im Gegensatz zu der K⁺-Sensitivität von DmKT1 (34 mM) KAT1 bereits im geringen millimolaren Bereich (1.4 mM) und AKT1 bei einer Konzentration von 16.2 mM K⁺-sensitiv ist (Hertel et al., 2005; Geiger et al., 2009). Die reduzierte Aktivität von AKT1 und KAT1 wurde mit einer Änderung der Porenstabilität assoziiert. Sobald die externe Kaliumkonzentration zu gering ist, wird der Permeationsweg durch die Kanäle instabil und „kollabiert“ (Zhou et al., 2001; Sharma et al., 2013). Durch diesen Porenkollaps reduziert sich die Anzahl der aktivierbaren Kanäle und damit die Leitfähigkeit der entsprechenden Membran für Kalium. Der Schwellenwert der Kaliumkonzentration, der zur Instabilität der Pore führt, scheint eine charakteristische Eigenschaft der jeweiligen Kanäle zu sein (Geiger et al., 2009; Sharma et al., 2013). Somit könnte die höhere Kaliumsensitivität von DmKT1, im Vergleich zu den aus *Arabidopsis* stammenden Kanälen, eine Adaption an den Verdauungsprozess und den „externen Magen“ von *Dionaea muscipula* darstellen. Durch die Reduktion der aktiven DmKT1-Kanäle bei auswärtsgerichteten elektrochemischen Kaliumgradienten wird ein Kaliumausstrom und –verlust in den Drüsenzellen effizient vermieden.

4.1.4 DmHAK5 ist ein K⁺/H⁺-Kotransporter

Die Koexpression von DmHAK5 mit dem Sensor/Kinase-Komplex AtCBL9/AtCIPK23 ermöglichte zum ersten Mal eine detaillierte Untersuchung der Transporteigenschaften in einem vom Pflanzenhintergrund losgelösten Expressionssystem. Dabei zeigte sich, dass DmHAK5 der Venusfliegenfalle einen hoch-affinen Kaliumtransport über die Plasmamembran der Drüsenzellen ermöglicht (Abbildung 3-16). Der *Dionaea* Transporter wies eine breite Substratspezifität auf und war für Kalium, sowie Rubidium, Ammonium und Cäsium leitfähig (Abbildung 3-15). Aufgrund der bisher fehlenden detaillierten Informationen zu den Selektivitätseigenschaften der HAK-ähnlichen Proteine findet man unterschiedliche Hypothesen zum Einfluss von Natriumionen auf den HAK5 vermittelten Kaliumtransport. Zum einen wird vermutet, dass Natriumionen als Modulator oder sogar als Stimulans des hoch-affinen Kaliumtransportes wirken können (Spalding et al., 1999; Qi et al., 2008). Zum anderen zeigten pilzartige HAK-Transporter oder HAK5 aus *Arabidopsis* keine Permeabilität für oder Beeinflussung durch Natriumionen (Nieves-Cordonos et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch für den *Dionaea* DmHAK5 Natriumionen weder ein

Substrat noch Modulatoren darstellen (Abbildung 3-17), obwohl Na^+ während der Verdauung eines Beutetiers zu einem großen Anteil im „externen Magen“ vorliegt. Selbst bei hohen Natriumkonzentrationen ist DmHAK5 impermeabel für Na^+ und vermittelt unbeeinflusst von Natriumionen den Kaliumtransport aus dem Beutetier.

Im Gegensatz zum Kaliumkanal DmKT1 war DmHAK5 nicht strikt selektiv für Kalium, sondern zeigte auch eine Rubidium- und Cäsiumpermeabilität. Zudem vermittelte der HAK-Transporter aus der Venusfliegenfalle den Transport von Ammoniumionen (Abbildung 3-15, Abbildung 3-17). Anhand von *in planta* Messungen und Hefekomplementationsstudien wurde durch Aufnahmeexperimenten mit Cäsium und Rubidium als Tracer-Ionen, die Kaliumaufnahme der HAK5-ähnlichen Transporter aus *Arabidopsis* oder der Tomate als NH_4^+ -sensitiv beschrieben (Hirsch et al., 1998; Spalding et al., 1999; Qi et al., 2008; Rubio et al., 2008). Es wurde argumentiert, dass Ammonium zu einer Inhibierung des Kaliumtransportes führt, ohne selbst als permeierendes Substrat zu dienen (Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006). Im Falle von DmHAK5 sind eher Parallelen zu dem Ammonium- und Kaliumfluss in Maiswurzeln zu erkennen. Vale et al. 1988 beschrieben eine hoch-affine Transportkomponente für Kalium, die ebenfalls einen Ammoniumfluss zulässt (Vale et al., 1988). Zwar sprechen Vale et al. ebenfalls von einer Inhibierung des Kaliumflusses in der Anwesenheit von Ammonium, d.h. von einem reduzierten Einstrom, jedoch wird die Reduktion des Kaliumflusses auf einen erhöhten Einstrom von Ammonium zurückgeführt. Somit stellen Kalium und Ammonium kompetitive Ionen dar, die um den Permeationsweg durch den Transporter konkurrieren (Cao et al., 1993). Meine Untersuchungen an DmHAK5 aus der Venusfliegenfalle favorisieren die von Vale et al. 1988 vorgeschlagene Hypothese einer kompetitiven Inhibierung des Kaliumstroms durch Ammonium (Vale et al., 1988).

Bei Stickstoff handelt es sich um einen für Pflanzen essentiellen Makronährstoff, welcher in Form von Ammonium aufgenommen werden kann (Gessler et al., 1998). Scherzer et al. 2013 konnten eine Ammoniumaufnahme während der Resorptionsphase in *Dionaea muscipula* nachweisen. Das saure Verdauungsssekret beinhaltet verschiedene Hydrolasen, die die Proteine der Beute in ihre Bestandteile zerlegen. Darunter konnte eine Glutaminaseaktivität verzeichnet werden, die letztendlich zu einer Ammoniumproduktion führt und der Pflanze zusätzlich zum Ammonium aus der Hämolymphe des Insekts im „externen Magen“ zur Verfügung steht. Dieses Ammonium kann über den in den Drüsen vorliegenden Ammoniumtransporter DmAMT1 aufgenommen werden (Scherzer et al., 2013). DmHAK5 zeigte neben einer Leitfähigkeit für Kaliumionen ebenfalls eine um ca. 50 % reduzierte Permeabilität für NH_4^+ -Ionen (Abbildung 3-15). Für den Symporter DmHAK5 liegen während der Verdauung eines Beutetiers Kalium und Ammonium als kompetitive Ionen vor, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass DmHAK5, bis zu einem gewissen Anteil, eine

Ammoniumaufnahme in die Drüsenzellen ermöglicht und für die Kalium- sowie für die Ammoniumresorption eine physiologische Rolle spielt. Der genaue Anteil von DmHAK5 an der Ammoniumaufnahmekapazität muss allerdings noch näher untersucht werden.

Veranschaulicht man den Resorptionsprozess von Kalium während des Beuteverdaus in der Venusfliegenfalle, so reduziert sich der in der geschlossenen Falle vorliegende Kaliumgehalt bis auf 10 μM mit fortschreitender Verdauung. Die Intensität und die Richtung des Kaliumstroms durch eine offene Pore eines Ionenkanals hängen nur vom entsprechenden elektrochemischen Ionengradienten ab. Die zytosolische Kaliumkonzentration in Drüsenzellen beträgt etwa 100 mM und Membranpotentialmessungen mit Mikroelektroden ergaben eine Membranspannung von ca. -120 mV. Ausgehend von diesen Parametern weist der elektrochemische Kaliumgradient stark nach Außen, sodass ein geöffneter Kaliumkanal zu einem Kaliumefflux führen würde. Dies legt die Vermutung nahe, dass DmHAK5 als ein hoch-affiner Kaliumtransporter die Aufnahme von Kalium bei externen K^+ -Konzentrationen unterhalb von 1 mM übernehmen muss. Dies kann DmHAK5 nur leisten, da das Protein als ein K^+/H^+ -Kotransporter fungiert und somit die protonenmotorische Kraft für die Akkumulation von Kalium nutzt. Bei einem zytosolischen pH-Wert von 7 und einem stark sauren Verdauungsssekret kann DmHAK5 neben den elektrischen Gradienten das chemische Potential für Protonen ausnutzen. Für Mitglieder der vakuolären HAK-Transporter-Familie wurde ein K^+/H^+ -gekoppelter Transport mit einer Stöchiometrie von 1:1 nachgewiesen (Grabov, 2007). Im Versuchsaufbau mit DmHAK5 zeigte sich eine verstärkte Kaliumaufnahme mit steigenden Protonenkonzentrationen (Abbildung 3-18). Jedoch ist eine erhöhte Kaliumstromamplitude bei sauren externen Bedingungen nicht zwangsweise mit einem Kotransport gleichzusetzen, da eine allosterische Wirkung von Protonen nicht auszuschließen ist. Weitere zukünftige Untersuchungen zur Protonenkopplung und zur Stöchiometrie der transportierten Ionen sollten die Verschiebungen der Umkehrpotentiale bei variierenden K^+ - und H^+ -Konzentrationen einschließen. Bei einer perfekten Kopplung des Kalium- und Protonenstroms sollten die Umkehrpotentialverschiebungen ein „Nernst-Verhalten“ (die Summe aus H^+ - und K^+ -Umkehrpotentialen) aufweisen. So könnte neben der K^+/H^+ -Kopplung auch ein Aussage über die Stöchiometrie der beiden Ionen getroffen werden. Vorversuche scheiterten bisher an der schwachen Expression des DmHAK5-Transporters in Oozyten, sodass die Umkehrpotentialverschiebungen bei unterschiedlichen pH-Werten nicht aufgelöst werden konnten, da sie sich nicht signifikant vom Verhalten der Kontrolloozyten unterschieden. Uninjizierte Oozytenzellen zeigten ebenfalls eine pH-abhängige Verschiebung des Membranpotentials, die sehr willkürlich erschien und von der jeweiligen Charge der *Xenopus* Oozyten abhängig war. Eine Steigerung der Expressionstärke von DmHAK5 ist demnach

unumgänglich, um mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik tiefere Einblicke in die Kopplung der Ionenströme zu erhalten.

Eine Unterscheidungsmöglichkeit von Kanälen und Transportern stellt die Bestimmung des Q_{10} -Wertes und somit der Temperaturabhängigkeit des Substrattransports dar (Hille, 2001; Scherzer et al., 2013). Das mit einem Q_{10} -Wert von 6.87 stark Temperatur-abhängige Verhalten von DmHAK5 verweist eindeutig auf einen Transporter bzw. Carrier (Abbildung 3-20), sodass der postulierte Kotransportmechanismus von Kalium mit Protonen weiter unterstützt wird. Da der über der Membran anliegende Protonengradient höchst wahrscheinlich die treibende Kraft für DmHAK5 darstellt, sollte in weiteren Untersuchungen Einfluss auf den chemischen Protonengradienten genommen werden. Um den H^+ -Gradienten zu zerstören oder herabzusetzen wird in den meisten Fällen auf Entkoppler wie Carbonyl Cyanid 3-Chlorophenylhydrazon (CCCP) zurückgegriffen (Heytler and Prichard, 1962). Innerhalb des Oozytenmesssystems ist eine interne Ansäuerung mit Acetat-haltiger Lösung eine weitere Möglichkeit. Dabei diffundiert Acetat in protonierter Form bei einem externen pH von 5.6 über die Membran und wird im Zytosol der Zelle deprotoniert. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der H^+ -Konzentration und somit zu einer zytosolischen Ansäuerung (Grinstein et al., 1994). Diese Oozyten-interne Ansäuerung ging mit einem Stromverlust bei externer Kaliumapplikation einher, was auf das Herabsetzen der treibenden Kraft, d.h. eine Verringerung des Protonengradienten, zurückgeführt wurde (Abbildung 3-19). Diese hier aufgeführten Hinweise für einen durch DmHAK5 vermittelten K^+/H^+ -Symport, stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Transportmechanismen der HAK-ähnlichen Proteine (Rodriguez-Navarro, 2000; Sharma et al., 2013). Zudem würde aus physiologischer Sicht der K^+/H^+ -Kotransport die Energetisierung der Kaliumaufnahme bis zu mikromolaren Ionenkonzentrationen im stark sauren „externen Magen“ der Venusfliegenfalle erklären.

Bei der Analyse des H^+ -abhängigen Kaliumtransports durch DmHAK5 fiel auf, dass eine Änderung des externen pH-Wertes zu einer Änderung der extrazellulären Affinität für Kaliumionen führte. Dies ist bereits für den mit Protonen gekoppelten Zuckertransporter ZmSUT1 aus *Zea mays* bekannt. Bei einer Abnahme des extrazellulären pH-Wertes stieg die Affinität von ZmSUT1 zu seinem Substrat Saccharose an (Carpaneto et al., 2005). Jedoch trat im Falle von DmHAK5 ein gegenteiliges Verhalten auf, da mit steigender Protonenkonzentration im externen Medium die Affinität zu Kalium sank (Abbildung 3-18). Um diese gegensätzliche Eigenschaft zu untersuchen, müssen in Zukunft mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese, Struktur-Funktions-Studien erfolgen, die den Transportzyklus, sowie die Bindung und den gegenseitigen Einfluss der Substrationen entschlüsseln.

4.1.5 Das hoch- und nieder-affine Kaliumaufnahme-system in den Drüsen der Venusfliegenfalle

Das Beispiel der Nährstoffaufnahme in *Arabidopsis* Wurzeln verdeutlicht, dass Nährsalze mit unterschiedlichen Transportkinetiken von distinkten Transportproteinen aufgenommen werden. So kommen im Falle der Stickstoffaufnahme ein nieder- und ein hoch-affines Transportelement zum Tragen, die bei unterschiedlichen externen Ionenkonzentrationen eine stetige Aufnahme ermöglichen. Somit kann ein sehr breites Spektrum an Ionenkonzentrationen resorbiert werden (Bassirirad, 2000; Miller et al., 2007). Auch hinsichtlich des Nährstoffes Kalium können an *Arabidopsis* Wurzeln zwei Aufnahmekinetiken auftreten werden. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine nieder- und eine hoch-affine Komponente, die durch den Kanal AKT1 und den Transporter AtHAK5 repräsentiert werden (Rubio et al., 2008; Sharma et al., 2013). Interessanterweise sind die Orthologen, DmKT1 und DmHAK5, in Drüsenzellen der Venusfliegenfalle lokalisiert, die bei der Nährstoffresorption aus dem Beutetier fungieren. Zieht man nun Parallelen der Kaliumaufnahme in *Arabidopsis* Wurzeln zu der Kaliumresorption während der Verdauung eines Beutetiers in den Fallen von *Dionaea muscipula*, so stellt sich die Frage, ob beide *Dionaea* K⁺-Aufnahmesysteme komplementär und sich gegenseitig unterstützend agieren. Die Ermittlung ihrer Affinitäten zu Kalium zeigte dabei, dass DmKT1 in einem nieder-affinen Konzentrationsbereich transportiert und bei zu geringen externen Kaliumbedingungen eine Instabilität der Pore aufweist, um den Kaliumverlust aus den Drüsenzellen zu minimieren (Abbildung 3-5, Abbildung 3-11). Bei diesen geringen Ionenkonzentration kann die Kaliumaufnahme von DmHAK5 übernommen werden, der einen H⁺-gekoppelten K⁺-Symport vermittelt (Abbildung 3-16). Somit ergibt sich eine biphasische Transportkinetik für Kalium, die sich durch Membranpotentialmessungen als Antwort auf variierende externe Kaliumkonzentrationen an stimulierten Drüsen bestätigt (Abbildung 3-21) (Scherzer, Böhm et al., 2015).

Zusammenfassend repräsentieren die Transportproteine DmKT1 und DmHAK5 die Kaliumaufnahmemodule in den Drüsenzellen der Venusfliegenfallen. Der Kanal sowie der Transporter werden in gleicher Weise transkriptional und posttranslational gesteuert/aktiviert, sodass sie zusammen die Kaliumaufnahme in einem breiten Konzentrationsspektrum ermöglichen. Dabei agiert DmKT1 mit einer hohen Transportrate und einer geringen Affinität zu Kalium, wohingegen der hoch-affine DmHAK5 die Kaliumaufnahme bis zu sehr geringen Konzentrationen am Ende des Beuteverdaus vermittelt.

4.2 Ein Fallen spezifischer Na⁺-Kanal ermöglicht die Bereitstellung des aus der Beute stammenden Natriums

Für tierische Zellen stellt Natrium einen essentiellen Nährstoff dar. Die membranständige Na⁺/K⁺-ATPase führt im Austausch mit Kalium zu einem Natriumausstrom und der so aufgebaute Natriumgradient kann zur zellulären Regulation der Nährstoffversorgung, des Volumens oder des pH-Wertes genutzt werden. Im Gegensatz zu tierischen Organismen sind Natriumionen für Pflanzen nicht von essentiellem Wert. Für die meisten terrestrischen Pflanzen ist eine hohe zelluläre Natriumkonzentration sogar toxisch und führt zu vermindertem Wachstum und Einbußen im Ertrag. Dieser Salzstress kann zu einem Wasserdefizit aufgrund der hohen Substanzkonzentrationen im Boden oder zu Ionen-spezifischem Stress aufgrund des geänderten K⁺/Na⁺-Verhältnis führen (Blumwald, 2000). Dabei stellen Halophyten die Ausnahme dar, da sie verschiedene Anpassungsstrategien an hohe Salzkonzentrationen entwickelt haben und sogar von hohen Natriumkonzentrationen im Boden profitieren können (Shabala, 2013).

Die Venusfliegenfalle zählt zwar nicht zu den Halophyten, ist allerdings während der Verdauungsphase der Beute hohen Natriumkonzentrationen ausgesetzt. Interessanterweise findet eine Aufnahme aller aus dem Beutetier vorliegenden Nährstoffe und Substanzen statt und somit auch eine Aufnahme von Natrium (Abbildung 3-22). Ein grundlegender Mechanismus von Pflanzen um Schäden durch zu hohe Natriumkonzentrationen zu umgehen, ist die Vermeidung des Natriumtransportes zu den photosynthetisch aktiven Blättern. Zwar handelt es sich bei den Fallen der *Dionaea muscipula* um umgewandelte Blätter, jedoch findet der Großteil der Photosynthese in den darunter stehenden Blattspreiten statt. Bei Natriumfütterungsversuchen der sekretierenden Fallen zeigte sich, dass das aufgenommene Natrium in den photosynthetisch ineffizienteren Fallen verbleibt und scheint somit nicht in die Blattspreiten transportiert zu werden (Abbildung 3-22). Dies deutet auf eine Einlagerung des Natriums in die Vakuolen der Fallenparenchymzellen hin, wo es als osmotisch-aktive Substanz für die Aufrechterhaltung des Zellurgors und eventuell bei der Turgor-getriebenen Fallenbewegung genutzt werden könnte. Die Kosten-Nutzen-Modelle zur Karnivorie im Allgemeinen beschreiben, dass die Ausübung der Karnivorie und die dafür benötigten speziellen Eigenschaften und Mechanismen mit hohen Kosten verbunden sind (Givnish et al., 1984; Ellison and Gotelli, 2009; Ellison and Adamec, 2011; Givnish, 2015). Dies ist für die Pflanzen nur lohnend, wenn diese Kosten durch den Gewinn der Nährstoffe aus den Beutetieren kompensiert werden. Dazu müssen die erhaltenden Mikro- und Makronährstoffe den photosynthetisch aktiven Blättern zugeteilt werden. Gleichzeitig bedeutet dies aber auch, dass karnivore Pflanzen die nicht-essentiellen oder schädlichen Substanzen von den photosynthetisch aktiven Organen fernhalten müssen um eine Schädigung zu vermeiden.

Auch nicht-Halophyten wie *Arabidopsis thaliana* weisen eine gewisse Billigung von erhöhten Salzkonzentrationen auf. *In planta* Mutationsstudien zeigten, dass diese Salztoleranz unter anderem auf einen für Na⁺ selektiven Kanal der HKT-Familie zurückzuführen ist. Es haben sich zwei Modelle zu physiologischen Funktion von AtHKT1 bei Salzstress etabliert (Hauser and Horie, 2010). Bei dem „Re-Zirkulationsmodell“ belädt AtHKT1 das Phloem mit Natriumionen und sorgt so für einen basipetalen Transport von Natrium aus den Salzsensiblen photosynthetisch aktiven Blättern (Berthomieu et al., 2003) Beim „Entladungsmodell“ hingegen wird davon ausgegangen, dass Natriumionen durch AtHKT1 bereits in der Wurzel aus dem Xylemstrom in die Xylemparenchymzellen geschleust werden (Sunarpi et al., 2005). Beide Modelle verhindern eine Akkumulation von Natrium im Spross, sodass die photosynthetisch aktiven Organe vor einer zu hohen Konzentration geschützt werden. Der durch HKTs vermittelte Natriumtransport findet sich auch in den *Dionaea* Fallen wieder. Die Expression des AtHKT1 Orthologen DmHKT1 wurde während der Prozesse des Beutefangs und der Verdauung induziert. Versuche mit dem Jasmonat/OPDA-Analogen Coronatin zeigten zudem, dass 4 h nach Coronatinstimulierung die DmHKT1 Expression ihr Maximum aufweist (Abbildung 3-24). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine verstärkte Natriumaufnahme in den Fallen frühestens 8 bis 12 h Stunden nach der Stimulierung einsetzt (Abbildung 3-22). Die phylogenetische Eingruppierung von DmHKT1 in die HKT-ähnlichen Kanäle der Untergruppe I weisen auf einen Na⁺-selektiven Transport über die Plasmamembran der Drüsenzellen hin (Abbildung 3-23).

4.2.1 DmHKT1 fungiert als Ionenkanal

Transportproteine der HKT-Familie setzen sich aus vier Transmembran-Porendomäne-Transmembran-Einheiten zusammen. Aufgrund ihres Porenmotivs und der daraus resultierenden Selektivität sind sie in zwei Untergruppen, Klasse I und II, eingeteilt. Die Pore selbst bildet sich aus vier Porendomänen, die in einer einzelnen Polypeptidkette vorliegen. Alle Mitglieder der HKT-Familie weisen in den Porendomänen 2 bis 4 ein Glycin auf, wohingegen an homologer Position in der ersten Porendomäne je nach Unterteilung in die jeweilige Klasse ein Serin oder Glycin auftreten kann, sodass die Porenmotive G-G-G-G oder S-G-G-G resultieren. In Klasse I finden sich die hoch-selektiven Natriumtransportproteine, während die HKTs der Klasse II Kalium-gekoppelten Na⁺ Transport vermitteln. Das charakteristische Merkmal aller Vertreter der Klasse II ist ein Glycin in der ersten Porendomäne (G-G-G-G) (Abbildung 4-1 E). Vertreter der Klasse I besitzen an der homologen Stelle ein Serin (S-G-G-G) (Abbildung 4-1 A, B und C) (Durell and Guy, 1999; Maser et al., 2002b; Platten et al., 2006; Almeida et al., 2013).

Aufgrund des Porenmotivs und der Sequenzhomologie von DmHKT1 zu bekannten HKTs aus *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* und *Solanum lycopersicum* erfolgt die phylogenetische Klassifizierung von DmHKT1 in die Untergruppe I der HKT-Transportproteine (Abbildung 3-23 und Anhang B). Diese Eingruppierung ließ vermuten, dass DmHKT1 einen strikten Natriumtransport vermittelt. Wie auch bei AtHKT1, führte eine heterologe Expression von DmHKT1 im System der *Xenopus laevis* Oozyten zu Na⁺-abhängigen Strom- und Membranspannungsänderungen (Hauser and Horie, 2010). Im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen Kaliumkanal DmKT1 zeigte DmHKT1 kein Spannungs-abhängiges Schaltverhalten, sodass sowohl ein Ein- als auch ein Ausstrom in Abhängigkeit des elektrochemischen Gradienten ermöglicht wird (Abbildung 3-25, Abbildung 3-26). Auch wenn die Natriumkonzentrationen des gefangenen Beutetiers stark variieren können (Punzo, 1989, 1990; Finke, 2013), ist bei einem Membranpotential von -120 bis -140 mV und einer putativen zytosolischen Na⁺-Konzentration von bis zu 2 mM ein Ioneneinstrom durch DmHKT1 gewährleistet (Rodriguez-Navarro and Rubio, 2006). Mit Hilfe von Einstichmessungen konnte bereits eine sättigende Natriumaufnahme in sekretierenden *Dionaea* Fallen ermittelt werden, dessen Affinität im niederen millimolaren Konzentrationsbereich lag (Böhm et al., 2015b). Die im heterologen Expressionssystem bestimmte Affinität von 10 mM steht in gutem Einklang mit den *in planta* Messungen.

Die Vertreter der Klasse II der HKT-Proteine weisen einen Kationen gekoppelten Na⁺-Transport auf (Almeida et al., 2013). Solch ein Kotransport findet, trotz der Namensgebung, dieser Proteine bei Mitgliedern der Untergruppe I und auch beim HKT1 der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* nicht statt. DmHKT1 aus der Venusfliegenfalle wies eine Verschiebung der Umkehrpotentiale von 60 mV bei einer 10-fachen Natriumkonzentrationsänderung auf, sodass bei dieser Verschiebung nach Nernst weitere Kationen, wie Kalium oder Protonen, keinen Einfluss nehmen. Für DmHKT1 können die strikte Natriumselektivität und das „Nernst-Verhalten“ der Umkehrpotentiale (Abbildung 3-26) als biophysikalische Hinweise auf einen durch einen Kanal vermittelten passiven Transportmechanismus gedeutet werden. Transportstudien bei variierenden Temperaturen unterstützen diese Beobachtung, da der DmHKT1 vermittelte Natriumtransport mit einem Q₁₀-Wert ≤2 weitgehend Temperatur-unabhängig war und der Natriumfluss über die Membran keine Beeinflussung durch Protonen aufwies (Abbildung 3-27).

Zusammenfassend können die Expressionsanalysen und die biophysikalischen Merkmale von DmHKT1 mit der an der Venusfliegenfalle detektierten Natriumaufnahme in Einklang gebracht werden. Bei einer Membranspannung von -140 mV und einer geringen zytosolischen Natriumkonzentration von ca. 1 mM führt der anliegende elektrochemische Gradient während

der Beuteverdauung zu einem passiven Natriumeinstrom bis zu einer extrazellulären Natriumkonzentration von 3 μM . Dieser passive Transport wird durch die Ansäuerung im „externen Magen“ nicht beeinflusst, sodass die Natriumaufnahme aus dem Beutetier konstant gewährleistet wird.

4.2.2 Die erste Porendomäne bestimmt die Selektivität von DmHKT1

In Weizen und Gerste findet man zum Beispiel HKT-Homologe, die in allen vier Porendomänen ein Glycin aufweisen und einen Na^+ und K^+ Transport vermitteln (Rubio et al., 1995; Rubio et al., 1999; Mian et al., 2011). Im Gegensatz dazu besitzt HKT1 aus *Arabidopsis thaliana*, wie der HKT1 aus *Dionaea muscipula*, ein Serin innerhalb der ersten Porendomäne. Beide Proteine sind für Natriumionen aber nicht für Kaliumionen permeabel (Hauser and Horie, 2010). Mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese wurde das Serin in der ersten Porendomäne von AtHKT1 zu einem Glycin mutiert. Diese Einzelmutation war bereits ausreichend, den Natrium-selektiven AtHKT1 in einen Na^+ und K^+ permeablen Kanal zu ändern. (Maser et al., 2002b). Ein vergleichbares Resultat konnte für DmHKT1 mit der zielgerichteten Mutagenese des Serins an Position 84 zu einem Glycin erlangt werden (Abbildung 4-1 E). Die Natriumpermeabilität konnte um eine Kaliumleitfähigkeit erweitert werden, die in der Stromintensität vergleichbar oder je nach applizierter Substratkonzentration im Vergleich zum Natriumstrom erhöht war (Abbildung 3-28). So zeigten die Kaliumflüsse durch die DmHKT1 S84G Mutante ein Maximum bei 50 mM. Interessanterweise fiel die Stromintensität bei höheren Kaliumkonzentrationen wieder ab. Ähnliche Effekte wurden bereits für tierische Na^+ Kanäle (Sheng and Kleyman, 2003; Sheng et al., 2004) und für den K^+/Na^+ -Transporter aus Gerste (HvHKT2;1) (Mian et al., 2011) beschrieben und mit einer Selbstinhibierung erklärt. In tierischen Zellen reguliert die Selbstinhibierung des Substrates die Aktivität der Ionenkanäle und ist eine intrinsische Eigenschaft des Proteins. Bei vielen Vertretern der HKTs aus Unterklasse II findet bei hohen externen Kaliumkonzentrationen eine reduzierte Transportaktivität statt. Dieser Effekt kann in beiden Transportzuständen, dem Na^+/K^+ -Symport oder dem Na^+ -Uniport, auftreten und wird zwei distinkten Bindungsstellen für Na^+ und K^+ zugeschrieben, die sich gegenseitig beeinflussen können (Jabnune et al., 2009; Corratge-Faillie et al., 2010). Somit kann bei Klasse II HKTs im Zustand des Symports und Uniports eine Beeinflussung der beiden Substrationen bei der Permeation durch die Pore auftreten. Die Punktmutation zu einem Glycin im DmHKT1 S84G führte bei der Applikation von Kalium und Natrium zu einer additiven Stromantwort (Abbildung 3-28). Dies und die Tatsache, dass kein anormaler Molfraktionseffekt (AMFE) zu beobachten war (Abbildung 3-29), führten zu der Schlussfolgerung, dass die Mutationspore zwar für beide Ionen permeabel ist, aber der

Ionenfluss nicht gekoppelt stattfindet. Zu gleicher Zeit kann nur ein Ion von der Pore beinhaltet werden, sodass keine gegenseitige Beeinflussung und somit keine Flusskopplung oder ein gekoppelter Transportmechanismus auftritt (Hille, 2001). So lässt sich der *Dionaea* DmHKT1 hinsichtlich seiner Selektivität durch die Mutation S84G in einen Gruppe II HKT umwandeln, jedoch werden dadurch nicht alle charakteristischen Eigenschaften der Klasse II HKT-Transportproteine, wie zum Beispiel der gekoppelte Ionenfluss, übertragen (Corratge-Faillie et al., 2010).

Um der, durch die Punktmutation, geänderten Selektivität von DmHKT1 näher zu kommen, wurde von Prof. Dr. Thomas Müller (Lehrstuhl für Botanik I, Universität Würzburg) ein Homologiemodell erstellt (Abbildung 4-1) (Böhm et al., 2015a). Dabei diente die Struktur des bakteriellen Trk/Ktr/HKT Ionenkanals KtrAB von *Bacillus subtilis* als Vorlage (Vieira-Pires et al., 2013).

Im Gegensatz zu den klassischen Kaliumkanälen, zum Beispiel aus der KcsA Familie, die vier identische Untereinheiten aufweisen, bestehen Trk/Ktr/HKT-ähnliche Ionenkanäle aus einer Polypeptidkette, sodass die, aus vier Schleifen, gebildete Pore asymmetrisch erscheint (Abbildung 4-1 B). Ein weiterer Unterschied von HKT-Transportproteinen ist der Besitz von nur einer Ionen-Koordinierungsstelle in der Pore. Somit beeinflusst der Austausch einer zentralen Aminosäure in der Porendomäne die Peptidgeometrie und dadurch die Ionen-Koordinierungsstelle. Die Ionen-Koordinierungsstelle setzt sich aus zwei Carbonylringen zusammen, deren Position zueinander durch die Konformation des Rückgrates bestimmt ist. Somit können bei den K^+ -permeablen Transportproteinen die zentralen Glycinreste Einfluss auf die Geometrie einer der beiden Carbonylringe ausüben und sind nicht direkt an der Ionen-Koordinierungsstelle involviert. Diese beiden Carbonylringe, deren Position durch die Glycine in K^+ -transportierenden HKTs bestimmt werden, müssten eine ideale Koordinationsgeometrie für Kaliumionen ergeben. Im Vergleich zu der symmetrischen Pore aus vier identischen Untereinheiten mit vier Carbonylringen der klassischen Kaliumionenkanäle, führt die Asymmetrie der HKT-Pore allerdings zu einer Abweichung der idealen Distanz zwischen den Carbonylringen der Koordinierungsstelle und dem Kaliumion. Dies könnte die Permeabilität für Kalium und Natrium der HKT-Proteine der Untergruppe II erklären (Abbildung 4-1 E).

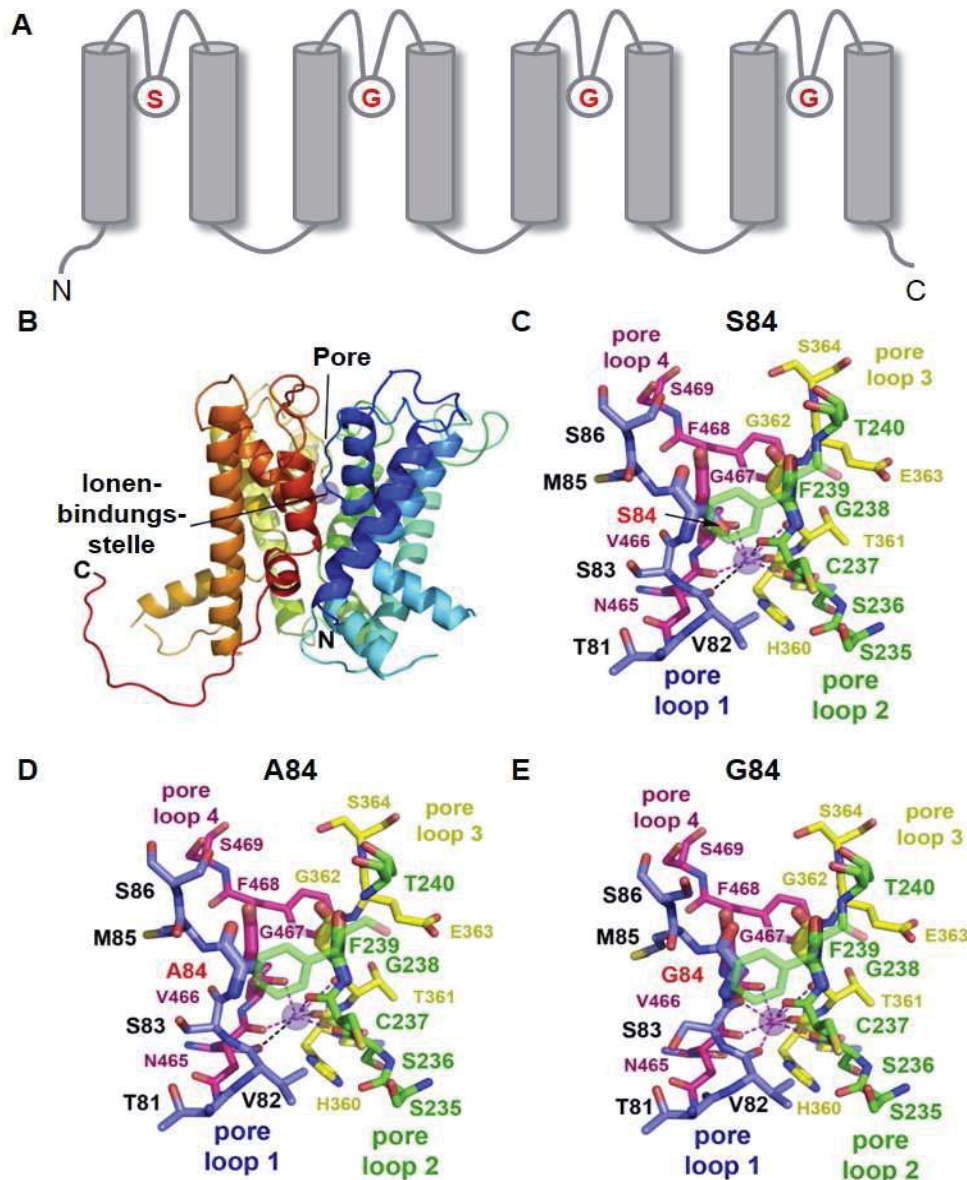


Abbildung 4-1: Homologiemodell der DmHKT1 Pore

(A) Schematische Darstellung der Strukturen von HKT1-Proteinen mit einem 4-fachen TM-P-TM Motiv. Die einzelnen Porendomänen sind als Schleifen dargestellt und geben mit einem Serin und drei folgenden Glycinen (S-G-G-G) die charakteristischen Aminosäuren einer HKT1 Pore wider. (B) 3D Homologiemodell des Ionenkanals DmHKT1 der Venusfliegenfalle. Die Farbgebung der Polypeptidkette verläuft von Blau (N-Terminus) zu Rot (C-Terminus) und die Pore sowie die Ionenbindungsstelle sind gekennzeichnet. (C) Vergrößerung der vier Poren-formenden Schleifen des Wildtyps DmHKT1 (Schleife 1 in lila, aa Thr 81 bis Ser 86; Schleife 2 in grün, aa Ser 235 bis Thr 240; Schleife 3 in gelb, aa Arg 359 bis Ser 364; Schleife 4 in magenta, aa Gly 464 bis Ser 469). Die Hydroxylgruppe des Ser 84 ist in das Innere der Pore gerichtet und ermöglicht die Koordination des Na⁺-Ions. Gestrichelte Linien geben die Ionen-Koordination durch die umgebenden Carbonylgruppen der aa Val 82, Ser 236, Val 237, His 360, Thr 631, Asn 465 und Val 466 und der Hydroxylgruppe der aa Ser 84 wider. In schwarz gestrichelt sind die Distanzen der aa zum Na⁺-Ion dargestellt, die nicht an der Ionen-Koordination beteiligt sind. In (D) und (E) sind die Vergrößerungen der vier Porendomänen der DmHKT1 Mutationen A84 (D) und G84 (E) zu erkennen. Die Ionen-Koordinationsgeometrie mit einem Ala an Position 84 ist ähnlich zum Wildtyp, mit dem Unterschied, dass eine Koordinationsstelle aufgrund der fehlenden Serin Hydroxylgruppe fehlt, wodurch nicht strikt zwischen K⁺ und Na⁺ unterschieden werden kann (D). Ein Gly an Position 84 führt zu einer geänderten Rückgratkonformation der aa Ser 83 und Val 82, sodass sich eine zu K⁺-permeierenden Ionenkanäle (z.B. TrKH und KtrB) vergleichbare Ionen-Koordinationsstelle ergibt.

Wäre jedoch die Ionenselektivität der HKT-Familie nur vom Torsionswinkel des Rückgrates abhängig, welches bei vier Glycinen eine Permeabilität von Kalium begünstigt, so würde eine Mutation an Position 84 zu einem nicht-Glycin zu einer DmHKT1 Wildtyp-ähnlichen Na⁺-Selektivität führen. DmHKT1 besitzt ein Serin anstelle des ersten zentralen Glycins der Ionen-Koordinierungsstelle (Abbildung 4-1 C), wodurch es Einfluss auf die Rückgratgeometrie nimmt und somit die Position des unteren Carbonylringes in der Koordinierungsstelle verändert. Eine Serin-ähnliche Rückgratkonformation innerhalb der Ionen-Koordinierungsstelle besitzt die Aminosäure Alanin. Wird diese in der ersten Porendomäne eingefügt (Abbildung 4-1 D), so wäre eine zum Serin vergleichbare Selektivität des Transportproteins zu erwarten. Jedoch transportierte die DmHKT1 S84A Mutante weiterhin Kalium, wenngleich der Kaliumfluss im Vergleich zu S84G geringer war (Abbildung 3-30). Somit kann nicht nur das Rückgrat der Koordinierungsstelle entscheidend für die Na⁺-Selektivität sein. Serine besitzen im Gegensatz zu Alaninen und Glycinen eine Hydroxylseitengruppe (Abbildung 4-1 C). Das Strukturmodell erlaubt zwei Orientierungsmöglichkeiten des Serins an Position 84: (i) die Hydroxylgruppe der Seitenkette kann in Richtung der Na⁺ selektiven Pore ausgelegt sein oder (ii) sie entfernt sich vom Inneren der Pore. Die Tatsache, dass nur ein Serin in der Pore zu einem kompletten Verlust der Kaliumleitfähigkeit führt, lässt vermuten, dass die Orientierung der Hydroxylgruppe in das Innere der Pore zeigt und dadurch zwischen Natrium und Kalium differenziert werden kann. Die strikte Natriumselektivität von DmHKT1 scheint somit neben der Rückgratkonformation auch durch die Orientierung der Hydroxylgruppe bestimmt zu werden.

4.2.3 Ist DmHKT1 ebenfalls eine Komponente in einem regulatorischen Netzwerk?

Der Beitrag von HKT-Proteinen in der Na⁺ oder K⁺ Homöostase, abhängig vom jeweiligen spezifischen HKT-Transporter, ist in der Wissenschaft gut etabliert. Die Regulation dieser Transportproteine oder die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch nur teilweise verstanden. Bislang zeigten verschiedene Ansätze, dass AtHKT1 in seiner Expression zum einen durch einen erhöhten Cytokiningehalt während des Salzstresses und zum anderen durch den auf Abscisinsäure (ABA) reagierenden Transkriptionsfaktor ABI4 erniedrigt ist. Im Gegensatz dazu können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Expression oder die Aktivität der Proteine erhöhen (Almeida et al., 2013). Auch der Natriumkanal aus der Venusfliegenfalle DmHKT1 wurde auf transkriptionaler Ebene differentiell reguliert. Der Beutefang und die dadurch aufkommenden hormonellen Signale führten zum Beispiel zu einer verstärkten Expression in den für die Nährstoffaufnahme verantwortlichen Drüsen (Abbildung 3-24).

Ähnlich den Analysen zum Kaliumkanal DmKT1 (Abbildung 3-4) und dem K⁺/H⁺-Transporter DmHAK5 (Abbildung 3-14) aus *Dionaea muscipula* könnte neben der transkriptionalen Steuerung von DmHKT1 auch eine posttranslationale Modifikation, wie zum Beispiel Phosphorylierungsereignisse, die Aktivität des Natriumkanals steuern. Erste Hinweise auf eine Phosphorylierungs-gesteuerte Aktivität von HKTs stammen aus Analysen in Reispflanzen. So führte die Applikation von Phosphorylierungsinhibitoren in Reis zu einem reduzierten Natriumeinstrom in Wurzelepidermiszellen. Dieser Effekt konnte nicht nur auf eine mRNA Degradation zurückgeführt werden, sodass Horie et al. eine zusätzliche Phosphorylierungs-abhängige posttranslationale Modifikation vermuteten (Horie et al., 2007). Dies wurde ebenfalls für HKT1 aus Gerste angenommen. Jedoch zeigten Mutationsanalysen am Gersten HKT1 an den Serinen der Position 68, 186, 396, 419 und 528 im Expressionssystem der Hefe keiner Änderung der HvHKT1 Aktivität (Haro et al., 2005). Eindeutige Studien sind zu den Kaliumtransportern der Trk-Familien aus *Saccharomyces cerevisiae* zugänglich, die zusammen mit den HKT-Proteinen eine Transporterfamilie bilden. So ist der aus Hefe stammende und membranständige Uniporter Trk1p durch die Kinasen HAL4 und -5 aktiviert, die somit positive Regulatoren für Trk1p darstellen (Yenush et al., 2005). Diese dadurch gesteigerte Transportaktivität führte in diesem Fall zu einer verstärkten Salztoleranz (Mulet et al., 1999).

Die Nährstoffaufnahme in *Dionaea* Fallen ist ein Prozess an dem viele Ionenkanäle und Transporter beteiligt sind. Um die einzelnen Komponenten zu koordinieren ist eine fein-abgestimmte Regulation der Prozesse im Allgemeinen und der beteiligten Proteine im Speziellen zu vermuten. Interessanterweise führte eine heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten von DmHKT1 ohne jegliche Koexpression von Kinasen bereits zu einer Kanalaktivität und zu DmHKT1 vermittelten Natriumflüssen. Um jedoch im Falle des Natriumkanals der Venusfliegenfalle eine mögliche posttranslationale Regulation zu entschlüsseln, wurden putative Phosphorylierungsstellen (Thr142, Tyr176 und Tyr292) nachgeahmt oder zerstört und somit ihre Auswirkungen auf die Aktivität des Kanals analysiert. Die Topologie von Trk/Ktr/HKT-Proteinen weist eine zytosolische Position der drei in Frage kommenden Aminosäuren auf, wodurch die Voraussetzung zur Interaktion mit einer Kinase gegeben ist (Kato et al., 2007). Wurde eine Phosphorylierung durch ein Aspartat nachgeahmt, so konnten zum Wildtyp vergleichbare Natriumflüsse aufgezeichnet werden. Der Austausch zu je einem Alanin führte zu einer bis zu 80 % reduzierten Stromantwort (Abbildung 3-31). Daraus könnten Hinweise auf eine mögliche Regulation der DmHKT1-Kanalaktivität gezogen werden, die durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Thr142, Tyr176 und Tyr292 vermittelt werden könnte. Jedoch darf die putative Phosphorylierung von DmHKT1 bisher nur als Hypothese

betrachtet werden. Um detailliertere Einblicke in diesen Regulationsprozess zu erhalten und somit die aufgestellte Vermutung zu bestätigen oder auch zu entkräften, sollten in Zukunft verschiedenste Versuchsansätze gewählt werden. Zum einen könnte die Grundaktivität von DmHKT1 in *Xenopus* Oozyten mit einer Aktivierung des Kanals durch endogene Kinasen erklärt werden, da die endogenen Spannungs-abhängigen Natriumkanäle der *Xenopus* Oozyten ebenfalls durch Proteinkinasen (PKC) aktiviert werden (Weber, 1999). Somit scheint dieses heterologe Expressionssystem zur Untersuchung einer Modifikation des Wildtyps nicht ausreichend zu sein. Zum anderen sollte aus strukturebiologischer Sicht der Austausch der drei putativen Phosphorylierungsstellen gegen strukturell ähnliche Aminosäuren optimiert werden. Gerade der Austausch des Threonins und der Tyrosine mit jeweils einem Alanin kann aufgrund der verschiedenen Größen und Eigenschaften zu strukturellen Unterschieden führen, wodurch eine exakte Proteinkonformation nicht gewährleistet werden kann. So könnte das polare Threonin durch ein unpolares Valin und ein Phenylring-beinhaltenes Tyrosin durch ein Phenylalanin ersetzt werden (Weinmaster et al., 1984; Okamoto et al., 1998). Sollten diese Mutationen ebenfalls zu einer Reduktion oder zu einem Verlust des Natriumstroms führen, so würden die hier gezeigten Mutagenesestudien bekräftigt und unterstützt werden. Des Weiteren könnten mit Hilfe der Massenspektrometrie die Analyse eventueller Phosphorylierungsstellen im DmHKT1-Protein vertieft und auf molekularer Ebene dekodiert werden (Dephoure et al., 2013). Auch nach dem Erhalt weitere Hinweise auf einen Phosphorylierungs-basierten Regulationsmechanismus wird sich die Frage nach der interagierenden Proteinkinase nicht umgehen lassen. FRET- (Förster-Resonanzenergietransfer) oder BIFC-basierte (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) Interaktionsstudien in Kombination mit Koexpressionsstudien in Oozyten und *in vitro* Kinaseuntersuchungen, würden den Kontext der Phosphorylierungs-abhängigen Regulation von DmHKT1 entschlüsseln und letztendlich ein mögliches Modell für die posttranslationale Steuerung von HKT-ähnlichen Proteinen abrunden.

4.3 Die Resorption von Nährsalzen in den Fallen von *Dionaea* zeigt Parallelen zur Wurzel vermittelten Nährstoffaufnahme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Einblick in die molekularen Abläufe der Nährstoffresorption aus dem Beutetier gewonnen. Bei einem Vergleich der Transportkomponenten in verdauenden Fallen von *Dionaea* mit den Wurzel exprimierten orthologen Proteinen aus nicht-karnivoren Pflanzen, findet sich eine große Schnittmenge an Kanälen, Transportern und regulatorischen Komponenten, die in den Drüsen von *Dionaea* ähnliche Funktionen ausüben, wie sie es in der Wurzel von nicht-karnivoren Pflanzen tun. Die Venusfliegenfalle hat also, in ihrer Entwicklung zu einer karnivoren Pflanze, nicht völlig neue Gene hinzubekommen,

sondern nutzt das Repertoire vorhandener Gene für die Zwecke des Beutefangs und der Nährstoffresorption. Dies zeigte sich bereits für den Ammoniumtransporter DmAMT1 aus der Venusfliegenfalle, der ein Beispiel für die Parallelen zwischen der Nährstoffresorption an Wurzelhaaren und ihrer Aufnahme in den Klappfallen der Venusfliegenfallen ist (Scherzer et al., 2013). Ähnliche Parallelen sind auch bei den hier vorgestellten Transportproteinen festzustellen. So nutzt *Dionaea muscipula* zum Beispiel zur Kaliumaufnahme in den Fallen, wie *Arabidopsis thaliana* in Wurzeln, Kanäle und Transporter vom AKT1- und HAK5-Typ. Die Proteine üben eine vergleichbare physiologische Rolle in beiden Pflanzenspezies aus, mit der Ausnahme, dass die verantwortlichen Pflanzenorgane variieren. Diese Arbeit verdeutlicht, dass *Dionaea muscipula* ihre Karnivorie hinsichtlich der Nährstoffresorption mit Hilfe von Proteinen bewerkstelligt, die in nicht-karnivoren Pflanzen an anderer Stelle eine gleiche Funktion ausüben oder aber Transporteigenschaften aufweisen, die für eine Nährstoffaufnahme in den Fallen ausgenutzt werden können. So ermöglicht zum Beispiel der HKT1-Orthologe in *Dionaea* die Natriumaufnahme, wohingegen der aus *Arabidopsis* stammende Kanal zur Natriumumverteilung benötigt wird. Somit nutzt *Dionaea muscipula* nicht nur beim Verdauungsprozess Enzyme, die Parallelen zu Pathogenese-assoziierten Proteinen aufweisen (Schulze et al., 2012), sondern auch mit der Nährstoffresorption/-verteilung-assoziierte Transporter und Kanäle zur Nährstoffaufnahme aus der Beute in den der Karnivorie zugeschriebenen Klappfallen.

4.4 Die Nährstoffaufnahme im Zusammenhang mit dem Beutefang

Die Venusfliegenfalle stellt aufgrund ihrer Karnivorie und den damit verbundenen Mechanismen eine interessante Pflanze dar. Ein Mechanismus, der der Karnivorie zugeschrieben werden kann, ist die Aufnahme der aus dem Beutetier stammenden Nährstoffe. Aus diesem Grund war es von großem Interesse die zugrunde liegenden Transportmodule und -prozesse zu identifizieren. Die in dieser Arbeit behandelten Transportproteine für die Kationen Kalium und Natrium, sowie ihre regulatorischen Komponenten sollen im Folgenden in einem Modell in den Kontext des Beutefangs und –verdaus integriert und gebracht werden (Abbildung 4-2).

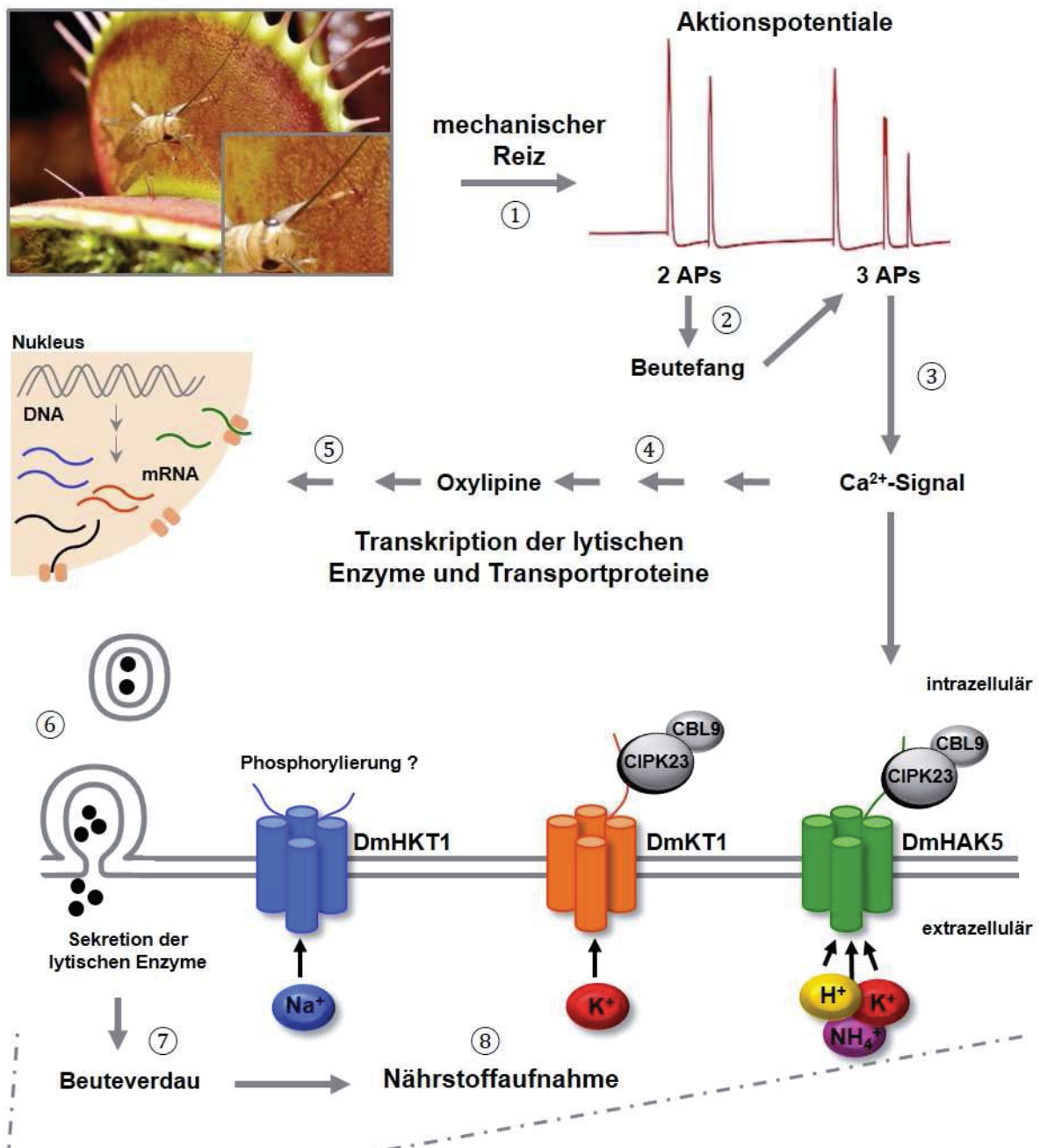


Abbildung 4-2: Schema zum Beutefang und -verdau in *Dionaea muscipula*

Die durch das Beutetier verursachten mechanischen Reize (1) werden in Aktionspotentiale (APs) übersetzt, die letztendlich zum schnellen Fallenschluss (2 APs) (2) und nach weiterer Stimulation (≥ 3 APs) zu einer erhöhten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in den Drüsenzellen führen (3). Die Erhöhung der zytosolischen [Ca²⁺] löst die Synthese von Oxylipinen und damit die Induktion des Jasmonat-Signalweges aus (4). Dies wiederum induziert die Expression von lytischen Enzymen und Transportproteinen zur Nährstoffaufnahme (5). Die Sekretion der lytischen Enzyme durch exozytotische Prozesse (6) leitet die Zersetzung des gefangenen Beutetiers ein (7). Die freigesetzten Nährstoffe, wie zum Beispiel K⁺ und Na⁺, können durch die Aktivität der entsprechenden Transportproteine über die Plasmamembran der Drüsen aufgenommen werden (8). Dabei werden zum Beispiel die K⁺-Transportmodule posttranslational und Ca²⁺-abhängig über CBL/CIPK-Komplexe reguliert. (Modell modifiziert nach Pressemitteilung der Universität Würzburg vom 27.05.2015; Fotografie erstellt von Dr. Sönke Scherzer).

Der Beutefang wird mit der Berührung der Triggerhaare durch das Beutetier eingeleitet ①. Erfolgt zweimal ein mechanischer Reiz, der jeweils in ein elektrisches Signal in Form eines Aktionspotentials übersetzt wird, kommt es zum schnellen Fallenschluss ②. Durch die fortlaufende Bewegung des Insekts und der somit anhaltenden mechanischen Stimulation der Falle treten eine Reihe weiterer Aktionspotentiale auf. Nach drei Aktionspotentialen kann eine erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration detektiert werden ③. In nicht-karnivoren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* kann eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit der Synthese von Jasmonaten in Zusammenhang gebracht werden (Fisahn et al., 2004; Dombrowski and Bergey, 2007). Auch in *Dionaea muscipula* ist bekannt, dass die mechano-elektrische Stimulation des Beutefangs zu einem Anstieg des Gehalts an Oxylipinen wie Jasmonat oder OPDA führt (Escalante-Perez et al., 2011). Auch wird auf transkriptionaler Ebene die Jasmonsäure-Biosynthese stimuliert ④. Die Induktion der OPDA- oder Jasmonat-Signalwege führt schließlich zur Synthese und Exozytose von lytischen Enzymen (zum Beispiel Hydrolasen) in das Verdauungsorgan ⑤ (Böhm et al., 2015b). Des Weiteren wird angenommen, dass Kalzium als „second messenger“ für die Sekretion der lytischen Enzyme eine wichtige Rolle spielt. Sowohl in tierischen Zellen als auch bei der Exozytose pflanzlicher Aleuronzellen konnte eine Ca^{2+} -regulierte Enzymsekretion gezeigt werden (Penner and Neher, 1988; Tester and Zorec, 1992). Dies legt nahe, dass die Sekretion ⑥ während des Verdauungsprozesses von *Dionaea* durch den Anstieg der Kalziumkonzentration eingeleitet wird (Escalante-Perez et al., 2011). Neben der Sekretion ⑥ und der Beuteverdauung ⑦ findet zeitgleich die Nährstoffaufnahme ⑧ statt, sodass die Expression der lytischen Enzyme mit der Transkription der benötigten Transportproteine ⑤ einhergeht (Böhm et al., 2015b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die Aufnahme der Kationen Kalium und Natrium auf molekularer Ebene untersucht ⑧. Da die Nährstoffresorption einen essentiellen Prozess darstellt, um die mit der Karnivorie verbundenen hohen „Kosten“ zu kompensieren, ist eine fein-abgestimmte Regulation der Expression und Aktivität der Transportproteine von großer Bedeutung. Die Fallen von *Dionaea* besitzen die benötigten Transporter nicht auf Vorrat, sondern produzieren und aktivieren diese Proteine auf Abruf („on demand“). Die Expression der Transporter und Kanäle ⑤ zur Kaliumaufnahme ⑧ wird durch die hormonelle und mechanische Signalgebung ①④ aus dem Beutefang induziert und die Transportproteine selbst werden durch posttranslationale Modifikationen aktiviert. So werden die beiden Kaliumaufnahmemodule, DmKT1 und DmHAK5, über denselben Ca^{2+} -abhängigen Sensor/Kinase-Komplex aktiviert, sodass der durch den Beutefang ansteigende Kalziumgehalt auf die Aktivität der Kaliumtransportproteine einen direkten Einfluss nimmt. Diese Koordination

der Aktivität der Kaliumtransportproteine, sowie ihre unterschiedlichen Affinitäten zum Substrat, ermöglichen es der Venusfliegenfalle die Resorption effizient zu steuern.

Im Gegensatz zu nicht-karnivoren Pflanzen vermeidet die Venusfliegenfalle die Aufnahme von Natrium nicht, sondern nimmt den Natriumgehalt des Beutetiers vollständig auf. Die biophysikalischen Eigenschaften des Natriumkanals DmHKT1, die im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeitet wurden, weisen auf eine Optimierung des Natriumkanals für seine Aufgabe bei der Natriumresorption aus dem Beutetier in den Fallen von *Dionaea* hin (8). Aufgrund seiner pH-Unempfindlichkeit und seiner hohen Natriumspezifität ist DmHKT1 in der Lage eine konstante Resorption von Natrium zu gewährleisten. Durch die nahezu vollständige Nährstoffaufnahme in die Drüsenzellen wird eine Salzablagerung nach erfolgreichem Beuteverdaу und dem anschließenden Öffnen der Falle vermieden. So läuft die Falle nicht Gefahr, einem osmotischen Stress durch Salzablagerung auf der Falleninnenseite ausgesetzt zu sein. Zudem scheint *Dionaea muscipula* aus der Natriumaufnahme Vorteile zur Aufrechterhaltung des osmotischen Potentials und des Turgors zu ziehen. „*It can be said that, for plants and fungi, Na⁺ is better than nothing...*“ (Haro et al., 2005).

6. Literaturverzeichnis

Reference List

- Adamec, L.** (1995). Ecological Requirements and Recent European Distribution of the Aquatic Carnivorous Plant *Aldrovanda-Vesiculosa* L - a Review. Folia Geobot Phytotx 30, 53-61.
- Adamec, L.** (1997). Mineral nutrition of carnivorous plants: A review. Bot Rev 63, 273-299.
- Adlassnig, W., Koller-Peroutka, M., Bauer, S., Koshkin, E., Lendl, T., and Lichtscheidl, I.K.** (2012). Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. Plant J 71, 303-313.
- Ahn, S.J., Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2004). Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake. Plant Physiol 134, 1135-1145.
- Ajai A. I., B.M., Jacob J. O., Audu U. A. .** (2013). Determination of some essential minerals in selected edible insects African Journal of Pure and Applied Chemistry Vol. 7(5),, 194-197.
- Aleman, F., Nieves-Cordones, M., Martinez, V., and Rubio, F.** (2011). Root K(+) acquisition in plants: the Arabidopsis thaliana model. Plant Cell Physiol 52, 1603-1612.
- Almeida, P., Katschnig, D., and de Boer, A.H.** (2013). HKT transporters--state of the art. International journal of molecular sciences 14, 20359-20385.
- An, C.I., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.** (2002). Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. Planta 214, 661-667.
- Ankenbrand, M., Weber, L., Förster, F., Bemm, F., Becker, D., and Bemm, F.** (2015). The Transcriptome Browser: Visualizing RNAseq experiments for denovo transcriptomes. in preparation.
- Bailey, T., and McPherson, S.** (2012). *Dionaea -The Venus`s Flytrap-*. Redfern Natural History Productions 978-1-9087878-10-1.
- Barthlott, W., Porembski, S., Seine, R., and Theisen, I.** (2004). Karnivoren - Biologie und Kultur fleischfressender Pflanzen. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Bassirrad, H.** (2000). Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change. New Phytologist 147, 155-169.
- Batistic, O., and Kudla, J.** (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. Planta 219, 915-924.

- Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J.D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K., and Hedrich, R.** (1996). Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 8123-8128.
- Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Very, A.A., Sentenac, H., and Casse, F.** (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. Embo Journal 22, 2004-2014.
- Blumwald, E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. Current opinion in cell biology 12, 431-434.
- Böhm, J., Scherzer, S., Shabala, S., Krol, E., Neher, E., Müller, T., and Hedrich, R.** (2015a). Venus flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability. Molecular Plant, accepted 2015/09.
- Böhm, J., Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., Shabala, L., von Meyer, K., Shabala, S., Al-Rasheid, K.A.S., Rennenberg, H., Müller, T., Neher, E., and Hedrich, R.** (2015b). Dionaea muscipula a plant that counts - prey induced action potentials control nutrient and osmolite uptake of the Venus flytrap. Current Biology, under revision.
- Boland, W., Hopke, J., Donath, J., Nüske, J., and Bublitz, F.** (1995). Jasmonsäure- und Coronatin-induzierte Duftproduktion in Pflanzen. Angew. Chem. 107.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., and Kunkel, B.N.** (2005). The Pseudomonas syringae phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in Arabidopsis thaliana. Mol Plant Pathol 6, 629-639.
- Buchen, B., Hensel, D., and Sievers, A.** (1983). Polarity in mechanoreceptor cells of trigger hairs of Dionaea muscipula Ellis. Planta 158, 458-468.
- Cao, Y., Glass, A.D., and Crawford, N.M.** (1993). Ammonium inhibition of Arabidopsis root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations aux1, axr1, and axr2. Plant Physiol 102, 983-989.
- Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., and 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, 21437-21443.
- Cherel, I., Lefoulon, C., Boeglin, M., and Sentenac, H.** (2014). Molecular mechanisms involved in plant adaptation to low K(+) availability. J Exp Bot 65, 833-848.
- Cieslak, T., Polepalli, J.S., White, A., Muller, K., Borsch, T., Barthlott, W., Steiger, J., Marchant, A., and Legendre, L.** (2005). Phylogenetic analysis of Pinguicula

- (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. Am J Bot 92, 1723-1736.
- Ciruela, F.** (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. Curr Opin Biotechnol 19, 338-343.
- Corratge-Faillie, C., Jabnourne, M., Zimmermann, S., Very, A.A., Fizames, C., and Sentenac, H.** (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. Cell Mol Life Sci 67, 2511-2532.
- Croizat, L.** (1960). Principia botanica, or beginnings of botany.
- Cui, X.** (2012). Nutrient sensing in plants. Mol Plant 5, 1167-1169.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., Lopez-Sanjurjo, E.J., Reski, R., Kuchitsu, K., Muller, T.D., Becker, D., Schonknecht, G., and Hedrich, R.** (2011). A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. Plant Cell 23, 2696-2707.
- Darwin, C.** (1875). Insectivorous plants. New York, NY, USA: D. Appleton & Co.
- Dephoure, N., Gould, K.L., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R.** (2013). Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. Mol Biol Cell 24, 535-542.
- Dombrowski, J.E., and Bergey, D.R.** (2007). Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. Plant Sci 172, 335-344.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R.** (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science 280, 69-77.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-Rober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., and Hedrich, R.** (1997). Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. Biophys J 72, 2143-2150.
- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., and Thibaud, J.B.** (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. Plant J 53, 115-123.
- Durell, S.R., and Guy, H.R.** (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel. Biophys J 77, 789-807.
- Ellison, A.M.** (2006). Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. Plant Biol (Stuttg) 8, 740-747.
- Ellison, A.M., and Gotelli, N.J.** (2001). Evolutionary ecology of carnivorous plants. Trends in Ecology & Evolution 16, 623-629.

- Ellison, A.M., and Gotelli, N.J.** (2009). Energetics and the evolution of carnivorous plants-Darwin's 'most wonderful plants in the world'. Journal of Experimental Botany 60, 19-42.
- Ellison, A.M., and Adamec, L.** (2011). Ecophysiological traits of terrestrial and aquatic carnivorous plants: are the costs and benefits the same? Oikos 120, 1721-1731.
- Escalante-Perez, M., Scherzer, S., Al-Rasheid, K.A., Dottinger, C., Neher, E., and Hedrich, R.** (2014). Mechano-stimulation triggers turgor changes associated with trap closure in the Darwin plant *Dionaea muscipula*. Mol Plant 7, 744-746.
- Escalante-Perez, M., Krol, E., Stange, A., Geiger, D., Al-Rasheid, K.A., Hause, B., Neher, E., and Hedrich, R.** (2011). A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 15492-15497.
- Finke, M.D.** (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. Zoo Biol 21, 269-285.
- Finke, M.D.** (2013). Complete Nutrient Content of Four Species of Feeder Insects. Zoo Biol 32, 27-36.
- Finkel, A.G., and Gage, P.W.** (1985). Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW, eds. Voltage and patch clamping with microelectrodes. Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co., 47-94.
- Finkel, A.S., and Redman, S.** (1984). Theory and operation of a single microelectrode voltage clamp. J Neurosci Methods 11, 101-127.
- Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., and Pena-Cortes, H.** (2004). Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. Plant Cell Physiol 45, 456-459.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., and Dolan, L.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422, 442-446.
- Forterre, Y.** (2013). Slow, fast and furious: understanding the physics of plant movements. J Exp Bot 64, 4745-4760.
- Forterre, Y., Skotheim, J.M., Dumais, J., and Mahadevan, L.** (2005). How the Venus flytrap snaps. Nature 433, 421-425.
- Fromm, J., and Lautner, S.** (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. Plant Cell Environ 30, 249-257.

- Fulgenzi, F.R., Peralta, M.L., Mangano, S., Danna, C.H., Vallejo, A.J., Puigdomenech, P., and Santa-Maria, G.E.** (2008). The ionic environment controls the contribution of the barley HvHAK1 transporter to potassium acquisition. Plant Physiol 147, 252-262.
- Gambale, F., and Uozumi, N.** (2006). Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. J Membr Biol 210, 1-19.
- Gao, P., Loeffler, T.S., Honsel, A., Kruse, J., Krol, E., Scherzer, S., Kreuzer, I., Bemm, F., Buegger, F., Burzlaff, T., Hedrich, R., and Rennenberg, H.** (2015). Integration of trap- and root-derived nitrogen nutrition of carnivorous *Dionaea muscipula*. New Phytol 205, 1320-1329.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H., and Thibaud, J.B.** (1996). The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 271, 22863-22870.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., and von Wiren, N.** (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into arabidopsis roots. Plant Cell 11, 937-947.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J., and Hedrich, R.** (2009). Heteromeric AtKC1{middle dot}AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K⁺-limiting conditions. J Biol Chem 284, 21288-21295.
- Gessler, A., Schneider, S., Von Sengbusch, D., Weber, P., Hanemann, U., Huber, C., Rothe, A., Kreutzer, K., and Rennenberg, H.** (1998). Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. New Phytologist 138, 275-285.
- Gibson, T.C., and Waller, D.M.** (2009). Evolving Darwin's 'most wonderful' plant: ecological steps to a snap-trap. New Phytol 183, 575-587.
- Gierth, M., Maser, P., and Schroeder, J.I.** (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁽⁺⁾ deprivation-induced high-affinity K⁽⁺⁾ uptake and AKT1 K⁽⁺⁾ channel contribution to K⁽⁺⁾ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. Plant Physiol 137, 1105-1114.
- Gilroy, S., and Jones, D.L.** (2000). Through form to function: root hair development and nutrient uptake. Trends Plant Sci 5, 56-60.
- Givnish, T.J.** (2015). New evidence on the origin of carnivorous plants. P Natl Acad Sci USA 112, 10-11.
- Givnish, T.J., Burkhardt, E.L., Happel, R.E., and Weintraub, J.D.** (1984). Carnivory in the Bromeliad *Brocchinia-Reducta*, with a Cost-Benefit Model for the General Restriction of Carnivorous Plants to Sunny, Moist, Nutrient-Poor Habitats. Am Nat 124, 479-497.

- Goldman, D.E.** (1943). Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. J Gen Physiol 27, 37-60.
- Golldack, D., Su, H., Quigley, F., Kamasani, U.R., Munoz-Garay, C., Balderas, E., Popova, O.V., Bennett, J., Bohnert, H.J., and Pantoja, O.** (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. Plant J 31, 529-542.
- Gomez-Porras, J.L., Riano-Pachon, D.M., Benito, B., Haro, R., Sklodowski, K., Rodriguez-Navarro, A., and Dreyer, I.** (2012). Phylogenetic analysis of k(+) transporters in bryophytes, lycophytes, and flowering plants indicates a specialization of vascular plants. Frontiers in plant science 3, 167.
- Grabov, A.** (2007). Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family - multiple functions. Ann Bot 99, 1035-1041.
- Grinstein, S., Romanek, R., and Rotstein, O.D.** (1994). Method for manipulation of cytosolic pH in cells clamped in the whole cell or perforated-patch configurations. Am J Physiol 267, C1152-1159.
- Guan, B., Chen, X., and Zhang, H.** (2013). Two-electrode voltage clamp. Methods Mol Biol 998, 79-89.
- Gundersen, C.B., Miledi, R., and Parker, I.** (1983). Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society 219, 103-109.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G.** (1971). Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells. Nature 233, 177-&.
- Haberlandt, G.** (1906). Sinnesorgane im Pflanzenreich zur Perzeption mechanischer Reize. Engelmann Leipzig 2. Auflage.
- Haro, R., Banuelos, M.A., Senn, M.E., Barrero-Gil, J., and Rodriguez-Navarro, A.** (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. Plant Physiol 139, 1495-1506.
- Hauser, F., and Horie, T.** (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K(+)/Na(+) ratio in leaves during salinity stress. Plant Cell Environ 33, 552-565.
- Hedrich, R.** (2012). Ion channels in plants. Physiological reviews 92, 1777-1811.
- Hedrich, R., and Kudla, J.** (2006). Calcium signaling plant K+ uptake networks channel. Cell 125, 1221-1223.

- Hedrich, R., Bregante, M., Dreyer, I., and Gambale, F.** (1995a). The Voltage-Dependent Potassium-Uptake Channel of Corn Coleoptiles Has Permeation Properties Different from Other K⁺ Channels. Planta 197, 193-199.
- Hedrich, R., Moran, O., Conti, F., Busch, H., Becker, D., Gambale, F., Dreyer, I., Kuch, A., Neuwinger, K., and Palme, K.** (1995b). Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. Eur Biophys J 24, 107-115.
- Henry, Y., and Steer, M.W.** (1985). Acid-Phosphatase Localization in the Digestive Glands of *Dionaea-Muscipula* Ellis Flytraps. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 33, 339-344.
- Hensel, W.** (1993). Pflanzen in Aktion -Krümmen, Klappen, Schleudern-. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford 3-86025-061-2.
- Hertel, B., Horvath, F., Wodala, B., Hurst, A., Moroni, A., and Thiel, G.** (2005). KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. J Exp Bot 56, 3103-3110.
- Heubl, G., Bringmann, G., and Meimberg, H.** (2006). Molecular phylogeny and character evolution of carnivorous plant families in Caryophyllales--revisited. Plant Biol (Stuttg) 8, 821-830.
- Heytler, P.G., and Prichard, W.W.** (1962). A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. Biochem Biophys Res Commun 7, 272-275.
- Hille, B.** (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2nd edition edn. Sunderland , Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hille, B.** (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd edition edn. Sunderland , Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hille, B., and Schwarz, W.** (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. J Gen Physiol 72, 409-442.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R.** (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. Science 280, 918-921.
- Hodgkin, A.L., and Katz, B.** (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J Physiol 108, 37-77.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., and Katz, B.** (1952). Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of *Loligo*. J Physiol-London 116, 424-448.
- Hodick, D., and Sievers, A.** (1986). The Influence of Ca²⁺ on the Action-Potential in Mesophyll-Cells of *Dionaea-Muscipula* Ellis. Protoplasma 133, 83-84.

- Hodick, D., and Sievers, A.** (1988). The Action-Potential of *Dionaea-Muscipula* Ellis. Planta 174, 8-18.
- Horie, T., Brodsky, D.E., Costa, A., Kaneko, T., Lo Schiavo, F., Katsuhara, M., and Schroeder, J.I.** (2011). K⁺ transport by the OsHKT2;4 transporter from rice with atypical Na⁺ transport properties and competition in permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ ions. Plant Physiol 156, 1493-1507.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., and Schroeder, J.I.** (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. EMBO J 26, 3003-3014.
- Hoth, S., and Hedrich, R.** (1999). Distinct molecular bases for pH sensitivity of the guard cell K⁺ channels KST1 and KAT1. J Biol Chem 274, 11599-11603.
- Hoth, S., Dreyer, I., Dietrich, P., Becker, D., Muller-Rober, B., and Hedrich, R.** (1997). Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 4806-4810.
- Imes, D., Mumm, P., Bohm, J., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. Plant J 74, 372-382.
- Jabnoune, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.L., Conejero, G., Rodriguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdelly, C., and Very, A.A.** (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. Plant Physiol 150, 1955-1971.
- Ji, H.T., Pardo, J.M., Batelli, G., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., and Li, X.** (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway: Established and Emerging Roles. Molecular Plant 6, 275-286.
- Joel, D.M., Rea, P.A., and Juniper, B.E.** (1983). The Cuticle of *Dionaea-Muscipula* Ellis (Venuss Flytrap) in Relation to Stimulation, Secretion and Absorption. Protoplasma 114, 44-51.
- Kato, N., Akai, M., Zulkifli, L., Matsuda, N., Kato, Y., Goshima, S., Hazama, A., Yamagami, M., Guy, H.R., and Uozumi, N.** (2007). Role of positively charged amino acids in the M2D transmembrane helix of Ktr/Trk/HKT type cation transporters. Channels (Austin) 1, 161-171.
- Kerppola, T.K.** (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. Annual review of biophysics 37, 465-487.
- Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., and Schroeder, J.I.** (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. Plant Cell 10, 51-62.

- Kreuzwieser, J., Scheerer, U., Kruse, J., Burzlaff, T., Honsel, A., Alfarraj, S., Georgiev, P., Schnitzler, J.P., Ghirardo, A., Kreuzer, I., Hedrich, R., and Rennenberg, H.** (2014). The Venus flytrap attracts insects by the release of volatile organic compounds. Journal of Experimental Botany 65, 755-766.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., and Trebacz, K.** (2006). Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. Biol Plantarum 50, 411-416.
- Krol, E., Plachno, B.J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubinska, H., and Trebacz, K.** (2012). Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. Ann Bot 109, 47-64.
- Kruse, J., Gao, P., Honsel, A., Kreuzwieser, J., Burzlaff, T., Alfarraj, S., Hedrich, R., and Rennenberg, H.** (2014). Strategy of nitrogen acquisition and utilization by carnivorous *Dionaea muscipula*. Oecologia 174, 839-851.
- Lebaudy, A., Very, A.A., and Sentenac, H.** (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. FEBS Lett 581, 2357-2366.
- Lee, S.C., Lan, W.Z., Kim, B.G., Li, L., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 15959-15964.
- Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 12625-12630.
- Loque, D., and von Wiren, N.** (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. J Exp Bot 55, 1293-1305.
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., KA, S.A.-R., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2014). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. Sci Signal 7, ra86.
- Marten, I., and Hoshi, T.** (1998). The N-terminus of the K channel KAT1 controls its voltage-dependent gating by altering the membrane electric field. Biophys J 74, 2953-2962.
- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T., and Hedrich, R.** (1999). AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 7581-7586.
- Maser, P., Gierth, M., and Schroeder, J.I.** (2002a). Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. Plant Soil 247, 43-54.

- Maser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E.P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J.I., and Uozumi, N.** (2002b). Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 6428-6433.
- Mendelsohn, A.R., and Brent, R.** (1999). Protein interaction methods--toward an endgame. Science 284, 1948-1950.
- Mian, A., Oomen, R.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J., and Very, A.A.** (2011). Over-expression of an Na⁺-and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. Plant J 68, 468-479.
- Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K.** (1983). Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society 218, 481-484.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., and Wells, D.M.** (2007). Nitrate transport and signalling. J Exp Bot 58, 2297-2306.
- Moller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coates, J.C., Haseloff, J., and Tester, M.** (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. Plant Cell 21, 2163-2178.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., and Serrano, R.** (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. Mol Cell Biol 19, 3328-3337.
- Neher, E.** (1975). Ionic Specificity of Gramicidin Channel and Thallous Ion. Biochimica Et Biophysica Acta 401, 540-544.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., and Rubio, F.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. Mol Plant 3, 326-333.
- 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.H., Jensen, J.K., and Halkier, B.A.** (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. Nucleic Acids Research 34, -.
- Okamoto, N., Imai, Y., Shoun, H., and Shiro, Y.** (1998). Site-directed mutagenesis of the conserved threonine (Thr243) of the distal helix of fungal cytochrome P450_{nor}. Biochemistry 37, 8839-8847.

- Owen, T.P., Lennon, K.A., Santo, M.J., and Anderson, A.N.** (1999). Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. Ann Bot-London 84, 459-466.
- Pavlovic, A., Demko, V., and Hudak, J.** (2010). Trap closure and prey retention in Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) temporarily reduces photosynthesis and stimulates respiration. Ann Bot 105, 37-44.
- Penner, R., and Neher, E.** (1988). The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. J Exp Biol 139, 329-345.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.X., Luan, S., Maser, P., Pantoja, O., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Very, A.A., Zhu, J.K., Dennis, E.S., and Tester, M.** (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. Trends Plant Sci 11, 372-374.
- Plett, D., Safwat, G., Gilliam, M., Skrumsager Moller, I., Roy, S., Shirley, N., Jacobs, A., Johnson, A., and Tester, M.** (2010). Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1;1. PLoS One 5, e12571.
- Poppinga, S., and Joyeux, M.** (2011). Different mechanics of snap-trapping in the two closely related carnivorous plants *Dionaea muscipula* and *Aldrovanda vesiculosa*. Phys Rev E 84.
- Punzo, F.** (1989). Composition of the Hemolymph of Mygalomorph Spiders (Orthognatha). Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology 93, 757-760.
- Punzo, F.** (1990). The Hemolymph Composition and Neurochemistry of the Spider Wasp, *Pepsis-Formosa* (Say) (Hymenoptera, Pompilidae). Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology 96, 341-345.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J., and Schachtman, D.P.** (2008). The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. J Exp Bot 59, 595-607.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K.** (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 8436-8441.
- Rea, P.A.** (1982). Fluid Composition and Factors That Elicit Secretion by the Trap Lobes of *Dionaea-Muscipula* Ellis. Z Pflanzenphysiol 108, 255-272.
- Rea, P.A.** (1983). The Dynamics of H⁺ Efflux from the Trap Lobes of *Dionaea-Muscipula* Ellis (Venus-Flytrap). Plant Cell Environ 6, 125-134.

- Rea, P.A., and Whatley, F.R.** (1983). The Influence of Secretion Elicitors and External Ph on the Kinetics of D-Alanine Uptake by the Trap Lobes of *Dionaea-Muscipula* Ellis (Venus Flytrap). Planta 158, 312-319.
- Rea, P.A., Joel, D.M., and Juniper, B.E.** (1983). Secretion and Redistribution of Chloride in the Digestive Glands of *Dionaea-Muscipula* Ellis (Venus Flytrap) Upon Secretion Stimulation. New Phytologist 94, 359-366.
- Rivadavia, F., Kondo, K., Kato, M., and Hasebe, M.** (2003). Phylogeny of the sundews, *Drosera* (Droseraceae), based on chloroplast *rbcL* and nuclear 18S ribosomal DNA Sequences. Am J Bot 90, 123-130.
- Roberts, P.R., and Oosting, H.J.** (1958). Responses of Venus Fly Trap (*Dionaea-Muscipula*) to Factors Involved in Its Endemism. Ecol Monogr 28, 194-218.
- Robins, R.J.** (1976). Nature of Stimuli Causing Digestive Juice Secretion in *Dionaea-Muscipula* Ellis (Venus Flytrap). Planta 128, 263-265.
- Robins, R.J., and Juniper, B.E.** (1980a). The Secretory Cycle of *Dionaea-Muscipula* Ellis .1. The Fine-Structure and the Effect of Stimulation on the Fine-Structure of the Digestive Gland-Cells. New Phytologist 86, 279-&.
- Robins, R.J., and Juniper, B.E.** (1980b). The Secretory Cycle of *Dionaea-Muscipula* Ellis .2. Storage and Synthesis of the Secretory Proteins. New Phytologist 86, 297-&.
- Rodriguez-Navarro, A.** (2000). Potassium transport in fungi and plants. Bba-Rev Biomembranes 1469, 1-30.
- Rodriguez-Navarro, A., and Rubio, F.** (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. J Exp Bot 57, 1149-1160.
- Roelfsema, M.R., Levchenko, V., and Hedrich, R.** (2004). ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. Plant J 37, 578-588.
- Rubio, F., Gassmann, W., and Schroeder, J.I.** (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science 270, 1660-1663.
- Rubio, F., Schwarz, M., Gassmann, W., and Schroeder, J.I.** (1999). Genetic selection of mutations in the high affinity K⁺ transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. J Biol Chem 274, 6839-6847.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Aleman, F., and Martinez, V.** (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. Physiol Plant 134, 598-608.

- Rubio, F., Fon, M., Rodenas, R., Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Rivero, R.M., and Martinez, V.** (2014). A low K signal is required for functional high-affinity K uptake through HAK5 transporters. Physiol Plant.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. P Natl Acad Sci USA 74, 5463-5467.
- Santa-Maria, G.E., Danna, C.H., and Czibener, C.** (2000). High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. Plant Physiol 123, 297-306.
- Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I.** (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370, 655-658.
- Scherzer, S., Krol, E., Kreuzer, I., Kruse, J., Karl, F., von Ruden, M., Escalante-Perez, M., Muller, T., Rennenberg, H., Al-Rasheid, K.A., Neher, E., and Hedrich, R.** (2013). The *Dionaea muscipula* ammonium channel DmAMT1 provides NH₄⁽⁺⁾ uptake associated with Venus flytrap's prey digestion. Curr Biol 23, 1649-1657.
- Scherzer, S., Böhm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., Bemm, F., Al-Rasheid, K.A.S., Shabala, S., Rennenberg, H., Neher, E., and Hedrich, R.** (2015). Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. Proceedings of the National Academy of Sciences. vol.112, no.23, 7309-7314
- Schroeder, J.I., Ward, J.M., and Gassmann, W.** (1994). Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23, 441-471.
- Schulze, W., Schulze, E.D., Schulze, I., and Oren, R.** (2001). Quantification of insect nitrogen utilization by the venus fly trap *Dionaea muscipula* catching prey with highly variable isotope signatures. Journal of Experimental Botany 52, 1041-1049.
- Schulze, W.X., Sanggaard, K.W., Kreuzer, I., Knudsen, A.D., Bemm, F., Thogersen, I.B., Brautigam, A., Thomsen, L.R., Schliesky, S., Dyrlund, T.F., Escalante-Perez, M., Becker, D., Schultz, J., Karring, H., Weber, A., Hojrup, P., Hedrich, R., and Enghild, J.J.** (2012). The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. Mol Cell Proteomics 11, 1306-1319.
- Schwab, D.W., Simmons, E., and Scala, J.** (1969). Fine Structure Changes during Function of Digestive Gland of Venuss-Flytrap. Am J Bot 56, 88-&.
- Selbach, M., and Mann, M.** (2006). Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). Nat Methods 3, 981-983.
- Shabala, S.** (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. Ann Bot-London 112, 1209-1221.

- Sharma, T., Dreyer, I., and Riedelsberger, J.** (2013). The role of K(+) channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in plant science 4, 224.
- Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., and Yan, X.** (2006). Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. J Exp Bot 57, 1353-1362.
- Sheng, S., Bruns, J.B., and Kleyman, T.R.** (2004). Extracellular histidine residues crucial for Na⁺ self-inhibition of epithelial Na⁺ channels. J Biol Chem 279, 9743-9749.
- Sheng, S.H., and Kleyman, T.R.** (2003). External Cd²⁺ accessibility of introduced sulfhydryl groups at the selectivity filter of the epithelial Na⁺ channel. Biophys J 84, 530a-530a.
- Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 8827-8832.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R., and Lewis, B.D.** (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. J Gen Physiol 113, 909-918.
- Stuhmer, W., Methfessel, C., Sakmann, B., Noda, M., and Numa, S.** (1987). Patch clamp characterization of sodium channels expressed from rat brain cDNA. Eur Biophys J 14, 131-138.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H.Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I., and Uozumi, N.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. Plant J 44, 928-938.
- Takahashi, K., Suzuki, T., Nishii, W., Kubota, K., Shibata, C., Isobe, T., and Dohmae, N.** (2011). A Cysteine Endopeptidase ("Dionain") Is Involved in the Digestive Fluid of *Dionaea muscipula* (Venus's Fly-trap). Biosci Biotech Bioch 75, 346-348.
- Takeuchi, A., and Takeuchi, N.** (1971). Anion interaction at the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. J Physiol 212, 337-351.
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. Science 237, 770-775.
- Tester, M., and Zorec, R.** (1992). Cytoplasmic calcium stimulates exocytosis in a plant secretory cell. Biophys J 63, 864-867.
- Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J.I., and Muto, S.** (1998). Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis*

- thaliana based on functional expression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 9773-9778.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., and Schroeder, J.I.** (2000). The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na(+) currents in *xenopus laevis* oocytes and Na(+) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiol 122, 1249-1259.
- Vale, F.R., Volk, R.J., and Jackson, W.A.** (1988). Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize roots: kinetics and interactions. Planta 173, 424-431.
- Vieira-Pires, R.S., Szollosi, A., and Morais-Cabral, J.H.** (2013). The structure of the KtrAB potassium transporter. Nature 496, 323-328.
- Volkov, A.G., Adesina, T., and Jovanov, E.** (2007). Closing of venus flytrap by electrical stimulation of motor cells. Plant Signal Behav 2, 139-145.
- Volkov, A.G., Adesina, T., Markin, V.S., and Jovanov, E.** (2008). Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. Plant Physiology 146, 694-702.
- Volkov, A.G., Pinnock, M.R., Lowe, D.C., Gay, M.S., and Markin, V.S.** (2011). Complete hunting cycle of *Dionaea muscipula*: Consecutive steps and their electrical properties. J Plant Physiol 168, 109-120.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. Plant Journal 40, 428-438.
- Weber, W.M.** (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. J Membr Biol 170, 1-12.
- Weinmaster, G., Zoller, M.J., Smith, M., Hinze, E., and Pawson, T.** (1984). Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus: evidence that tyrosine phosphorylation of P130gag-fps modulates its biological activity. Cell 37, 559-568.
- Williams, S.E., and Bennett, A.B.** (1982). Leaf Closure in the Venus Flytrap - an Acid Growth-Response. Science 218, 1120-1122.
- Wu, J.** (1991). Microscopic model for selective permeation in ion channels. Biophys J 60, 238-251.
- Wu, J.V.** (1992). Dynamic ion-ion and water-ion interactions in ion channels. Biophys J 61, 1316-1331.

- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. Cell 125, 1347-1360.
- Xue, S.W., Yao, X., Luo, W., Jha, D., Tester, M., Horie, T., and Schroeder, J.I.** (2011). AtHKT1;1 Mediates Nernstian Sodium Channel Transport Properties in Arabidopsis Root Stellar Cells. PLoS One 6.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R.** (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. Mol Cell Biol 25, 8683-8692.
- Yuan, L., Loque, D., Ye, F., Frommer, W.B., and von Wieren, N.** (2007). Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. Plant Physiol 143, 732-744.
- Zhang, J.H., Jia, W.S., Yang, J.C., and Ismail, A.M.** (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crop Res 97, 111-119.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and MacKinnon, R.** (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature 414, 43-48.

7. Anhang

7.1 Anhang A: Auflistung der Genbank-Nummern der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Transportproteine

Trivialnamen	Genbank (Accession)-Nummer
HAK/KUP/KT-Familie	
DmHAK5	LN715172
AtHAK5	At4g13420
AtKUP1/AtKT1	At2g30070
AtKUP2/AtKT2	At2g40540
AtKUP3/AtKT4	At3g02050
AtKUP4/AtTRH1/AtKT3	At4g23640
AtKUP5/AtKT5	At4g33530
AtKUP6/AtHAK6/AtKT6	At1g70300
AtKUP7/AtHAK7/AtKT7/AtPOT7	At5g09400
AtKUP8/AtHAK8/AtKT8	At5g14880
AtKUP9/AtHAK9/AtKT9	At4g19960
AtKUP10/AtHAK10/AtKT10	At1g31120
AtKUP11/AtHAK11/AtKT11	At2g35060
AtKUP12/AtHAK12/AtKT12	At1g60160
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc04g008450
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc12g005670
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc09g074820
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc12g096580
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc02g031840
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc08g015680
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc06g050170
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc02g068590
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc03g097860
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc05g005740
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc09g074790
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc04g025990
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc12g005680
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc04g025880
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc12g017910
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc02g087000
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc06g051830
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc01g105150
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc09g074800

putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc10g047270
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Solyc05g005720
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01013617001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01012114001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01020263001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01010951001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01020219001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01024703001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01010949001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01010956001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01008480001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01010950001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01011951001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01019445001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01032959001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01032701001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01038736001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01032503001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01020217001
putativer HAK/KUP/KT Transporter	GSVIVG01011572001
OsHAK1	Os04g32920
OsHAK2	Os01g70940
OsHAK3	Os01g27170
OsHAK4	Os08g36340
OsHAK5	Os01g70490
OsHAK6	Os01g70660
OsHAK7	Os07g47350
OsHAK8	Os03g21890
OsHAK9	Os07g48130
OsHAK10	Os06g42030
OsHAK11	Os04g52390
OsHAK13	Os06g45940
OsHAK14	Os07g32530
OsHAK15	Os04g52120
OsHAK16	Os03g37840
OsHAK17	Os09g27580
OsHAK18	Os09g38960
OsHAK19	Os02g31910
OsHAK20	Os02g31940
OsHAK21	Os03g37930

OsHAK22	Os07g01214
OsHAK23	Os09g21000
OsHAK24	Os06g15910
OsHAK25	Os02g49760
OsHAK26	Os08g39950
OsHAK27	Os03g37830
putativer HAK/KUP/KT Transporter	Os08g10550
Pflanzliche <i>Shaker</i>-Kaliumkanäle	
DmKT1	LN715171
AtAKT1	At2g26650
AtAKT2/AtAKT3	At4g22200
AtAKT5	At4g32500
AtAKT6/AtSPIK	At2g25600
AtGORK	At5g37500
AtKAT1	At5g46240
AtKAT2	At4g18290
AtKC1/AtAKT4/AtKAT3	At4g32650
AtSKOR	At3g02850
LeKT1	Solyc12g006850
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc01g010080
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc05g051220
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc11g011500
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc02g070530
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc01g104030
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc08g068000
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc10g024360
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc08g066990
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc08g016500
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	Solyc03g097940
VvK1.1	GSVIVG01015479001
VvK1.2	GSVIVG01035801001
VvK2.1/VvSIRK	GSVIVG01021445001
VvK3.1	GSVIVG01022866001
VvK4.1	GSVIVG01035748001
VvK5.1/VvSOR	GSVIVG01030667001
VvK5.2	GSVIVG01015593001
VvK5.4	GSVIVG01008475001
putativer AKT/SKOR/GORK Kanal	GSVIVG01037093001
OsAKT1.1	Os01g45990
OsAKT1.2	Os07g07910

OsAKT2	Os05g35410
OsGORK	Os04g36740
OsKAT1	Os01g55200
OsKAT2	Os01g11250
OsKAT3	Os02g14840
OsKC1.1	Os01g52070
OsKC1.2	Os04g02720
OsKC1.3	Os06g14310
OsSKOR	Os06g14030
HKT-Transporter-Familie	
DmHKT1	Kt223138
AtHKT1	At4g10310
SIHKT1.1	Solyc07g014690
SIHKT1.2	Solyc07g014680
putativer HKT-Transporter	GSVIVG01010932001
putativer HKT-Transporter	GSVIVG01010937001
putativer HKT-Transporter	GSVIVG01010921001
putativer HKT-Transporter	GSVIVG01010919001
putativer HKT-Transporter	GSVIVG01010922001
OsHKT1.1	Os04g51820
OsHKT1.3	Os02g07830
OsHKT1.4	Os04g51830
OsHKT1.5	Os01g20160
OsHKT2.1	Os06g48810
OsHKT2.3	Os01g34850
OsHKT2.4	Os06g48800

7.3 Anhang C: Lösungen und Puffer

mRNA-Isolierung

Bindepuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8

1 M LiCl

2 mM EDTA, pH 8

in ddH₂O

Wasch-Puffer B

100 mM Tris-HCl, pH 8

150 mM LiCl

1 mM EDTA, pH 8

in ddH₂O

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

40 mM Tris

40 mM Essigsäure

1 mM Na-EDTA

in ddH₂O

5x DNA-Probenpuffer

50 % Glycerin (w/v)

100 mM EDTA

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

0,25 % Xylen Cyanol FF (w/v)

Medien zum Klonieren

LB (Luria-Broth) Ampicillin Kulturmedium

10 g/l NaCl

10 g/l Trypton

5 g/l Yeast Extract

Ampicillin 50 µg/ml

in ddH₂O

LB-Ampicillin-Selektions-Agarplatten

Agar Agar (Applichem / Peqlab) 2 %
in LB Medium autoklaviert;
Ampicillin zugegeben 50 µg/ml
und in Petrischalen gegossen;
Bei 4°C im Kühlraum gelagert.

SOB-Medium

0,5 g/l NaCl
5 g/l MgSO₄ x 7H₂O
20 g/l Trypton
5 g/l Yeast Extract
in ddH₂O

SOC-Medium

20 mM Glukose in SOB-Medium

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
in ddH₂O

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

RNA-Probenpuffer

100 µl 1x MEN-Puffer
175 µl Formaldehyd (37 %)
500 µl Formamid
25 µl DNA-Probenpuffer
200 µl ddH₂O

1x MEN-Puffer

20 mM MOPS
50 mM Na-Acetat
5 mM Na-EDTA

7.4 Anhang D: Primer

DmKT1:

DmKT1 fwd 5'-ATG GGG AGG AAA GGG GCA G-3'

DmKT1 rev 5'-TCA CCA GCC ACC TGC TGG C-3'

DmKT1 user fwd (USER 5'-GGCTTAAU ATG GGG AGG AAA GGG GCA G-3'
Klonierung)

DmKT1 user rev (USER 5'-GGTTTAAU TCA CCA GCC ACC TGC TGG C-3'
Klonierung)

DmKT1 user oS rev (USER 5'-GGTTTAAU CCC CAG CCA CCT GCT GGC-3'
Klonierung)

DmHAK5:

DmHAK5 fwd 5'-ATG GAG AAT TCG AAT CAA CAA A-3'

DmHAK5 rev 5'-CTA GAG CTC GTA AGT CAT GCC-3'

DmHAK5 user fwd (USER 5'-GGCTTAAU ATG GAG AAT TCG AAT CAA CAA A-3'
Klonierung)

DmHAK5 user rev (USER 5'-GGTTTAAU CTA GAG CTC GTA AGT CAT GCC-3'
Klonierung)

DmHAK5 user oS rev (USER 5'-GGTTTAAU CCG AGC TCG TAA GTC ATG C-3'
Klonierung)

DmHAK5.4 GSP2 fwd (SMART 5'-CAG CTC GAT CAA ACC TTT GTC GCA TTC-3'
RACE)

DmHAK5.4 GSP2 nest fwd 5'-GCG GCC AGT ATT CCC GCT-3'
(SMART RACE)

DmHKT1:

DmHKT1 fwd 5'-ATG TTG AGT TGC TAC ATA CCT C-3'

DmHKT1 rev 5'-TTA CTC TAA CTT CCA AGC TTT GC-3'

DmHKT1 user fwd (USER 5'-GGCTTAAU ATG TTG AGT TGC TAC ATA CCT C-3'
Klonierung)

DmHKT1 user rev (USER 5'-GGTTTAAU TTA CTC TAA CTT CCA AGC TTT GC-3'
Klonierung)

DmHKT1 Mutagenese-Primer

DmHKT1 S84A user fwd 5'-ACTGTCTCAGCCAU GTC CAC GGT CGA GAT GGA GG-3'

DmHKT1 S84A user rev 5'-ATGGCTGAGACAGU GGC AGA GGA CAC GGA CAT AAA G-
3'

DmHKT1 S84G user fwd 5'-ACTGTCTCAGGCAU GTC CAC GGT CGA GAT GGA GG-3'

DmHKT1 S84G user rev 5'-ATGCCTGAGACAGU GGC AGA GGA CAC GGA CAT AAA G-
3'

DmHKT1 T142A user fwd 5'-AGGATCGCCCCU GAG GAT TTG AAC CAT GTT GAG ATG-
3'

DmHKT1 T142A user rev	5'-AGGGGCGATCCU AGC AAG AGC ATC TAC TCT ATA TTT TGT TTG-3'
DmHKT1 Y176A user fwd	5'-AAGGCCAATU CCC GCA AAG TCC TTG TCC TT-3'
DmHKT1 Y176A user rev	5'-AATTGGCCTU GAC ATC TTG AGC TTG TGA GGG TT-3'
DmHKT1 Y292A user fwd	5'-AGTGCGGGGCCCU CTC GAG CAA TGG TGA TGA GAT-3'
DmHKT1 Y292A user rev	5'-AGGGCCCCGCACU CGT GCT TCC TCC AAA ACT TC-3'
DmHKT1 T142D user fwd	5'-AGGATCGACCCU GAG GAT TTG AAC CAT GTT GAG ATG- 3'
DmHKT1 T142D user rev	5'-AGGGTCGATCCU AGC AAG AGC ATC TAC TCT ATA TTT TGT TTG-3'
DmHKT1 Y176D user fwd	5'-AAGGACAATU CCC GCA AAG TCC TTG TCC TT-3'
DmHKT1 Y176D user rev	5'-AATTGTCCTU GAC ATC TTG AGC TTG TGA GGG TTC-3'
DmHKT1 Y292D user fwd	5'-AGTGCGGGGACCU CTC GAG CAA TGG TGA TGA GAT TG- 3'
DmHKT1 Y292D user rev	5'-AGGTCCCCGCACU CGT GCT TCC TCC AAA ACT TCC-3'

7.5 Anhang E: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Phylogenetische Einordnung der karnivoren Pflanzenfamilien innerhalb der Angiospermen	2
Abbildung 1-2: Klappfalle einer <i>Dionaea muscipula</i>	6
Abbildung 1-3: Kaliumaufnahmemodule in <i>Arabidopsis</i> Wurzeln	26
Abbildung 1-4: Schema der beiden Modelle zur physiologischen Funktion von AtHKT1	30
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik	56
Abbildung 2-2: Standard-Spannungspuls-Protokolle zur Messung der <i>Dionaea</i> Transportproteine	59
Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung von DmKT1	73
Abbildung 3-2: Phylogenetischer Stammbaum von HAK/KUP/KT-Transportproteinen	75
Abbildung 3-3: Expressionsanalysen des K ⁺ -Kanals DmKT1 und der <i>Dionaea</i> Orthologen zu AtCIPK23 und AtCBL9	77
Abbildung 3-4: Aktivierung des <i>Dionaea</i> -Transportproteins DmKT1 durch den aus <i>Arabidopsis</i> stammenden Sensor/Kinasen-Komplex	79
Abbildung 3-5: Stromantworten von DmKT1 bei variierenden externen Kaliumkonzentrationen	80
Abbildung 3-6: Selektivität von DmKT1	81
Abbildung 3-7: Gleichgewichtsströme von DmKT1 bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen	82
Abbildung 3-8: Bestimmung der relativen P ₀ und der halbmaximalen Aktivierungsspannung	83
Abbildung 3-9: DmKT1 vermittelt keine Kaliumauswärtsströme	85
Abbildung 3-10: Bestimmung der rel. P ₀ bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen	85
Abbildung 3-11: Bestimmung der „cord conductance“ von DmKT1	86
Abbildung 3-12: Gewebs-spezifische Expression und Induktion von DmHAK5	89
Abbildung 3-13: Aktivierung von DmHAK5 durch einen CBL/CIPK Ca ²⁺ -Sensor/Kinase-Komplex	90
Abbildung 3-14: Interaktion des AtCBL9/AtCIPK23-Komplexes mit DmHAK5 aktiviert den Kaliumtransport	91
Abbildung 3-15: Selektivität des Transporters DmHAK5	92
Abbildung 3-16: DmHAK5 vermittelt einen hoch-affinen Kaliumtransport	93
Abbildung 3-17: Transportverhalten von DmHAK5 in Natrium- und Ammoniumlösungen	94
Abbildung 3-18: pH-Abhängigkeit von DmHAK5	95
Abbildung 3-19: Intrazelluläre Ansäuerung führt zu verminderten Strömen	96

Abbildung 3-20: Temperaturabhängigkeit von DmHAK5.....	97
Abbildung 3-21: K ⁺ -abhängige Membranpotentialänderungen in <i>Dionaea</i> Drüsen im Vergleich zu K ⁺ -abhängigen Stromantworten in DmKT1/DmHAK5 koexprimierenden Oozyten.....	99
Abbildung 3-22: Natriumaufnahme von sekretierenden Venusfliegenfallen	100
Abbildung 3-23: Phylogenetische Klassifizierung von DmHKT1	102
Abbildung 3-24: Gewebs-spezifische Expression von DmHKT1 nach Stimulierung der Sekretion.....	103
Abbildung 3-25: Stromantwort und Depolarisation von DmHKT1 exprimierenden Oozyten	104
Abbildung 3-26: Selektivität von DmHKT1 der Venusfliegenfalle	105
Abbildung 3-27: Der Einfluss von H ⁺ und der Temperatur auf den DmHKT1 vermittelten Na ⁺ -Strom	106
Abbildung 3-28: Die Mutation S84G führt zu einer Kalium- und Natriumleitfähigkeit von DmHKT1	109
Abbildung 3-29: Messung des anormalen Molfraktionseffekts (AMFE) der S84G Mutante .	110
Abbildung 3-30: Selektivität der Mutante S84A.....	110
Abbildung 3-31: Veränderung putativer Phosphorylierungsstellen im DmHKT1 Protein.....	112
Abbildung 4-1: Homologiemodell der DmHKT1 Pore	131
Abbildung 4-2: Schema zum Beutefang und –verdau in <i>Dionaea muscipula</i>	136

7.6 Anhang F: Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: PCR-Zyklen der 5`- und 3`-RACE PCR	38
Tabelle 2-2: PCR-Temperaturprogramm der 5`- und 3`-Nested-RACE PCR	39
Tabelle 2-3: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei Amplifikation der CDS	40
Tabelle 2-4: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei einer IVT-PCR.....	41
Tabelle 2-5: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren zur Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	48
Tabelle 2-6: Zusammensetzung der ND96-Lösung	53
Tabelle 3-1: Auflistung der identifizierten und klonierten Transportproteine aus <i>Dionaea</i> Fallen.	72

7.7 Anhang G: Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten physikalischen Größen entsprechen den gängigen SI-Einheiten und sind somit im Abkürzungsverzeichnis nicht weiter erklärt. Im Folgenden sind Abkürzungen beschrieben, die im Text nicht in ausführlicher Form erwähnt werden.

ABA	Abscisinsäure
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	komplementäre RNA (complementary RNA)
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alteres (lat.: und andere)
k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	nano (10^{-9})
P	Porendomäne
pH	negativer Logarithmus der H^+ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure (ribonuclein acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
TM	Transmembrane
SD	Standardabweichung (standard deviation)
UV	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp
μ	mikro (10^{-6})

Aminosäuren (aa)

A	Ala	Alanin
D	Asp	Asparaginsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
N	Asn	Asparagin
R	Arg	Arginin

S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
Y	Tyr	Tyrosin

8.2 Publikationsliste

Imes D.*, Mumm P.*, **Böhm J.**, Al-Rasheid K. A. S., Marten I., Geiger D. and Hedrich R. (2013). „Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells” The Plant Journal 74, 372-382, doi: 10.1111/tpj. 12133

Scherzer S.*, **Böhm J.***, Krol E., Shabala L., Kreuzer I., Larisch C., Bemm F., Al-Rasheid K. A. S., Shabala S., Rennenberg H., Neher E., and Hedrich R. (2015). „Calcium sensor kinase activates potassium uptake system in gland cells of Venus flytraps” PNAS vol. 112, no. 23, 7309-7314, doi: 10.1073/pnas.1507810112

Böhm J.*, Scherzer S.*, Shabala S., Krol E., Neher E., Müller T. and Hedrich R. (accepted 2015/09). „Venus flytrap HKT1-type channel provides for prey sodium uptake into carnivorous plant without conflicting with electrical excitability” Molecular Plant

In Revision:

Böhm J.*, Scherzer S.*, Krol E., Kreuzer I., Shabala L., von Meyer K., Shabala S., Al-Rasheid K. A. S., Rennenberg H., Müller T., Neher E. and Hedrich R. (in Revision). „*Dionaea muscipula* a plant that counts – prey induced action potentials control nutrient and osmolite uptake of the Venus flytrap” Current Biology

* Autoren sind gleichberechtigt

9. Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

9.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ich habe bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den.....

.....

Jennifer Böhm

9.2 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erst möglich wurde. Mein besonderer Dank gilt daher:

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Bereitstellung der interessanten Thematik, der Betreuung meiner Doktorarbeit und für die zahlreichen, sehr anregenden Diskussionen. Besonderen Dank möchte ich für die großartige Unterstützung meiner beruflichen Laufbahn aussprechen.

Frau Prof. Dr. Petra Dietrich für die Zweitbegutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Geiger für seine grenzenlose Unterstützung und für jedes offene Ohr. Danke für die unglaubliche Geduld, die vielen Gespräche, die Ruhe und das nächtliche Korrekturlesen. Danke, dass ich mich in den letzten Monaten deine Tischnachbarin nennen durfte.

Ich möchte mich besonders bei allen Personen bedanken, die diese Dissertation durch zusätzliche Versuche, Daten und Materialien erweitert und abgerundet haben. Danke an Dr. Christina Larisch, Katharina von Meyer, Dr. Elzbieta Król, Dr. Sönke Scherzer, Prof. Heinz Rennenberg, Christian Lorey und Prof. Jörg Kudla.

Allen Mitarbeitern des Instituts und vor allem dem „Venusfliegenfallen-Team“ für die große Hilfsbereitschaft und die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre. Ein besonderer Dank geht an Matze, der einem in vielen organisatorischen Fragen zur Seite stand und den „Papierkram“ erleichterte.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich der „alten“ und „neuen“ AG Geiger aussprechen. Durch eure Unterstützung *„All my troubles seemed so far away“*. Danke für die wunderschöne Zeit, den Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft und den gemeinsamen Spass. Eure motivierenden Worte zeigten mir immer *„There will be an answer“*.

Meinen Freunden und meiner Familie, die mir stets beistanden und mich in Höhen und Tiefen begleiteten. Mama, danke für Alles und die wunderbaren 30 Jahre.

Sönke, ich danke dir von ganzem Herzen, dass du mir immer zur Seite stehst. Ich bin unglaublich glücklich, dass du in mein Leben getreten bist.