

**Eine vergleichende biophysikalische Analyse von Hitze- und
Trockentoleranzstrategien der Wüstenpflanze *Phoenix
dactylifera* und Nutzpflanzen der gemäßigten Klimazonen**



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

vorgelegt von
Nadine Schäfer
aus Würzburg

Würzburg 2019

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

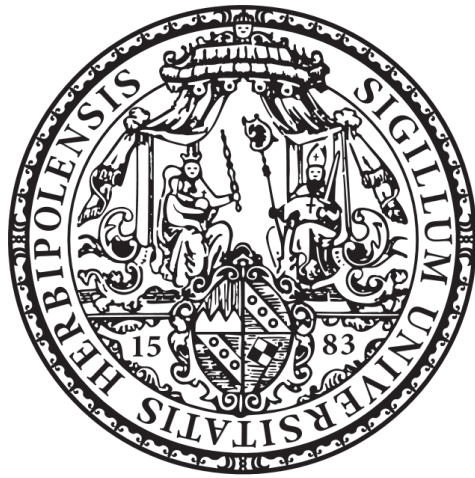
1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Geiger

2. Gutachter: Prof. Dr. Arthur Korte

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Eine vergleichende biophysikalische Analyse von Hitze- und
Trockentoleranzstrategien der Wüstenpflanze *Phoenix
dactylifera* und Nutzpflanzen der gemäßigten Klimazonen**



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

vorgelegt von
Nadine Schäfer
aus Würzburg

Würzburg 2019

Zusammenfassung

Der Klimawandel geht einher mit einem Anstieg der globalen Durchschnittstemperatur und einem dadurch induzierten Wassermangel. Diese beiden abiotischen Stressfaktoren führen zu einer Reduzierung der landwirtschaftlichen Erträge und Biomassen von Kulturpflanzen. Daher ist eine Anpassung der betroffenen Pflanzenarten an das sich ändernde Klima erforderlich, um die landwirtschaftliche Produktivität in Zukunft aufrechtzuerhalten. Gegenwärtig ist unser Wissen über Strategien zur Toleranz gegenüber abiotischem Stress sowie über Genom- und Transkriptionsinformationen auf wenige Modellorganismen von Angiospermen beschränkt, so dass diese Informationen die Basis für die Forschung an Trockenheit und Hitzestress darstellen. Die Untersuchung der Stressadaptation innerhalb und zwischen verschiedenen Pflanzengattungen ist von besonderer Relevanz. Vor diesem Hintergrund habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit die Überlebensstrategie der extremophilen Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* (Dattelpalme) im Vergleich zu zwei Mesophilen, der Kulturpflanze *Hordeum vulgare* (Gerste) und der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, untersucht.

Dattelpalmen sind nicht sukkulente Wüstenpflanzen, die auch unter extremen Trocken- und Hitzebedingungen in den Wüsten der Arabischen Halbinsel wachsen und ertragreich Früchte produzieren. In *Phoenix dactylifera* ist bislang weder die Molekularbiologie und –physiologie der Schließzellen, vor allem der Anionenkanäle, verstanden, noch wurde der Hitzeschutz ihrer Zuckertransportproteine untersucht.

Um die stomatäre Reaktion auf das Trockenstresshormon ABA (Abscisinsäure) zu verstehen, klonierten wir die Hauptkomponenten des schnellen ABA-Signalwegs von Schließzellen und analysierten den Öffnungsmechanismus der Anionenkanäle aus der Dattelpalme und der Gerste vergleichend zu dem Anionenkanal aus *Arabidopsis* im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten. Beide monokotyledonen Pflanzenarten (Gerste und Dattelpalme) besitzen stomatäre Komplexe, die aus Schließzellen und Nebenzellen bestehen. Dies unterscheidet die Monokotyledonen von den Dikotyledonen, die normalerweise Stomakomplexe aufweisen, die nur aus einem Paar Schließzellen gebildet werden. Interessanterweise schlossen sich Dattelpalmen- und Gerstenstomata als Reaktion auf das Trockenstresshormon ABA nur in Gegenwart von extrazellulärem Nitrat.

Der heterolog-exprimierte Anionenkanal PdSLAC1 wird durch die ABA-Kinase PdOST1 aktiviert und diese Aktivierung wird durch die Koexpression der PP2C-Phosphatase AB11 gehemmt. Daher wird PdSLAC1 wie seine Orthologen aus Gerste und *Arabidopsis* durch ein ABA-abhängiges Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsnetzwerk gesteuert. PdOST1 aktivierte den Anionenkanal PdSLAC1 jedoch nur in Gegenwart von extrazellulärem Nitrat - eine elektrische Eigenschaft, die PdSLAC1 mit HvSLAC1 der Gerste gemein hat, sich jedoch von AtSLAC1 unterscheidet. Angesichts der Tatsache, dass in Gegenwart von Nitrat ABA den

Stomaschluss verstärkt und beschleunigt, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei Dattelpalmen und Gerste Nitrat als Ligand zum Öffnen von SLAC1 benötigt wird. Dies initiiert die Depolarisation der Schließzellen und leitet schließlich den Stomaschluss ein, um den Wasserverlust der Pflanzen unter Trockenstressbedingungen zu minimieren.

Um die monokotyledone spezifische Nitratabhängigkeit von SLAC1 zu verstehen, führten wir ortsgerechte Mutagenesestudien auf Basis eines 3D-Modells durch, welche zudem vergleichende Studien an Chimären von Monokotylen- und Dikotylen-SLAC1 Anionenkanälen umfassten. Unsere Struktur-Funktions-Forschung identifizierte zwei Aminosäurenreste auf der Transmembrandomäne 3 (TMD3), die eine wesentliche Rolle bei der Nitrat-abhängigen Regulierung von SLAC1 Anionenkanälen monokotyledoner Pflanzen spielen. Die phylogenetische Analyse ergab schließlich, dass während der Evolution die für Monokotyledonen spezifische Nitrat-abhängige Regulierung erst nach der Trennung in Monokotyledonen und Dikotyledonen auftrat. Durch die Nitrat-sensitive Regulierung von SLAC1 Anionenkanälen beruht der schnelle Stomaschluss von Monokotyledonen auf dem Zusammenspiel des Trockenstresshormons ABA und dem Stickstoffhaushalt der Pflanze. Da der ABA-Signalweg von Arabidopsis umfassend untersucht wurde, könnte die Entdeckung des monokotyledonen spezifischen Nitrat-abhängigen Motivs in TMD3 nun als Stellschraube zur Verbesserung der Züchtungsprogramme dikotyledoner Nutzpflanzen dienen.

Wüstenpflanzen leiden nicht nur unter Trockenheit, sondern auch unter extremem Hitzestress. Wir konnten zeigen, dass hitzebelastete Dattelpalmen große Mengen der flüchtigen Kohlenwasserstoffverbindung Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien) produzieren und emittieren. Durch die vorübergehende Freisetzung von Isopren kann die Pflanze die Photosynthese auch bei extremen Temperaturen betreiben. Es ist jedoch nicht bekannt, ob und wie Isopren in Hitzeperioden auch Transportprozesse durch biologische Membranen schützt. Um den Einfluss von Isopren auf den Transmembrantransport zu untersuchen, identifizierten und klonierten wir den Protonen-gekoppelten Saccharosetransporter 1 (PdSUT1) der Dattelpalme und verglichen seine elektrischen Eigenschaften mit ZmSUT1 (Zea mays Sucrose Transporter 1) im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten. Interessanterweise waren das elektrische Verhalten, die kinetischen Eigenschaften und die Temperaturabhängigkeit beider Transporter ähnlich. Die Anwendung von Isopren veränderte jedoch massiv die Affinität von ZmSUT1 zu seinem Substrat Saccharose, während die Affinität des Transporters der Dattelpalme nur schwach beeinflusst wurde. Es wird angenommen, dass die Membranfluidität unter Hitzestress erniedrigt ist, welches durch Interkalierung von Isopren mit den Fettsäureketten biologischer Membrane einhergeht. Dies und die Unempfindlichkeit von PdSUT1 gegenüber Isopren deuten darauf hin, dass der Saccharosetransporter PdSUT1 aus

der Wüstenpflanze auch bei hohen Temperaturen Saccharose mit hoher Affinität transportiert. Zukünftige Studien müssen nun klären, ob der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren einen direkten Einfluss auf den Transporter selbst hat oder Isopren in die Membran integriert und damit indirekt die Eigenschaften von Transportproteinen beeinflusst. Unabhängig von der Wirkungsweise von Isopren sollte nicht unerwähnt bleiben, dass PdSUT1 gegenüber Isopren weniger empfindlich ist als sein Ortholog ZmSUT1 aus Mais. Dies kann auf eine Anpassung des Saccharosetransporters an die extremen Hitzeperioden und die damit einhergehende Isoprenemission von Dattelpalmen zurückzuführen sein.

Summary

Low water availability and heat stress present major barriers to achieving high biomass and full yield potential in crops. Global climate change is accompanied by a subtle increase in the severity of these abiotic stresses. Thus, the adaptation of crop species to the changing climate is required in order to sustain agricultural productivity in the future. Currently, our knowledge of plant strategies for abiotic stress tolerance as well as genomic and transcriptional information is limited to a few model angiosperms, providing a starting point for the understanding of responses to drought and/or heat stress, within and across species.

In the framework of my PhD thesis, we followed a different strategy to learn about abiotic stress tolerance: we studied the survival strategy of the extremophilic desert plant *Phoenix dactylifera* (date palm) in comparison to the crop *Hordeum vulgare* (barley) and the model plant *Arabidopsis thaliana*, both from temperate zones. Date palms grow and produce fruits even under extreme drought and heat conditions in the deserts of the Arabian Peninsula. Neither the molecular biology and physiology of guard cells nor the heat protection of transport protein mediated sugar and ion transport processes have been studied so far in this non-succulent desert plant, *Phoenix dactylifera*.

To understand the stomatal response to the water stress phytohormone ABA (abscisic acid), we cloned the major components for guard cell fast abscisic acid signaling and analysed the anion channel opening mechanism of the date palm side by side with barley and Arabidopsis in *Xenopus* oocytes. Both monocot plant species (barley and date palm) possess stomatal complexes consisting of guard cells and subsidiary cells. This distinguishes monocot species from dicots, which usually exhibit stomatal complexes formed by a pair of guard cells only. Interestingly, date palm and barley stomata closed in response to the drought stress hormone ABA only in the presence of extracellular nitrate.

Heterologously expressed Phoenix SLAC1-type anion channel PdSLAC1 is activated by the ABA kinase PdOST1 and this activation is inhibited by the coexpression of PP2C phosphatase ABI1 – thus like its counterparts from barley and Arabidopsis, PdSLAC1 is controlled by an ABA-dependent phosphorylation/dephosphorylation network. However, PdOST1 did activate the desert plant anion channel PdSLAC1 only in the presence of extracellular nitrate – an electrical property that PdSLAC1 shares with the barley SLAC1 but distinguishes both monocot SLAC1 channels from AtSLAC1. Given that, in the presence of nitrate, ABA enhanced and accelerated stomatal closure, our findings indicate that the guard cell osmotic motor driving stomatal closure in date palm and barley uses nitrate as the signal to open the major anion channel SLAC1. This initiates guard cell depolarization and finally stomatal closure to prevent plant wilting under drought stress conditions.

To understand the monocot-specific SLAC1 nitrate dependency, we performed a 3D-model-based site-directed mutagenesis study including chimeric channels between monocot and dicot SLAC1 anion channels. Our structure-function research identified two residues on transmembrane domain 3 (TMD3) that play an essential role in nitrate-dependent gating of monocot SLAC1-type anion channels. Phylogenetic analysis finally revealed that during evolution the monocot specific nitrate-dependent gating was established after the split between monocots and dicots. Thus, the success of monocot species may in part rely on the integration of drought signals (ABA) and the nitrogen nutrition status of the plant via nitrate-sensitive gating of SLAC1 anion channels. Since the *Arabidopsis* ABA-signaling pathway has been extensively studied, the discovery of the monocot-specific nitrate dependent motif on TMD3 could now serve as a set screw to improve the breeding programs of dicot agricultural crops.

Desert plants not only suffer from drought but also from extreme heat stress. We could show that heat-stressed date palms produce and emit high amounts of the volatile hydrocarbon compound isoprene (2-Methyl-1,3-Butadien). The temporary release of isoprene allows the plant to perform photosynthesis even under extreme temperatures. However, it is not known whether and how isoprene also protects transport processes across biological membranes in periods of heat. To study the influence of isoprene on transmembrane transport, we identified and cloned the date palm proton-coupled sucrose transporter 1 (PdSUT1) and compared its electrical properties with ZmSUT1 (*Zea mays* Sucrose Transporter 1) in the heterologous expression system of *Xenopus* oocytes. Interestingly, the electrical behavior, the kinetic properties and the temperature dependence of both carriers were similar. However, the response to isoprene application massively altered the affinity of ZmSUT1 to its substrate sucrose while the affinity of the date palm transporter was only weakly affected. The intercalation of isoprene with the fatty acid chains of biological membranes is believed to decrease the membrane fluidity under heat stress. This and the insensitivity of PdSUT1 towards isoprene may indicate that the desert plant sucrose transporter PdSUT1 transports sucrose with high affinity even at high temperatures. Future studies must now clarify whether the volatile hydrocarbon isoprene has a direct influence on the carrier itself or isoprene integrates into the membrane and thus indirectly influences the properties of transport proteins. Regardless of the mode of action of isoprene, it remains to be noted that PdSUT1 is less sensitive to isoprene than its orthologue from maize. This may be an adaptation of the sucrose carrier to the extreme heat periods and the accompanying isoprene emission from date palms.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	STANDORTFAKTOREN ENTSCHEIDEN ÜBER DIE ANPASSUNGSSTRATEGIE DER	1
	PFLANZEN.....	1
1.1.1	DIE WÜSTENPFLANZE PHOENIX DACTYLIFERA	2
1.1.2	DIE GETREIDEPFLANZE HORDEUM VULGARE	4
1.1.3	HITZESTRESS	6
1.1.4	AUFBAU UND FUNKTION VON BIOMEMBRANEN	7
1.1.5	FUNKTION UND BEDEUTUNG DER ISOPRENFREISETZUNG	8
	1.1.5.1 Plastidäre Isoprenoidbiosynthese	10
	1.1.5.2 Physiologische Bedeutung der Isoprenbiosynthese	13
1.1.6	DIE AUSWIRKUNG VON ISOPREN AUF DIE THERMOSTABILITÄT VON MEMBRANEN.....	14
1.1.7	DER EINFLUSS VON HITZE AUF TRANSPORTPROTEINE	16
1.2	SEKUNDÄR AKTIVE TRANSPORTER.....	16
1.2.1	TRANSPORTMECHANISMUS KATIONEN-GEKOPPELTER TRANSPORTER.....	17
1.2.2	PFLANZLICHE SACCHAROSETRANSPORTER	19
1.2.3	DER SACCHAROSE/PROTONEN SYMPORTER ZMSUT1 AUS MAIS	22
1.3	TROCKENSTRESS	25
1.3.1	DIE STOMATA UND IHRE FUNKTION	26
1.3.2	DIE STOMABEWEGUNG	27
1.3.3	STIMULI DER STOMABEWEGUNG.....	28
1.3.4	DIE STOMAÖFFNUNG	29
1.3.5	DER STOMASCHLUSS	30
1.3.6	DAS TROCKENSTRESSHORMON ABA.....	31
1.4	DIE ABA SIGNALTRANSDUKTION	32
1.4.1	DIE BETEILIGUNG VON ANIONKANÄLEN	34
1.4.2	DER S-TYP ANIONENKANAL	35
1.4.3	STRUKTUR DER SLAC1-TYP ANIONENKANÄLE	37
1.5	ZIELSETZUNG	41
2	MATERIAL UND METHODEN	43
2.1	DNA-TECHNIKEN.....	43
2.1.1	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR).....	43
	2.1.1.1 Kolonie PCR	44
	2.1.1.2 USER PCR	45
	2.1.1.3 Gerichtete Mutagenese.....	45
	2.1.1.4 In vitro PCR.....	46

2.1.2	KLONIERUNGSMETHODEN	46
2.1.2.1	T/A-Klonierung mittels pGEM [®] T-Easy Vektorsystem	47
2.1.2.2	Klonierung mittels USER-System	47
2.1.2.3	Verwendete Vektoren zur USER-Klonierung	49
2.1.3	DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	51
2.1.3.1	Durchführung und Analyse von DNA in Agarose-Gelen.....	51
2.1.4	AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN	52
2.1.4.1	Agarose-Gelextraktion von DNA-Fragmenten	52
2.1.4.2	Aufreinigung einer PCR-Reaktion.....	53
2.1.5	RESTRIKTIONSVERDAU DOPPELSTRÄNGIGER DNA	53
2.1.6	BAKTERIEN-TRANSFORMATION DURCH HITZESCHOCK.....	54
2.1.7	ANFERTIGUNG VON ÜBERNACHTKULTUREN	54
2.1.8	PLASMID-DNA ISOLIERUNG	54
2.1.9	DNA SEQUENZIERUNG UND SEQUENZANALYSE.....	55
2.2	RNA-TECHNIKEN.....	55
2.2.1	IN VITRO TRANSKRIPTION	55
2.2.2	RNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	56
2.3	QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QUANTITATIVE REAL TIME-PCR, qPCR)	57
2.3.1	ISOLATION DER GESAMT-RNA AUS FRISCHEM PFLANZENMATERIAL	57
2.3.2	DNASE-VERDAU, RNA-PRÄZIPITATION UND REVERSE TRANSKRIPTION	58
2.3.3	QUANTIFIZIERUNG MITTELS qPCR.....	59
2.3.4	HERSTELLUNG VON STANDARDREIHEN FÜR DIE qPCR	60
2.4	XENOPUS LAEVIS OOZYTEN ALS HETEROLOGES EXPRESSIONSSYSTEM	61
2.4.1	GEWINNUNG UND PRÄPARATION DER OOZYTEN AUS XENOPUS LAEVIS	62
2.4.2	INJEKTION VON crRNA IN OOZYTEN VON XENOPUS LAEVIS	63
2.5	FLUORESCENZ-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	63
2.5.1	BIMOLEKULARE FLUORESCENZKOMPLEMENTATION (BIFC).....	63
2.5.2	KONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)	64
2.6	DIE ZWEI-ELEKTRODEN-SPANNUNGSKLEMM-TECHNIK	64
2.6.1	DAS MESSPRINZIP	65
2.6.2	DER MESSAUFBAU	66
2.6.3	MESSELEKTRODEN	66
2.6.4	KONVENTIONEN.....	67
2.6.5	DATENERFASSUNG UND SPANNUNGSPROTOKOLLE	67
2.6.6	MESSLÖSUNGEN	69
2.7	BIOPHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN UND DATENANALYSE	71
2.7.1	ENZYMKINETIK-ERMITTLUNG DES K_M -WERTES	71
2.7.2	Q_{10} -WERT	73
2.7.3	RELATIVE SPANNUNGSABHÄNGIGE OFFENWAHRSCHEINLICHKEIT (P_0).....	74

2.7.4	BESTIMMUNG DES UMKEHRPOTENZIALS UND DER RELATIVEN PERMEABILITÄT	74
2.8	VERWENDETE CHEMIKALIEN	76
3	ERGEBNISSE.....	77
3.1	IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON TRANSPORTPROTEINEN AUS DER DATTELPALME	77
3.1.1	KLONIERUNG DER TRANSPORTPROTEINE AUS PHOENIX DACTYLIFERA	77
3.1.2	PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG DER IDENTIFIZIERTEN PUTATIVEN SACCHAROSETRANSPORTPROTEINE	78
3.1.3	EINGRUPPIERUNG DER PdsUTs INNERHALB DER PFLANZLICHEN SACCHAROSETRANSPORTER-FAMILIE	78
3.1.4	EXPRESSIONSMUSTER UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER SACCHAROSETRANSPORTER AUS DER DATTELPALME	81
3.1.5	EXPRESSIONSVERHALTEN DER PdsUTs	82
3.1.6	FUNKTIONELLE EXPRESSION VON PdsUT1 IN XENOPUS OozyTEN	85
3.1.7	ERMITTLUNG DER SUBSTRATABHÄNGIGKEIT VON PdsUT1	89
3.1.8	DER EINFLUSS VON PROTONEN AUF DIE TRANSPORTEIGENSCHAFTEN VON PdsUT1	91
3.1.9	DIE SUBSTRATSPEZIFITÄT VON PdsUT1	94
3.1.10	DER EINFLUSS VON SUCRALOSE (SRL) AUF DIE TRANSPORTAKTIVITÄT VON PdsUT1.....	96
3.1.11	DER EINFLUSS VON HITZE AUF DIE TRANSPORTEIGENSCHAFTEN VON PdsUT1	100
3.1.12	DIE TEMPERATUR BEEINFLUSST DIE SUBSTRATAFFINITÄT VON PdsUT1	103
3.1.13	ISOPREN BEEINFLUSST DEN SACCHAROSETRANSPORT BEI NIEDRIGEN SUC-KONZENTRATIONEN ...	104
3.2	DIE BETEILIGUNG DER S-TYP ANIONENKANÄLE AUS DER DATTELPALME UND DER GERSTE BEI DER REGULATION DER STOMABEWEGUNG	111
3.2.1	DIE PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG DES S-TYP ANIONENKANALS PdSLAC1/HvSLAC1	112
3.2.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ANIONENKANÄLE PdSLAC1 UND HvSLAC1	114
3.2.3	PdSLAC1 UND HvSLAC1 BENÖTIGEN EINE OST1 KINASE ZUR KANALAKTIVIERUNG	115
3.2.4	DIE NITRAT-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON PdSLAC1/HvSLAC1	120
3.2.5	NITRATABHÄNGIGKEIT, EIN CHARAKTERISTIKUM VON MONOKOTYLEDONEN SLAC1 ANIONENKANÄLEN?	126
3.2.6	MONOKOTYLEDONE SLAC1s VERFÜGEN ÜBER EIN SPEZIELLES IA-MOTIV IN TMD3	127
4	DISKUSSION.....	134
4.1	PdsUT1 REPRÄSENTIERT EINEN TYPISCHEN VERTRETER DER TYP-IIb FAMILIE	135
4.2	PdsUT1 IST EIN SACCHAROSE/PROTONEN SYMPORTER.....	138
4.3	PdsUT1 IST EIN HOCHSELEKTIVER SUC-TRANSPORTER	140
4.4	SUCRALOSE KONKURRIERT MIT SUC UM DIE BINDESTELLE VON PdsUT1	142

4.5 DIE TEMPERATUR BEEINFLUSST DIE TRANSPORTAKTIVITÄT UND –AFFINITÄT DES SUC-TRANSPORTS.....	145
4.6 DIE ISOPRENEMISSION ERFOLGT VERSTÄRKT BEI EXTREM HOHEN TEMPERATUREN. 147	
4.6.1 ISOPREN BEEINFLUSST DIE TRANSPORTAKTIVITÄT VON PDSUT1 NUR SCHWACH, VON ZMSUT1 STARK	150
4.7 SLAC1 UND OST1 AUS DER DATTELPALME UND DER GERSTE WEISEN EINEN HOHEN VERWANDTSCHAFTSGRAD ZU IHREN ORTHOLOGEN AUS ARABIDOPSIS AUF	152
4.7.1 DIE AKTIVIERUNG VON PdSLAC1 UND HVSLAC1 ERFOLGT MITTELS PROTEINKINASEN	154
4.7.2 NEGATIVE REGULATION DER S-TYP ANIENENKANÄLE IST ART-ÜBERGREIFEND KONSERVIERT	155
4.7.3 NITRAT DIENT ALS LIGAND FÜR DIE AKTIVIERUNG VON SLAC1 ANIENENKANÄLEN AUS MONOKOTYLEDONEN PFLANZEN	156
4.7.4 EIN IA-MOTIV IN TMD3 VERLEIHT SLAC1 ANIENENKANÄLEN AUS MONOKOTYLEDONEN PFLANZEN IHRE NITRATABHÄNGIGKEIT	157
4.7.5 DIE EVOLUTION NITRAT-ABHÄNGIGER SLAC1 ANIENENKANÄLE	158
5 ANHANG	163
5.1 LITERATURVERZEICHNIS	163
5.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	183
5.3 TABELLENVERZEICHNIS	186
5.4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	187
5.5 LÖSUNGEN UND PUFFER	191
5.6 VERWENDETE PRIMER.....	193
6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG UND DANKSAGUNG	196
6.1 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	196
6.2 DANKSAGUNG	197

1 Einleitung

Die Klimazonen der Erde beherbergen unterschiedlichste Pflanzenarten, die sich während der Evolution den entsprechenden klimatischen Verhältnissen perfekt angepasst haben. Der vom Menschen ausgelöste, schnell voranschreitende Klimawandel verändert die klimatischen Verhältnisse rascher als die Ökosysteme sich anpassen können. Die zukünftig immer heißer und trockener werdenden landwirtschaftlichen Anbaugelände stellen auch viele Pflanzenzüchter vor eine große Herausforderung, denn für hochgezüchtete auf Ertrag optimierte Kulturpflanzen bedeutet diese massive Umweltveränderung Stress. Die Folge sind erkrankte Pflanzen und geringere Ernteerträge bis hin zum Aussterben bestimmter Pflanzenarten sowie Zusammenbrüche ganzer Ökosysteme. Da Pflanzen als sessile Organismen ihren Lebensraum während eines Lebenszyklus nicht ändern können, sind diese stets den ungünstigen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Selbst moderate Temperaturerhöhungen können deshalb bereits das Pflanzenwachstum und den Ertrag beeinflussen (Lafta and Lorenzen 1995; Ciaffaglia et al. 2005).

Der Schlüssel zur Erhöhung und zur Stabilisierung von Ernteerträgen unter ungünstigen Umwelteinflüssen ist die Züchtung stressangepasster Pflanzen, die zukünftig besser mit Wasser haushalten und dadurch unempfindlicher gegen Hitzeperioden und der damit verbundenen Trockenheit sind. Die Grundlagenforschung an extremophilen Pflanzen, wie z.B. Wüstenpflanzen, sowie an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, sind essenzielle Schritte, um Markergene zu identifizieren, die die Stresstoleranz von Kulturpflanzen verbessern können. Zudem verspricht die stetig voranschreitende Sequenzierung von Pflanzengenomen, -transkriptomen, evolutionsbiologische Herangehensweisen, das Einkreuzen von alten Kulturpflanzenvarietäten und das Verständnis von physiologischen Abläufen auf molekularer Ebene, eine Entwicklung von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, die besser mit den Folgen des Klimawandels umgehen können.

1.1 Standortfaktoren entscheiden über die Anpassungsstrategie der Pflanzen

Die Evolution der Pflanzen begann bereits vor mehr als 700 Millionen Jahren. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen viele Mechanismen und Strategien entwickelt, um auf Umweltveränderungen zu reagieren und sich den neuen Lebensbedingungen anzupassen zu können. Dabei spielen zum einen abiotische Faktoren, wie beispielsweise Licht, Wasser, Nährsalze sowie Temperatur (Mittler 2006) und zum anderen biotische Faktoren eine entscheidende Rolle. Bei den biotischen Faktoren handelt es sich um Umweltfaktoren, bei denen andere Lebewesen beteiligt sind. Zu diesen zählen zum einen andere Pflanzen, welche

um denselben Standort konkurrieren, aber auch Bakterien, Pilze, Viren und Herbivoren, die Pathogene aber auch Symbionten darstellen können (Thomas, Blank, and Hartmann 2002). Gegen all diese Faktoren haben Pflanzen im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Anpassungs-, Schutz- und Verteidigungsmechanismen entwickelt, welche entweder kontinuierlich zum Einsatz kommen oder bei Bedarf induziert werden. Konstitutiv, morphologische Barrieren wie Dornen, Stacheln, die Kutikula sowie die pflanzliche Zellwand stellen dauerhaft vorhandene Abwehrorgane dar, welche meist der physischen Abwehr von Schädlingen dienen, indem sie die Pflanze für diese schwerer zugänglich machen.

Daneben verfügen Pflanzen auch über induzierbare Abwehrmechanismen, welche hauptsächlich durch Phytohormone wie beispielsweise Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen oder ABA reguliert werden (Pieterse et al. 2012). Induzierte Mechanismen können dabei entweder auf direktem oder indirektem Wege gegen Feinde eingesetzt werden.

Dabei sondern Pflanzen entweder direkt Giftstoffe ab, welche für die Schädlinge toxisch wirken, deren physiologische Funktion stören oder es kommt zu einer indirekten chemischen Verteidigungsstrategie durch die Abgabe von speziellen Signalstoffen an die umgebende Luft, welche z.B. räuberische Insekten rekrutieren, die die pflanzenfressenden Insekten gezielt attackieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hitze- und Trockentoleranz von zwei landwirtschaftlich Nutzpflanzen untersucht: Zum einen die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* und zum anderen die Gerste (*Hordeum vulgare*), die in den gemäßigten Breiten angebaut wird.

1.1.1 Die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera*

Die Echte Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) gehört zur Familie der Palmengewächse (Arecaceae) und zählt zu einer der ältesten Kulturpflanzen der Menschheit (Zohary and Hopf 2000). Heutzutage wird diese vorwiegend in den Ländern der afrikanischen Mittelmeerküste, der Sahara, der Arabischen Halbinsel sowie den Ländern am Persischen Golf angebaut.

Die Echte Dattelpalme kann etwa 15-20 m hochwachsen und ihre Laubblätter zeigen die Palmen-typische Wedelform (Abbildung 1-1). Diese erreichen eine Länge von ca. 3-5 m und besitzen etwa 30 cm lange und 2 cm breite Fiedern. Die Palme ist getrenntgeschlechtlich (zweihäusig); ihre Blütenstände sind achselständig und einfach verzweigt. Die fingerförmigen Früchte wachsen büschelweise, die zunächst grün sind und im Laufe der Reifung glänzend braun werden. Die pflaumenartigen, länglich-ovalen Früchte werden ca. 8-10 cm lang. Datteln sind reich an Kohlenhydraten (bis zu 60 % Zuckeranteil vom Trockengewicht) und sind deshalb extrem nahrhaft. Sie enthalten mehr Fruchtzucker als jede andere Frucht. Zudem sind

sie reich an verdauungsfördernden Ballaststoffen, Kalium, Vitaminen und Mineralstoffen. 100 g frische Datteln enthalten etwa 230 kcal (960 kJ) und getrocknete etwa 270 kcal (1.132 kJ).



Abbildung 1-1: Die Echte Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*)

Die Echte Dattelpalme *Phoenix dactylifera* (rechts) mit langen Fiedern bewachsenen Wedel (links).

Wie vielseitig und hilfreich die Dattelfrüchte tatsächlich sind wurde bereits anhand von einigen Studien nachgewiesen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass bestimmte Dattelsorten ein sehr hohes antioxidatives Potenzial aufweisen, da sie Anthocyane, Carotinoide, Phenole sowie gebundene Phenolsäuren enthalten. Getrocknete Datteln verlieren jedoch eine signifikante Menge an Antioxidativen und Carotinoide, während der Gesamtgehalt an Phenolen und freien sowie gebundenen Phenolsäuren ansteigt. Anthocyanine dagegen sind nur in frischen Datteln nachgewiesen worden (Al-Farsi et al. 2005). Daneben weisen Datteln, im Vergleich zu anderen getrockneten Früchten, die höchste Konzentration an Polyphenolen auf, was auf die hohe Exposition gegenüber den extremen Temperaturen sowie der enormen Sonneneinstrahlung zurückzuführen ist (Vinson et al. 2005). Außerdem konnte u.a. eine antimikrobielle sowie antimykotische Wirkung bei Datteln aufgedeckt werden. Der Verzehr von Datteln fördert somit die gesunde Darmflora und weist eine Verbesserung der antifungalen Aktivität auf (Eid et al. 2014). Als Wüstenpflanze benötigt die Dattelpalme viel Sonnenlicht. Ansonsten gilt die Pflanze als anspruchslos und kommt mit nährstoffarmen Böden zurecht. Die ersten Datteln kann man 5 bis 6 Jahre nach der Aussaat ernten.

Im Gegensatz zu anderen Pflanzen kann die Dattelpalme in den Oasen bestens gedeihen, weil sie durch ihre sehr tiefgreifenden Wurzeln an das Grundwasser gelangt und somit nicht zwangsweise auf Niederschläge angewiesen ist. Die Luft kann für die Echte Dattelpalme nicht trocken genug sein und die Hitze nicht groß genug und trotzdem kann sie auch in den kalten Winternächten der Sahara Temperaturen von Minus 5-8 Grad ohne Probleme überleben.

Auch wenn die Echte Dattelpalme unter extremen klimatischen Bedingungen wächst, stellen stark verändernde oder lang andauernde Umwelteinflüsse, wie z.B. Trockenheit, hoher Salzgehalt und Hitze, auch für diese Pflanze, als sessilen Organismus, eine Gefahr dar (Yaish

and Kumar 2015). Bei zu hohen Salzgehalten kommt es zu einer massiven Reduktion hinsichtlich des Fruchteertrags und somit zu einem enormen ökonomischen Verlust (Cookson and Lepiece 2001). Die Dattelpalme hat sich durch natürliche Selektion zu einer trocken- und salztoleranten Pflanze entwickelt, die durch ihre Anpassungsfähigkeit bzw. Toleranz selbst Gerste, die als sehr salztolerant angesehen wird, übertrifft (Zaid and P.F. 2002a; Furr and Armstrong 1975). Obwohl das Genom der Dattelpalme mittlerweile bekannt ist (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem, Hu, and Zhang 2013), konnte man anhand von Genexpressionsanalysen keinen Zusammenhang zur Salztoleranz oder anderen abiotischen Stressfaktoren in der Dattelpalme finden (Bourgis et al. 2011; Zhang et al. 2012).

Aufgrund dessen, dass die Echte Dattelpalme als Einzige ihrer Art diese energiereichen und vielseitig einsetzbaren Früchte produziert, gilt es, in Zeiten des Klimawandels, mehr über diese extrem umweltsanpassungsfähige Wüstenpflanze hinsichtlich der Entschlüsselung des Mechanismus der Stresstoleranz sowie der involvierten Gene herauszufinden.

1.1.2 Die Getreidepflanze *Hordeum vulgare*

Die Gerste (*Hordeum vulgare*) gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und stellt durch ihre essbaren Körner eines der wichtigsten Getreidearten weltweit dar (Dawson et al. 2015). Dabei handelt es sich um ein einjähriges Gras, welches eine Wuchshöhe zwischen 0.7 und 1-2 m erreichen kann.



Abbildung 1-2: Darstellung eines Getreidefeldes der Gerste mit seinen Getreide-Ähren inklusive Grannen

Hordeum vulgare ist gegenüber trockener Hitze widerstandsfähiger als andere kleinere Getreidesorten. Die Gerste ist eine alte Getreidesorte, die eng mit dem Weizen (*Triticum*) verwandt ist. Ihren Ursprung hat diese Getreideart im Vorderen Orient und der östlichen Balkanregion. Die ältesten Nachweise datieren auf die Zeit von ca. 10.500 v. Chr. Die essenzielle Kulturpflanze ist extrem anpassungsfähig, so dass diese monokotyledone Pflanze in gemäßigten, subarktischen als auch in subtropischen Gebieten wächst (Harlan and Zohary 1966). *Hordeum vulgare* bevorzugt feuchte Böden, jedoch besitzt sie eine recht große

Toleranz hinsichtlich ihres Standorts, weshalb sie auch unter ungünstigen Bedingungen überleben kann und deshalb weit verbreitet angebaut wird. Das Getreide wird anhand der unterschiedlichen Ähren in zwei- und mehrzeilige Formen unterschieden. Zweizeilige Gerstesorten, überwiegend Sommergerste, beinhalten einen hohen Stärkeanteil und einen moderaten Proteinanteil und werden vorwiegend bei der Bierherstellung eingesetzt. In nicht gemälzter Form wird Gerste zu Graupen verarbeitet. Die Sommergerste reagiert sensibler auf Hitze; es konnte gezeigt werden, dass Gerste ab Temperaturen von 32-35°C unter Hitzestress gerät (Macnicol et al. 1993; Stone 1994; Savin et al. 1997a, 1997b). Mehrzeilige Gerstesorten, überwiegend Wintergerstesorten, werden aufgrund ihrer höheren Erträge und ihres hohen Proteinanteils (12-15 %) hauptsächlich als Tierfutter eingesetzt. Gegenüber Hitze ist die Wintergerste weniger empfindlich als Winterweizen, da die Grannen mittels Transpiration eine Abkühlung der Ähren bewirken, so dass die Wintergerste auch Temperaturen über 32 °C verträgt, solange sie genug Wasser aus dem Boden verdunsten kann. Generell ist die Wintergerste ertragreicher als die Sommergerste und wird im September ausgesät. Ideale Wachstumsbedingungen für die Wintergerste sind Temperaturen >10°C. Die Aussaat der Sommergerste dagegen erfolgt im Frühjahr und benötigt deutlich weniger Wärme zum Heranwachsen als die Wintergerste. Abhängig vom Standort liefert die Wintergerste einen Ertrag zwischen 50-90 dt/ha und die Sommergerste zwischen 40-65 dt/ha.

Der Gerste werden auch Heilwirkungen zugesprochen. Es existieren z.B. spezielle Sorten mit hohem Gehalt an β -Glucanen, welche zur Aufrechterhaltung eines normalen Cholesterin- und Blutzuckerspiegels zur Vorbeugung von Schlaganfällen, Herzinfarkten und Typ-II Diabetes angeboten werden (Wilson et al. 2004; Cho et al. 2013). Zudem wird das Gerstengras häufig zur Unterstützung einer Diät eingesetzt, da es aufgrund seines hohen Ballaststoffanteils ein rasches Sättigungsgefühl auslöst. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Gerste den Säure-Basen-Haushalt reguliert und somit wichtiger Bestandteil von Fasten- oder Entschlackungskuren ist. Gerste enthält zudem im Vergleich zu anderen Getreidesorten einen höheren Vitamin- und Mineralstoffgehalt (Ames et al. 2006; Lahouar, El-Bok, and Achour 2015).

Die Gerste stellt aufgrund ihrer wirtschaftlichen Relevanz sowie ihrer evolutionären Nähe zur Welternährungspflanze; dem Weizen; eine interessante Forschungspflanze dar. Sie verfügt zudem über ein hohes genetisches Anpassungspotenzial, welches bei der Züchtung stresstoleranter Pflanzensorten Anwendung findet (Pickering and Johnston 2005; Varshney 2007; Varshney, Langridge, and Graner 2007). Aus diesem Grunde beschäftigen sich Forscher in den letzten Jahren intensiv mit der Identifizierung molekularer bzw. zellulärer Prozesse, welche für die Stressanpassung der Gerste grundlegend sind. Das Ziel dabei ist

aufgrund des Klimawandels eine Verbesserung der Klimaanpassung der Gerste durch eine Erhöhung der Hitze- und Trockentoleranz zu ermöglichen.

1.1.3 Hitzestress

In den vergangenen 100 Jahren ist die globale Durchschnittstemperatur bereits um etwa 1°C angestiegen und für die nächsten 100 Jahre wird eine weitere Erwärmung von etwa 1-2°C vom Intergovernmental Panel on Climate Change prognostiziert. Hitze beeinträchtigt die Photosynthese sowie das Pflanzenwachstum und kann auch tödlich für die Pflanze sein. Für Pflanzen bedeutet also Hitze eine Stresssituation. Jedoch haben insbesondere extremophile Pflanzen im Laufe der Evolution eine Vielfalt an Mechanismen entwickelt, um auf diesen abiotischen Stressfaktor reagieren zu können. Bisherige Studien sind jedoch noch nicht in der Lage, die komplexen Reaktionen umfassend aufzuklären. Dies zeigt eine Metaanalyse zur Thermotoleranz von Pflanzen (Yeh et al. 2012). Steigende Temperaturen im Zuge des Klimawandels führen zu einer geringeren Produktivität wichtiger Nutzpflanzen. Welche Strategien und welche Gene dafür verantwortlich sind, dass einige Pflanzen hitzetoleranter als andere sind, wird gerade jetzt in Zusammenhang mit der stetig steigenden Klimaerwärmung intensiv erforscht, um letztendlich auch hitzetolerante Pflanzen züchten zu können. Bei Temperaturen über 45°C sind nur noch wenige Pflanzen lebensfähig. Während Pflanzen bei Trockenheit ihre Stomata schließen, um vermehrten Wasserverlust entgegenzusteuern, so halten sie diese bei Hitzestress geöffnet, um die Transpiration und der damit verbundenen Kühlung der Blätter zu gewährleisten (Reynolds-Henne et al. 2010).

Die gesteigerte Transpirationsrate resultiert jedoch in einem erhöhten Wasserverlust, welcher letztlich die Pflanze wieder anfälliger gegenüber Trockenstress macht. Auf diese Art schützt sich beispielsweise die im Death Valley, Kalifornien, lebende Wüstenpflanze *Tidestromia oblongifolia*, welche durch Transpiration ihre Blatttemperatur um 10°C absenken kann. CAM-Pflanzen sind jedoch nicht in der Lage diese Form von Wärmeregulation zu nutzen, da sie ihre Stomata tagsüber geschlossen halten. Trotzdem gibt es einige sukkulente CAM-Pflanzen, wie z.B. *Opuntia* (Cactaceae) und *Sempervivum* (Crassulaceae), welche Temperaturen von bis zu 65°C tolerieren und somit zu den hitzeresistentesten Pflanzen zählen. Diese hitzetoleranten Pflanzen sind in der Lage langwellige Strahlung zu reflektieren und mittels Wärmeleitung und Konvektion die Wärme an die umliegende Umgebung abzugeben. Ein weiterer Vorteil dieser sukkulenten Pflanzen ist das geringe Oberflächen-Volumen-Verhältnis, das den Wasserverlust weiter begrenzt. Andere Pflanzen schützen sich vor Wasserverlust und vor einer zu starken Erwärmung der Pflanzenoberfläche durch Dornen, Haare oder Wachse

(Kutikula). Eine weitere Strategie, um Hitzeschäden zu vermeiden, ist das Abschirmen gegen die Strahlung z.B. indem sie ihre Blätter vertikal zur Sonneneinstrahlung ausrichten.

Auf molekularbiologischer Ebene nutzen Pflanzen Signalwege, um drohenden Schaden zu erkennen, ihren Metabolismus sowie ihre zelluläre Funktion zu regulieren, damit hitzebedingter Schaden vermieden werden kann (Mittler, Finka, and Goloubinoff 2012). Die durch Hitzestress ausgelöste Signalkaskade, die noch nicht vollständig aufgedeckt wurde, führt unter anderem zur Aktivierung sogenannter Hitzeschockproteine (HSP) (Saidi, Finka, and Goloubinoff 2011). Die HSPs helfen während des normalen Zellwachstums, Proteine post-translational korrekt zu falten (Ellis 1990) und sind zudem in der Lage Hitzestress-bedingte Reaktionen zu mildern, indem sie Fehlfaltungen eines Proteins stabilisieren und mögliche Aggregationen verhindern (Queitsch et al. 2000). Neben diesen HSPs konnte man unter Hitzebedingungen zudem feststellen, dass es innerhalb der Zellmembran zu einer veränderten Lipidzusammensetzung kommt, um die Fluidität der Membran konstant zu halten (Penfield 2008). Zudem führt Hitzestress zu Änderungen der Zellstruktur, der Destabilisierung von RNA und Proteinen und verändert die Effizienz enzymatischer Reaktionen, was schließlich in einem metabolischen Ungleichgewicht resultiert (Mittler, Finka, and Goloubinoff 2012; Mathur, Agrawal, and Jajoo 2014). Da Hitze meist in Zusammenhang mit Trockenheit steht, spielt auch die Abscisinsäure (ABA) eine wichtige Rolle bei der Thermotoleranz (vgl. 1.3).

1.1.4 Aufbau und Funktion von Biomembranen

Die Biomembran, welche aus Membranlipiden und –proteinen besteht, stellt eine Abgrenzung von Zellen und Zellkompartimenten dar. Die Phospholipide der Membran bestehen aus zwei Untereinheiten, einem wasserlöslichen Kopf mit zwei langen Fettsäureketten. Im wässrigen Medium bilden diese aufgrund ihrer lipophilen Fettsäurereste (Schwänze) und hydrophilen Phosphorsäureester bzw. Zuckerreste (Köpfe) eine Lipiddoppelschicht, so dass Ionen sowie wasserlösliche Stoffe die Membran nicht passieren können (Abbildung 1-3). Kleinere lipophobe Moleküle wie z.B. CO₂ oder Alkohole dagegen können frei durch die Membran diffundieren.

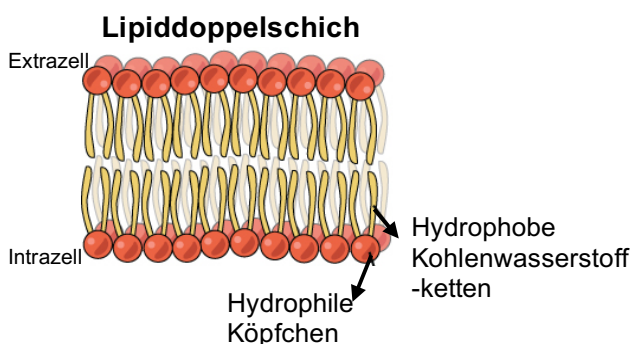
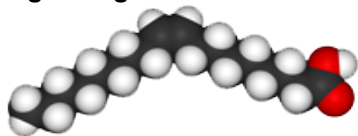


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht

Aufbau einer Biomembran mit seiner Lipiddoppelschicht bestehen aus den hydrophilen Köpfchen (rot) und den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten.

In der Membran sind verschiedenste Transportproteine integriert um die Durchlässigkeit für unterschiedliche lipophile Moleküle wie z.B. Wasser oder Zucker zu gewährleisten. Die Biomembran spielt somit eine aktive Rolle beim selektiven Transport zwischen zwei benachbarten Zellkompartimenten und ist deshalb essenziell für die Weiterleitung von Informationen. Membranproteine übernehmen meist wichtige physiologische Funktionen wie z.B. als Rezeptoren von Signalketten. Zudem sind Transportproteine unabdingbar für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts einer Zelle. Damit Membrane ihre Aufgaben erfüllen können, müssen sie flüssig sein. Man spricht hier von der Membranfluidität. Die Fluidität einer Membran hängt dabei von der Temperatur und der Lipidzusammensetzung ab. Membrane sind somit äußerst dynamische Strukturen. Je nach ihrer Viskosität variiert ihre Permeabilität und damit auch die Aktivität ihrer Membranproteine. Nimmt z.B. die Außentemperatur so stark ab, dass sich die Membran verfestigt, so können die membranständigen Proteine nur noch sehr erschwert eine Konformationsänderung vollführen. Je mehr Phospholipide mit ungesättigten Acylresten in der Membran vorhanden sind, desto länger bleibt ihre Fluidität bestehen. Die ungesättigten Kohlenwasserstoffketten sind durch die darin enthaltenen C=C Doppelbindungen angewinkelt, wodurch sich die Moleküle nicht dicht aneinanderlagern können (vgl. Abbildung 1-4).

Ungesättigte Fettsäureketten



Gesättigte Fettsäureketten

Abbildung 1-4: Phospholipide mit gesättigten Fettsäureketten (unten) und ungesättigten Fettsäureketten (oben)

In Abbildung 1-4 wird ersichtlich, dass eine dichte Zusammenlagerung der Phospholipide (unten) zu einer stabileren, fast kristallinen Konformation der Moleküle führt. Die C=C Doppelbindungen bei den Phospholipiden in der oberen Skizze besitzen eine cis- bzw. trans-Isomerie, wodurch eine weniger stabile Molekülkonformation entsteht und eine höhere Viskosität der Membran zufolge hat.

1.1.5 Funktion und Bedeutung der Isoprenfreisetzung

Neben den Hauptkomponenten Wasser und Kohlenstoffdioxid gehört auch eine Vielzahl von weiteren volatilen Spurengasen zum Bestandteil des Gasaustausches zwischen der Pflanze und der Atmosphäre. Zu diesen Spurengasen gehören z.B. Isoprene oder Monoterpene, welche allgemein unter dem Begriff biogene flüchtige organische Kohlenwasserstoffe (BVOC) zusammengefasst werden.

Der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien) wird abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen von vielen höheren Pflanzen produziert. Aufgrund des Klimawandels nehmen die BVOCs, insbesondere Isopren, einen hohen Stellenwert in der Klima- und Umweltforschung ein. Von allen pflanzlichen BVOCs stellt Isopren die dominierende Verbindung dar und erreicht eine globale Flussdichte von 175-503 Tg C y⁻¹ in die Atmosphäre, vergleichbar mit der Flussdichte von Methan (500 Tg C y⁻¹) (Kesselmeier and Staudt 1999).

Im Vergleich zu Methan verbleibt Isopren jedoch nur kurze Zeit in der Atmosphäre, da dieser Kohlenwasserstoff aufgrund seiner hohen Reaktivität an unterschiedlichen chemischen Prozessen in der Atmosphäre beteiligt ist. Der Hauptreaktionspartner von Isopren in der Atmosphäre ist das Hydroxylradikal (OH). Durch diese Reaktion kommt es zur atmosphärischen Abnahme der OH-Konzentration und somit zur Verringerung des Oxidationspotenzials in der Atmosphäre, wodurch letztlich die Verweildauer von Treibhausgasen (z.B. Methan) gefördert wird (Thompson 1992). Stickoxide, die durch den Menschen hervorgerufen in der verschmutzten Luft entstehen, tragen dazu bei, dass Isopren die Bildung von troposphärischem Ozon (O₃) fördert. Isopren wandelt dabei Stickstoffoxid (NO) in Stickstoffdioxid (NO₂) um, welches wiederum zu NO und O₃ photolytisiert wird (Williams et al. 1997; Lerdau 2007).

Aus pflanzenphysiologischer Sicht stellt sich die Frage, warum Pflanzen Isopren in großen Mengen emittieren. In den 1960er Jahren wurde erstmals die Isoprenemission bei Pflanzen entdeckt und es konnte in diesem Zuge bewiesen werden, dass dieser Prozess stark temperatur- und lichtabhängig ist (Sanadze 1966; Sanadze and Kalandadze 1966; Sanadze and Kursanov 1966; Sanadze 1969). Unter Sonneneinstrahlung sowie Temperaturen über 30°C wird Isopren vor allem von bestimmten Bäumen wie z.B. Pappeln, Fichten oder Eichen freigesetzt und kann bis zu 15% des durch Photosynthese fixierten Kohlenstoffs betreffen (Fehsenfeld et al. 1992; Guenther et al. 1993; Kesselmeier and Staudt 1999; Zimmer et al. 2000; Jud et al. 2016).

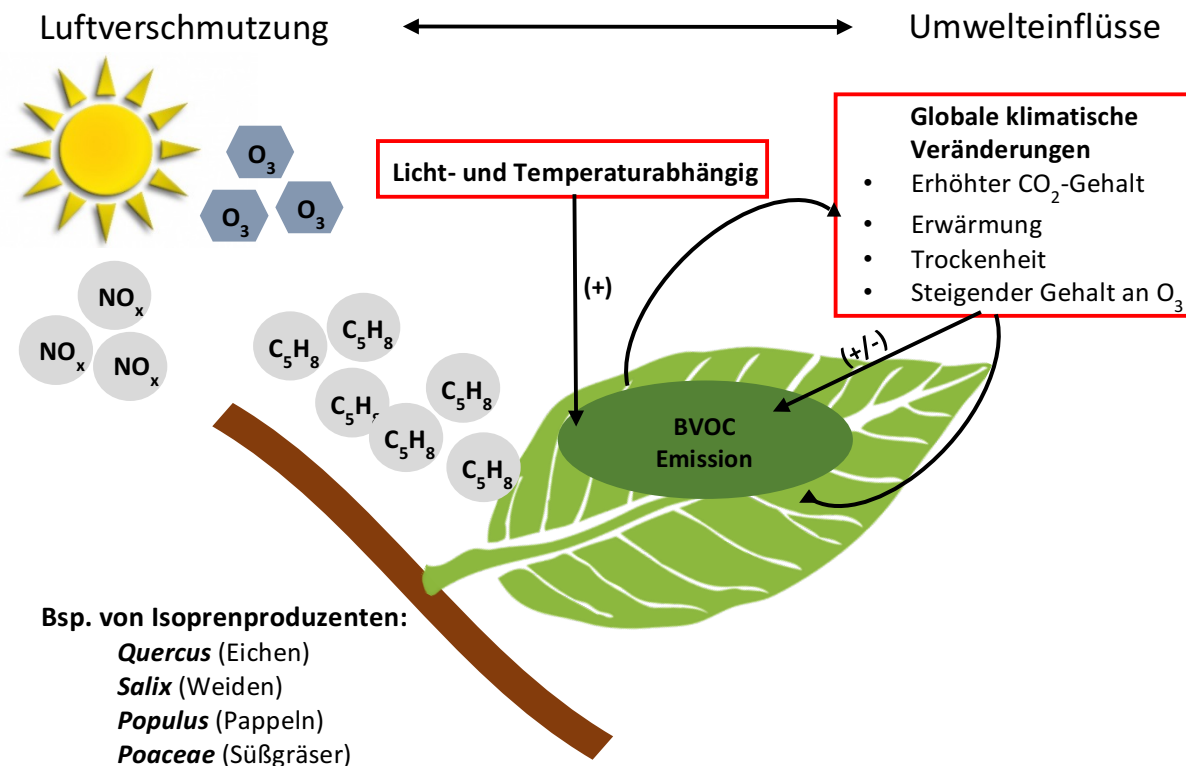


Abbildung 1-5: Kurzfristige und langfristige Reaktionen auf Trockenstress (Chaves, Maroco, and Pereira 2003)

Die stärksten mitteleuropäischen Isopren-emittierenden Pflanzen gibt es bei den *Fagaceae* (Buchengewächsen); mit der Gattung *Quercus* (Eichen), aber auch bei den *Salicaceae* (Weidengewächsen) mit den Gattungen *Salix* (Weiden) und *Populus* (Pappeln) (Kesselmeier and Staudt 1999). Es gibt aber auch andere Pflanzenarten wie z.B. den *Poaceae* (Süßgräser), *Hamamelidaceae* (Zaubernussgewächse) und *Myrtaceae* (Myrtengewächse), welche ebenfalls Isopren emittieren können.

1.1.5.1 Plastidäre Isoprenoidbiosynthese

Die Biosynthese des flüchtigen Kohlenwasserstoffs Isopren ist, wie anderer Isoprenoide, baut auf dem C₅-Grundgerüst IDP (Isopentenyl-Diphosphat) bzw. seinem Isomer DMADP (Dimethylallyl-Diphosphat) auf. DMADP stellt dabei die direkte Vorstufe für die Bildung des Isoprens dar. Die Synthese von IDP bzw. DMADP erfolgt dabei über zwei unabhängige Stoffwechselwege. Vor dem Jahr 1993 war nur einer dieser beiden Stoffwechselwege bekannt; der sogenannte Acetat-Mevalonat-Weg (MVA), bei welchem die Synthese von IDP über Acetyl-CoA und Mevalonat erfolgt (Croteau 1987; Lalitha and Ramasarma 1987). Rohmer et al. gelang schließlich die Entdeckung des zweiten unabhängigen Stoffwechselwegs (Rohmer et al. 1993), welcher über das dabei entstehende Zwischenprodukt 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat (MEP) entsteht und aufgrund dessen auch danach benannt wurde (Rohmer 2008).

Mittlerweile geht man davon aus, dass die Synthese von chloroplastidären Isoprenoiden, zu denen z.B. Isoprene oder Monoterpene zählen, hauptsächlich über den MEP-Stoffwechselweg erfolgt. Die Synthese von z.B. Sterolen oder Tri-/polyterpenen werden dagegen über den zytosolischen MVA-Stoffwechselweg synthetisiert (Lichtenthaler et al. 1997). Adam et al. gelang schließlich den MEP-Stoffwechselweg komplett aufzuklären, so dass heute alle beteiligten Enzyme sowie dazugehörige Gene bekannt sind (Adam et al. 2002).

Bei dem MEP-Stoffwechselweg erfolgt zunächst mithilfe der 1-Deoxy-*D*-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) die Bildung der Zwischenprodukte Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA-3P), woraus letztendlich 1-Deoxy-*D*-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) gebildet wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Reduktion von DOXP zu MEP, welche von der 1-Deoxy-*D*-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) katalysiert wird und unter NADPH-Aufwand stattfindet. Nach weiteren Schritten entsteht schließlich 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(*E*)-Butenyl-4-Phosphat, welches wiederum vom Enzym 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(*E*)-Butenyl-4-Phosphat-Reduktase (HDR) zu IDP und DMADP (im Verhältnis 5:1) umgewandelt wird (Adam et al. 2002). Die Isomerisierung von IDP zu DMADP sowie von DMADP zu IDP wird mit dem Enzym IDP-Isomerase (IDI) bewerkstelligt. IDI stellt dabei ein wesentlichen Bestandteil der chloroplastidären Isoprenoidbiosynthese dar und ist vermutlich für die verbrauchsorientierte Regulation des Verhältnisses zwischen IDP und DMADP verantwortlich (Page et al. 2004).

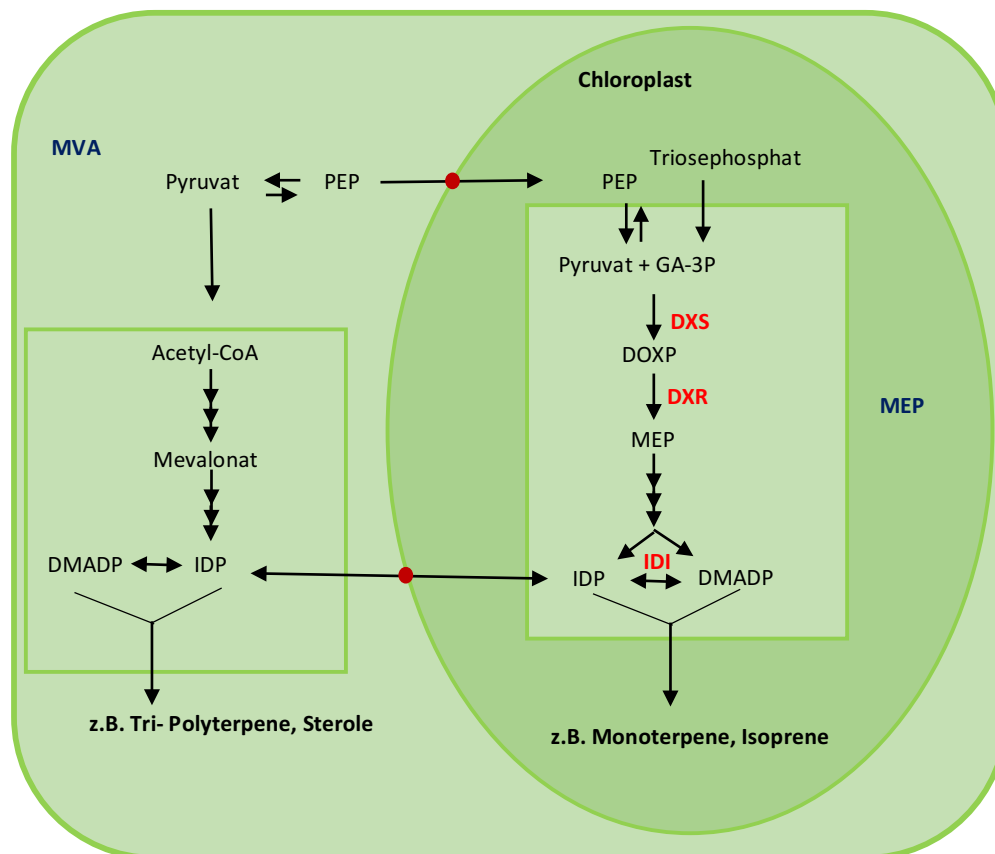


Abbildung 1-6: Isoprenoidbiosynthese

Gegenüberstellung des zytosolischen Mevalonat-Stoffwechselwegs (MVA) und des chloroplastidären 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat-Stoffwechselwegs (MEP). Vereinfachtes Modell basierend auf (Lichtenthaler 1999; Rosenstiel et al. 2004; Flugge and Gao 2005).

Auch wenn der vollständige MEP-Stoffwechselweg bereits aufgeklärt worden ist, sind noch weitere Untersuchungen nötig, um die vollständige Regulation des Isoprenoidstoffwechsels unter verschiedensten Umwelteinflüssen, wie z.B. Hitze, zu verstehen. Die wichtigsten Aspekte für die Regulation der Isoprenoidsynthese sind jedoch bekannt. Dabei wird durch die Synthese der primär photosynthetisch assimilierte Kohlenstoff verbraucht, was auch aufgrund der Lichtabhängigkeit der Isoprenemission vermutet wurde (Sanadze 1969; Rasmussen and Jones 1973). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass etwa 80 % des über Isopren emittierten Kohlenstoffs direkt aus der Photosynthese stammt (Schnitzler et al. 2004; Sanadze, Dzhaiani, and Tevzadze 1972). Der Verbrauch von DMADP bzw. die Isoprenemission stellt für die Pflanze einen Verlust des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs von bis zu 15-20% dar (Sharkey et al. 1996; Bruggemann and Schnitzler 2002). Ein Teil des Isoprenkohlenstoffs entstammt jedoch nicht direkt aus der CO₂-Assimilation, sondern vom Import anderer C-Körper aus dem Zytosol (Karl et al. 2002; Schnitzler et al. 2004). Aufgrund dessen, dass die Pflanze auch andere Kohlenstoffquellen aus dem Zytosol für die Isoprensynthese nutzen kann,

ermöglicht ihr, auch während eingeschränkter Photosynthese wie z.B. bei Trockenstress, die Synthese von Isopren aufrechtzuerhalten (Brilli et al. 2007).

Bislang ist jedoch noch unklar, warum die Pflanze Isopren bildet, da sie über den Mevalonsäureweg sowie durch die Freisetzung des Gases selbst einen enormen Verlust an fixiertem Kohlenstoffdioxid und Reduktions- und Energieäquivalenten zu tragen hat.

Es könnte sein, dass durch die Emission von Isopren die Photosynthesemembran gegenüber zu hohen Temperaturen schützt bzw. stabilisiert und somit zu einer höheren Thermotoleranz verhilft (Sharkey and Singaas 1995) oder eine gewisse Schutzwirkung als Radikalfänger ausübt, da Isopren rasch mit Hydroxylradikalen reagieren kann (Shallcross and Monks 2000; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005).

1.1.5.2 Physiologische Bedeutung der Isoprenbiosynthese

Wie bereits oben erwähnt ist die Synthese von Isopren temperaturabhängig. Ab Temperaturen über 30°C steigt die Emission von Isopren enorm an und erreicht bei etwa 45°C ihr Maximum (Monson et al. 1992; Sharkey and Loreto 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass die Bildung von Isopren eine Art Schutzmechanismus bei erhöhten Temperaturen darstellt (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Penuelas et al. 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005). Wie Isopren jedoch genau den Photosyntheseapparat bei erhöhten Temperaturen schützt ist noch unklar. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass sich Isopren, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften, in die Membran der Chloroplasten einlagert und dadurch die Membranstabilität bei hohen Temperaturen beeinflusst (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007). Zusätzlich zu diesen positiven Entdeckungen konnte auch gezeigt werden, dass Isopren die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2) reduziert und somit oxidativen Schäden vorbeugt (Velikova and Loreto 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005). Diese antioxidativen Eigenschaften, welche auf der vorhandenen Doppelbindung beruhen, konnten anhand weiterer Untersuchungen bestätigt werden (Loreto et al. 2001; Loreto and Velikova 2001). Das bedeutet, dass Isopren dazu beiträgt, im Zusammenhang mit erhöhter Ozontoleranz toxische Sekundärprodukte (wie z.B. ROS, Lipidperoxide) abzufangen. Jedoch ist die Reaktivität von Isopren mit Ozon zu gering, so dass die Emission von Isopren nicht in der Lage ist das Ozon bereits außerhalb vom Apoplasten abzufangen (Atkinson 1997).

Die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist für die Pflanze nicht primär schädlich, da sie permanent als Nebenprodukte im Stoffwechsel entstehen. Sobald jedoch das Gleichgewicht von ROS-Entstehung und ROS-Entgiftung gestört wird, kommt es zum oxidativen Stress, bei dem es zu einer Vielzahl an Oxidationen von Biomolekülen (Membranen, Proteinen, DNA) kommt. ROS stellt eine wichtige Rolle bei der Stresswahrnehmung sowie der

Signalweiterleitung dar, so dass Isopren ebenfalls eine Teilkomponente dieses Prozesses einnimmt indem es den ROS-Gehalt auf einem unschädlichen Niveau hält (Foyer and Noctor 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005).

Wie bereits oben erwähnt, kann bei hohen Temperaturen, durch die Isoprenemission bis zu 20% des fixierten Kohlenstoffs freigesetzt werden. Bei diesem Prozess kommt es neben dem Verlust von Kohlenstoff auch zu einem enormen Energieverlust für die Pflanze. Pro Isopren-Molekül werden 20 ATP und 14 NADPH verbraucht (Sharkey, Chen, and Yeh 2001).

Basierend auf diesem zusammengefassten Wissen wurden bzgl. des Verlustes dieser Reaktionsäquivalente einige unterschiedlich weiterführende Hypothesen aufgestellt. Eine Hypothese geht davon aus, dass die Isoprenemission die Akkumulation von DMADP und damit übermäßiges Sequestrieren von Phosphat im Chloroplasten verhindert (Rosenstiel et al. 2004). Eine andere nimmt an, dass der Verbrauch von ATP und NADPH als Möglichkeit anzusehen ist, um überschüssige photosynthetische Energie abzuleiten, wenn die CO₂-Fixierung limitiert ist (Sanadze 2004).

1.1.6 Die Auswirkung von Isopren auf die Thermostabilität von Membranen

Studien von Siwko et al. im Jahre 2007 befassen sich mit der Frage wie Isopren mit der Lipiddoppelschicht interagiert und wie sich Isopren dabei auf die Membranfluidität und ihre Eigenschaften auswirkt. Mithilfe der Molecular Dynamics (MD) Simulationstechnik und der Kernspinnresonanzspektroskopie (NMR) ist es Siwko et al. erstmals gelungen die membranstabilisierende Wirkung von Isopren nachweisen.

Isopren ist ein kleines, hydrophobes Molekül, welches sich aufgrund dieser Eigenschaften bevorzugt zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht ansiedelt (Abbildung 1-7). Dieser Vorgang ist reversibel. Für die Simulationen legten Siwko et al. eine Aufenthaltsdauer im ns-Bereich fest (Siwko et al. 2007).

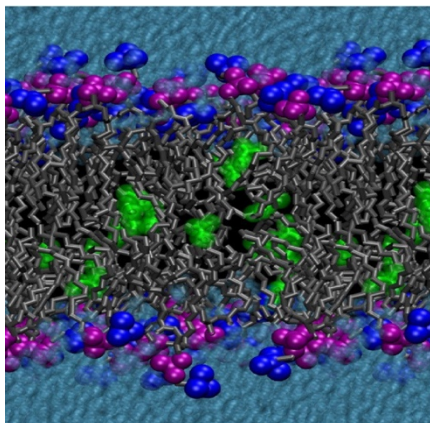


Abbildung 1-7: Molekulare Struktur eines DMPC-Bilayers in Wasser

DMPC-Bilayer nach Zugabe von 20 mol% Isopren (Isopren: Lipid=16:64) bei 353 K (Siwko et al. 2007)

Abbildung 1-7 zeigt eine Lipiddoppelschicht, welche von Wasser (hellblau) umgeben ist. In blau (Cholin) und in violett (Phosphat) sind die hydrophilen Köpfe dargestellt. Die Kohlenwasserstoffketten, welche nach innen gerichtet sind, sind grau markiert. Die Isoprenmoleküle, welche in die Membran integriert sind, sind in grün dargestellt.

Da es sich, wie bereits oben erwähnt, bei Isopren um ein hydrophobes Molekül handelt, bevorzugt Isopren die Einlagerung innerhalb der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, so dass in diesem Bereich auch die höchsten Isoprenkonzentrationen beobachtet werden konnten. Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass die Isoprenmoleküle nicht starr in der Lipiddoppelschicht interkaliert sind, sondern ihren Ort innerhalb weniger nanosek. wechseln können. Da in dem Bereich der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten die geringste Lipiddichte vorherrscht, wird die Einlagerung der Isoprenmoleküle begünstigt und führt schließlich zu einer erhöhten Lipiddichte. Dadurch wird eine stabilere Konformation der Kohlenwasserstoffketten erreicht, was letztendlich die Membranfluidität positiv beeinflusst. Der flexible und schnelle Ortswechsel, als auch die Verteilung der Isoprenmoleküle scheint dabei nahezu unabhängig davon zu sein, ob es sich bei den Kohlenwasserstoffketten um gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren handelt.

Mithilfe der NMR-Technik ist es Siwko et al. gelungen den Einfluss von Isopren auf die Membranfluidität zu beweisen. Die Fluidität der Membran wird dabei in S_{CD} angegeben. Liegen die Kohlenwasserstoffketten ungeordnet in der Lipiddoppelschicht vor, so liegt der S_{CD} -Wert bei 0, die geordnete Ausrichtung der Kohlenwasserstoffketten liefert demnach einen Wert von 0.5. Siwko et al. konnte mit dieser Methode eine Zunahme des S_{CD} -Wertes in Anwesenheit von 20 mol% Isopren belegen (Siwko et al. 2007) (Abbildung 1-8).

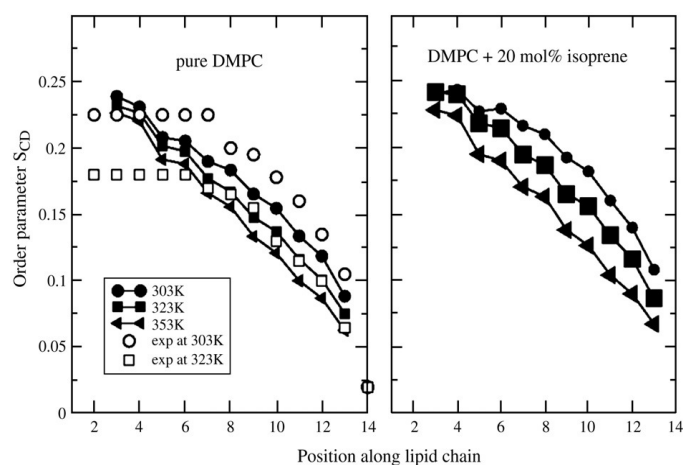


Abbildung 1-8: S_{CD} -Werte der Kohlenstoffatome einer DMPC-Doppelschicht in Abhängigkeit von Temperatur und Isopren

Darstellung der S_{CD} -Werte der C-Atome einer Kohlenwasserstoffkette in Ab- (links) und Anwesenheit (rechts) von 20 mol% Isopren. Die ausgefüllten Symbole stammen aus der Simulation, die unausgefüllten Symbole wurden experimentell ermittelt (Siwko et al. 2007).

In Abbildung 1-8 wird die Membranfluidität in Abhängigkeit von der Temperatur als auch von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Isopren verdeutlicht. Das C1-Atom ist das Carbonyl-

C-Atom, welches sich am nächsten der hydrophilen Kopfgruppe befindet und weist somit auch den höchsten S_{CD} -Wert auf, da an dieser Position die höchste Dichte der Kohlenwasserstoffketten vorliegt. Die Dichte als auch der S_{CD} -Wert nehmen in Richtung der Enden der Kohlenwasserstoffketten stetig ab. In Anwesenheit von Isopren lagen die S_{CD} -Werte bei gleichen Temperaturen insgesamt höher, so dass gezeigt werden konnte, dass Isopren die Dichte der Kohlenwasserstoffketten erhöht. Diese Ergebnisse beweisen schließlich, dass Isopren als eine Art Gegenspieler der temperaturbedingten Entropieerhöhung in der Membran fungiert, welcher die Fluidität der Membran herabsetzt (Siwko et al. 2007).

Eine weitere Besonderheit von Isopren ist, dass dieser ungesättigte Kohlenwasserstoff extrem flüchtig ist, so dass die Konzentration in der Membran mit sinkender Temperatur wieder schnell abnehmen kann. Die vorübergehende Ausschüttung von Isopren ermöglicht es der Pflanze, Photosynthese auch unter extremen Temperaturen zu betreiben. Ob und wie sich Isopren auf Transportprozesse in der Plasmamembran auswirkt ist bisher noch nicht vollständig aufgedeckt.

1.1.7 Der Einfluss von Hitze auf Transportproteine

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Temperaturabhängigkeit und der Einfluss von Isopren auf Transportproteine untersucht werden. Als Modelltransporter wurden hierzu Protonengekoppelte Saccharosetransporter aus der hitzetoleranten Dattelpalme und dem Mais vergleichend charakterisiert. Diese sekundär aktiven Transporter durchlaufen eine ausgeprägte Konformationsänderung während ihres Transportzyklus. Deshalb sollte die Umgebungstemperatur die Transportaktivität dieses Transportertyps deutlich beeinflussen. Ob und in wie weit Isopren den Transmembrantransport beeinflusst, ist derzeit völlig unbekannt und soll im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet werden.

1.2 Sekundär aktive Transporter

Saccharose, Aminosäuren und anderen Assimilate werden in Pflanzen durch H^+ -gekoppelte Transporter bewerkstelligt (Komor, Rotter, and Tanner 1977; Li and Bush 1990; Boorer, Loo, and Wright 1994; Jamai, Chollet, and Delrot 1994; Frommer et al. 1995; Rentsch et al. 1995; Chen and Bush 1997; Slewinski, Meeley, and Braun 2009). Die Translokation des Substrats kann sowohl im Symport als auch im Antiport mit Protonen erfolgen, bei der die protonenmotorische Kraft als Antrieb genutzt wird. Aus diesem Grund werden diese Transportproteine auch sekundär aktive Transporter genannt und können Transportraten von

300 bis 1000 Molekülen pro Sekunde erreichen (Sze, Li, and Palmgren 1999). Bei Symportern erfolgt der Substrat- und Kationentransport in die gleiche Richtung, wohingegen bei Antiportern das Substrat in entgegengesetzte Richtung des Kations transportiert wird. Zur Energetisierung des Transports wird ein, vorher unter Energieverbrauch generierter, transmembraner Ionengradient genutzt, der im Falle von Pflanzen durch ATP-getriebene Protonenpumpen in der Plasmamembran aufgebaut wird.

Im tierischen System sind die meisten sekundär aktiven Transporter, wie z.B. Na⁺/Glukose Kotransporter (sodium glucose linked transporter, SGLT1) an den Natriumgradienten über die Membran gekoppelt (Wright et al. 1994). In Pflanzen dagegen sind bislang ausschließlich H⁺-gekoppelte Transportprozesse bekannt (Serrano 1989; Sussman 1994; Michelet and Boutry 1995; Palmgren and Axelsen 1998; Zhao et al. 2000; Palmgren 2001; Morth et al. 2011). Anhand von Genom- und Transkriptomanalysen konnten Homologien zwischen pflanzlichen, bakteriellen und tierischen Kationen-gekoppelten Transportproteinen aufgedeckt werden, welche aufgrund bestehender Gemeinsamkeiten zu der major-facilitator-superfamily (MFS) zusammengefasst werden (Marger and Saier 1993). Sie repräsentieren mit über 10.000 Mitgliedern die größte Gruppe der sekundär aktiven Transporter und sind für den Transport von unterschiedlichen Substraten wie Zucker, Peptide, Aminosäuren und organische, wie auch anorganische Ionen verantwortlich (Saier and Ren 2006). Die Proteine der MFS bestehen aus 400-600 Aminosäuren, die sich räumlich in 12 transmembrane Domänen (TMD) und den dazwischenliegenden extrazellulären bzw. zytosolischen Schleifen anordnen. Die Proteine bestehen dabei aus zwei pseudosymmetrischen Hälften, bestehend aus jeweils 6 Transmembranen. Die beiden Hälften werden über eine lange, zytosolische Schleife, bestehend aus hydrophilen AS, zwischen den Helices VI und VII verbunden. Zusammen bilden diese beiden Hälften das funktionelle monomere Protein (Law, Maloney, and Wang 2008; Abramson et al. 2003; Huang et al. 2003).

1.2.1 Transportmechanismus Kationen-gekoppelter Transporter

Einen Meilenstein in der Struktur-Funktions-Analyse an Membrantransportern gelang mit der ersten Kristallstruktur von LacY, einem Lactose/H⁺-Symporter aus *E.coli*, welcher der MFS angehört. Im Vergleich zu Ionenkanälen, verfügen Kation-gekoppelte Transportproteine über spezifische Bindestellen für ihr Substrat und das Kation. Im Fall von LacY, wird Laktose im Symport mit Protonen transportiert.

Anhand von Struktur-Funktionsuntersuchungen in Verbindung mit Mutagenesestudien und schließlich die Kristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse ermöglichten die Aufklärung der molekularen Struktur von LacY mit einer Auflösung von 3,5 Angström (Abramson et al. 2003; Abramson, Iwata, and Kaback 2004). Die detaillierte Strukturanalyse

bestätigte die strukturellen Merkmale der MFS mit 12 transmembrane Domänen sowie der Lokalisation des N- und C-Terminus im Zytosol. Die hydrophile Tasche für die Substratbindung liegt zwischen der N- und der C-terminalen Domäne.

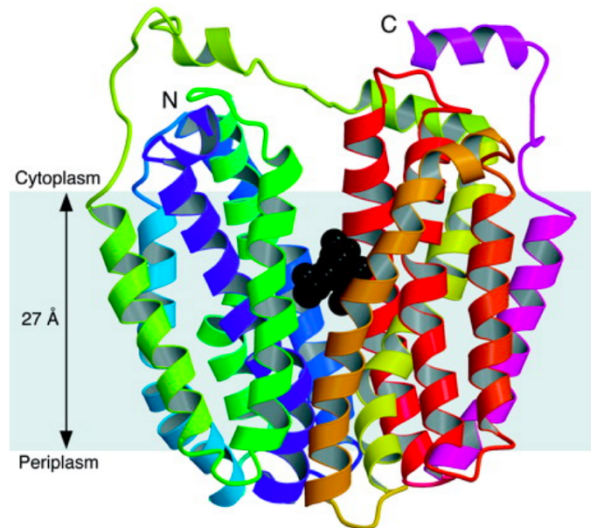


Abbildung 1-9: 3D-Struktur des Proteins LacY aus *E. coli* mit gebundenem Substrat (Abramson et al. 2003)

LacY weist eine typische Struktur mit zwölf membrandurchspannenden α -Helices auf und gehört somit der MFS („major facilitator superfamily“) an. Neben den transmembranen Domänen verfügt das Protein über einen C- und N-Terminus, deren Enden ins Zytosol ragen. Die N- und C-terminalen Hälften besitzen je 6 transmembrane Helices und bilden zusammen das funktionelle Protein mit einer Substratbindestelle.

Alle Kationen-gekoppelten Transportproteine, wie auch LacY, sind in der Lage, während des Transportzyklus zwei unterschiedliche Hauptkonformationen einzunehmen, nämlich die einwärts- und die auswärtsgerichtete Konformation (Abbildung 1-9). Im Falle der auswärtsgerichteten Konformation befindet sich die Bindestelle für das Substrat und das kotransportierte Ion auf der extrazellulären Seite der Membran, während sich die Bindestellen bei der einwärtsgerichteten Konformation auf der zytosolischen Seite befindet. Diese Konformationsänderung, wird je nach Transportprotein, von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. der Substratbindung oder dem Membranpotenzial bestimmt.

Mithilfe von Mutagenesestudien konnten sechs AS identifiziert werden, die an der Bindung von Laktose beteiligt sind. Veränderungen dieser Aminosäuren führten schließlich zu einem verändertem Transportverhalten bis hin zu Defekten in der Substratbindung und damit zum Verlust der Transportaktivität (Sahin-Toth and Kaback 2000; Zhang, Hu, and Kaback 2003).

Die Funktionalität eines Proteins wird ebenfalls durch strukturbildende Aminosäuren bestimmt, die nicht direkt mit dem Substrat oder Proton interagieren. Sie können z.B. Bestandteil weiter entfernter Transmembranen sein, oder im zytosolischen Loop liegen. Sie stellen somit zwar keine direkte Bindestelle für das Substrat dar, sind jedoch indirekt an der Substratbindung beteiligt, indem sie z.B. Salzbrücken zu benachbarten Helices bilden und dadurch das Protein stabilisieren. Mithilfe unterschiedlicher Fluoreszenz-basierter Untersuchungen gelang es ebenso, ein detailliertes 6-stufiges Modell für den Transportzyklus von LacY zu erstellen (Kaczorowski and Kaback 1979; Kaczorowski, Robertson, and Kaback 1979; Smirnova, Kasho, and Kaback 2008). Bei diesem Modell wird der auswärtsgerichtete Transporter

zunächst protoniert und bindet anschließend sein Substrat. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung in den einwärtsgerichteten Zustand entlässt das Substrat noch vor dem Proton ins Zytosol.

1.2.2 Pflanzliche Saccharosetransporter

Pflanzliche Saccharosetransporter spielen bei der apoplastischen Phloembeladung und beim Zelle-zu-Zelle Transport eine essenzielle Rolle (Lemoine 2000; Williams, Lemoine, and Sauer 2000; Lalonde et al. 2003; Sauer 2007; Dinant and Lemoine 2010; Kuhn and Grof 2010; Geiger 2011; Baker et al. 2016). Bislang wurde eine Vielzahl verschiedener Saccharosetransporter in unterschiedlichsten Pflanzenarten gefunden (Kuhn et al. 2003). Alle bisher charakterisierten Saccharosetransporter erwiesen sich als energieabhängige Protonensymporter, die Saccharose sehr spezifisch mit K_m -Werten zwischen 0,3-12 mM transportieren (Riesmeier, Willmitzer, and Frommer 1992; Lemoine et al. 1996; Lemoine 2000; Weise et al. 2000). Sie werden entweder SUT (sucrose transporter) oder SUC (sucrose carrier) genannt.

Aufgrund der großen Anzahl zur Verfügung stehender Genom- und damit auch Proteinsequenzen sind mittlerweile viele SUC-Transporter aus unterschiedlichsten Pflanzenarten identifiziert worden. Anhand von phylogenetischen Untersuchungen wurden diese in drei unterschiedlichen Typen eingeordnet, Typ I-III (Aoki et al. 2003; Reinders, Sivitz, and Ward 2012). Alle Landpflanzen besitzen Typ II und III Saccharosetransporter, wohingegen Typ I Transporter nur in Eudikotyledoden auftreten.

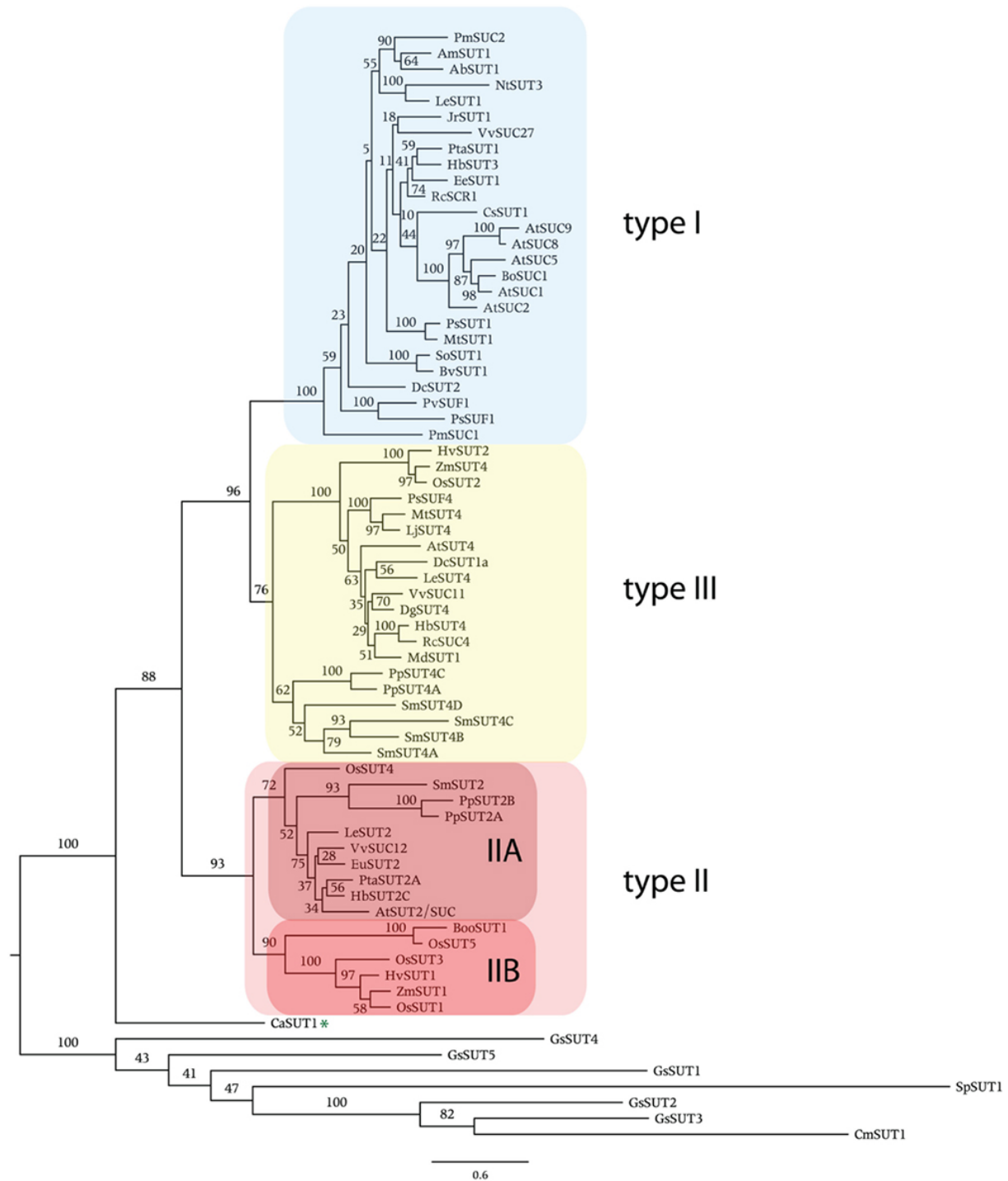


Abbildung 1-10: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher SUC-Transporter (Reinders, Sivitz, and Ward 2012).

Das Proteinalignment wurde mit ClustalX durchgeführt. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit PhyML 3.0 erstellt. Proteine, deren Sequenzen mehr als 90 % Übereinstimmung aufweisen, sind in diesem Baum nicht mit aufgeführt.

Vertreter des Typs I, wie z.B. AtSUC1, StSUT1 und LeSUT1 sind für grundlegende Funktionen wie z.B. der Phloembeladung oder das Pollenschlauchwachstum verantwortlich (Riesmeier, Willmitzer, and Frommer 1994; Gottwald et al. 2000; Sivitz, Reinders, and Ward 2008). Für die Beladung des Phloems mit Saccharose nutzen Monokotyledonen Typ II

Saccharosetransporter, wie z.B. ZmSUT1, OsSUT1 oder HvSUT1. Die Typ II Saccharosetransporter werden nochmals in zwei Untergruppen, Typ IIA und IIB, unterteilt (Braun and Slewinski 2009). Typ I und Typ II Saccharosetransporter unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Substratspezifität (Chandran, Reinders, and Ward 2003; Sivitz, Reinders, and Ward 2005; Reinders et al. 2006; Sivitz et al. 2007; Reinders et al. 2008). Während die Plasmamembran-ständigen Transporter des Typs I, neben den Substraten Saccharose und Maltose, eine relativ breite Substratspezifität für natürliche und synthetische Zucker aufweisen, transportieren Typ II Transporter sehr selektiv. Neben dem Haupttransportzucker Saccharose transportieren sie Maltose, Salicin und den synthetischen Zucker α -Phenylglykosid. Typ-III Transporter, wie zum Beispiel AtSUC4, LjSUT4 und HvSUT2 besitzen ebenfalls ein breites Substratspektrum und sind in der Vakuolenmembran lokalisiert (Reinders et al. 2008; Schulz et al. 2011).

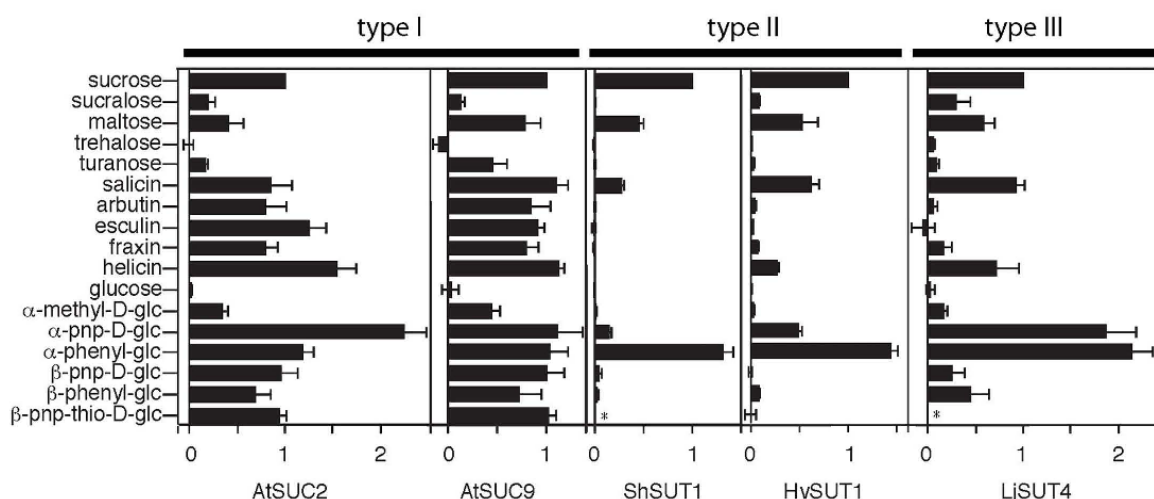


Abbildung 1-11: Substratspezifität von Typ I (AtSUC2, AtSUC9), Typ II (ShSUT1, HvSUT1) und Typ III (LjSUT4) der pflanzlichen Saccharosetransporter (Reinders, Sivitz, and Ward 2012)

Die Transportaktivität der unterschiedlichen Substrate wurde in *Xenopus* Oozyten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (TEVC-Technik) ermittelt. Die Oozyten wurden mit einer Natrium-Ringer-Lösung und unterschiedlicher Substratkonzentrationen, zwischen 0,5 und 25 mM, bei pH 5.6 umspült (abhängig von der Transporteraffinität und der Substratlöslichkeit) und bei einer Haltespannung von -121 mV aufgezeichnet. Alle Ströme wurden auf Saccharose-abhängige Ströme normalisiert und sind als Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (n=3; +/- SE) angegeben.

(At, *Arabidopsis thaliana*; Sh, *Sugarcane*; Hv, *Hordeum vulgare*; Lj, *Lotus japonicus*)

Am Beispiel von AtSUC1, LeSUT1 und anderen Transportproteinen des Typ I, konnte eine sehr hohe Affinität für Saccharose, mit K_m -Werten zwischen 0.07 und 2 mM festgestellt werden, womit sie zu den hochaffinen (high affinity) Saccharosetransportern gezählt werden (Kuhn et al. 1997; Barker et al. 2000; Sivitz et al. 2007). Die Vertreter der Typ-II Transporter wie z.B. ZmSUT1, HvSUT1 oder OsSUT1 weisen, im Vergleich zu den Typ-I Transportern, höhere K_m -Werte für Saccharose auf (von 2 bis 8 mM) und gehören damit zu den niederaffinen (low affinity) Transportern (Aoki et al. 2003; Carpaneto et al. 2005; Reinders et al. 2006).

Transporter des Typs I und Typs II sind in der Plasmamembran lokalisiert, wohingegen Typ III Transportproteine in der Vakuolenmembran anzutreffen sind. Anhand von Untersuchungen einiger Vertreter des Typs III konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen um H⁺-gekoppelte Symporter handelt, welche Saccharose zusammen mit Protonen aus der Vakuole in das Zytoplasma transportieren (Weise et al. 2000; Reinders et al. 2008; Schulz et al. 2011).

1.2.3 Der Saccharose/Protonen Symporter ZmSUT1 aus Mais

Bei dem pflanzlichen Saccharosetransporter ZmSUT1 handelt es sich um ein Protein, welches aus der monokotyledonen Pflanze Mais (*Zea mays*) stammt und einen Vertreter der Typ II Saccharosetransporter repräsentiert. Bereits im Jahre 1999 wurde die cDNA von ZmSUT1, als erster Saccharosetransporter der C₄-Pflanzen, erfolgreich kloniert und dessen Lokalisation in den source- und sink-Geweben, wie in ausgewachsenen Blattspreiten, Blattscheiden und Stängel, ermittelt (Aoki et al. 1999). Anhand einer Verlustmutante von ZmSUT1 konnte schließlich der Saccharosetransporter hinsichtlich seiner physiologischen Funktion näher beschrieben werden. Die *zmsut1*-Verlustmutante wies im Phänotyp, im Vergleich zu dem Wildtyp, ein verringertes Wachstum mit chlorotischen Blättern, frühzeitiger Seneszenz, weniger verzweigte Nebenwurzeln sowie veränderte Biomassenverteilung innerhalb der gesamten Pflanze auf. Zudem konnte eine verspätete Blütezeit mit verkümmerten Blütenständen und Sterilität beobachtet werden (Slewinski, Meeley, and Braun 2009).

Diese Ergebnisse unterstreichen die bisherigen Studien, dass ZmSUT1 ein für die Pflanze essenzielles Transportprotein ist, dessen Hauptaufgabe die Phloembeladung darstellt, da der Funktionsverlust von ZmSUT1 zu einer Hyperakkumulation von Photoassimilaten in den Blättern und damit zu einer Verringerung der Photosynthese und der Öffnungsweite der Stomata führt. Maisblätter von Wildtyppflanzen die über einen längeren Zeitraum der Kälte ausgesetzt waren, führten zur Blockierung des Phloemtransports und zeigten den gleichen Phänotyp wie *zmsut1*-Mutanten (Slewinski et al. 2010; Slewinski, Meeley, and Braun 2009).

Im Jahre 2005 wurde der Saccharosetransporter ZmSUT1 bereits im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten elektrophysiologisch mithilfe der TEVC-Technik charakterisiert (Carpaneto et al. 2005). Anhand der biophysikalischen Untersuchung war eine hinreichende Analyse hinsichtlich Transporteigenschaften von ZmSUT1 möglich. Da ZmSUT1 in der Plasmamembran des Phloems lokalisiert ist, ermöglicht dieses Protein den Transport von Saccharose in die Phloemzellen. Der Saccharosetransporter aus Mais ist, im Gegensatz zu LacY, aufgrund seiner hohen Saccharose-induzierten Protonenströme von bis zu 4 μ A hervorragend für elektrophysiologische Untersuchungen geeignet (Carpaneto et al. 2005; Wippel et al. 2010). Mithilfe der TEVC-Methode ist es möglich, die Protonenströme, die den Transport von Saccharose begleiten, über der Membran unter kontrollierten

Membranspannungsbedingungen zu detektieren. Die so ermittelten hohen Transportströme unterscheidet den Saccharose/Protonen Symporter *ZmSUT1* von allen anderen bislang bekannten Saccharosetransportern, welche lediglich Protonenströme im nA-Bereich aufweisen (Boorer et al. 1996; Zhou et al. 1997; Chandran, Reinders, and Ward 2003).

Bei den Oozyten, welche *ZmSUT1* exprimierten, kam es zu einem effizienten Import von radioaktiver ^{14}C -Saccharose mit einer Aufnahme rate von 6 nmol/Std und Oocyte, während bei uninjizierten Kontrolloozyten keine messbare Saccharoseakkumulation zu verzeichnen war (vgl. Abbildung 1-12 A). Um die gleichzeitige Aufnahme von Protonen während des Saccharosetransports von *ZmSUT1* visuell sichtbar zu machen, wurden zum einen die Saccharose-induzierten Ionenströme über die TEVC-Methode und zum anderen die pH-Änderung im Zytoplasma mithilfe H^+ -selektiver Mikroelektroden aufgenommen (vgl. Abbildung 1-12 B). Die Saccharose-induzierten Einwärtsströme waren begleitet von einer Ansäuerung des Zytosols der Oozyten.

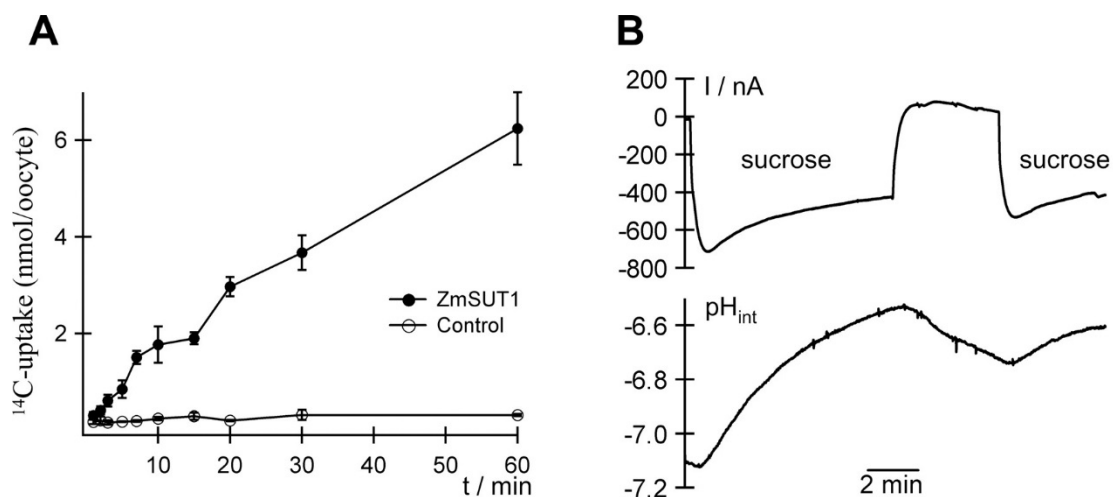


Abbildung 1-12: *ZmSUT1* repräsentiert einen Saccharose/Protonen Symporter (Carpaneto et al. 2005)

(A) Aufnahme von radioaktiver ^{14}C -Saccharose in *ZmSUT1* injizierte und nicht injizierte *Xenopus* Oozyten über eine Zeitspanne von 60 min (pH 5,6).

(B) Gleichzeitige Messung von Saccharose-induzierten Einwärtsströmen (oben) und dem zytosolischen pH-Wert (unten).

Durch diese beiden Experimente war bewiesen, dass es sich bei *ZmSUT1* tatsächlich um einen Saccharose/Protonen Symporter handelt. Zudem zeigte sich die starke pH-Abhängigkeit des Transports in deutlich abnehmenden Saccharose-induzierten Strömen bei geringeren H^+ -Konzentrationen. Bei einem pH von 4,5 konnten makroskopische H^+ -Einwärtsströme gemessen werden, während ab einem pH-Wert von 7 keine Saccharose-induzierte Transportaktivität mehr detektiert werden konnte. Weitere biophysikalische Studien unter Verwendung der Patch Clamp Technik zeigten, dass *ZmSUT1* Saccharose und Protonen mit einer Stöchiometrie von 1:1 transportiert.

ZmSUT1 gehört zu den low affinity Saccharosetransportern, da sich der K_m -Wert bei einem pH 5,6 und einem Membranpotenzial von -130 mV bei ca. 2 mM befindet. Sowohl die Affinität für Saccharose als auch für Protonen weisen eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit auf, da bei hyperpolarisierter Membranspannung die höchsten Affinitäten zu beobachten sind.

Bei der Untersuchung der apoplastischen Flüssigkeit und des Phloemsafts von Mais wurden Saccharosekonzentrationen im Apoplasten von 2-5 mM und 800-880 mM im Phloem nachgewiesen (Lohaus and Moellers 2000). Im Zytoplasma des Phloems konnte ein konstanter pH-Wert von 7,2-7,5 gemessen werden, wohingegen im Apoplasten ein pH-Wert zwischen 5 und 6 vorlag (Giaquinta 1977; Grignon and Sentenac 1991; Tetlow and Farrar 1993; Savchenko et al. 2000; Felle 2001; Hedrich et al. 2001). Das heißt, dass ZmSUT1 bei der Beladung des Phloems mit Saccharose gegen einen sehr hohen Saccharosegradienten transportieren muss. In „sink“-Gewebe sind thermodynamische Verhältnisse gegeben, die sogar eine Umkehr des Transports (Entladung des Phloems) begünstigen könnten. Ob ZmSUT1 tatsächlich in beide Richtungen transportieren kann wurde in ZmSUT1-exprimierenden Oozyten mit der inside-out giant patch clamp-Technik getestet (Carpaneto et al. 2005). In dieser Konfiguration konnte die zytosolische Saccharose-Konzentration soweit angehoben werden bis sich tatsächlich die H^+ -Ströme umkehrten. Analysen der Transportströme ergaben K_m -Werte, die eine mehr als 20-mal niedrigere Affinität von ZmSUT1 gegenüber Saccharose auf der intrazellulären Membranseite im Vergleich zur extrazellulären Seite aufzeigten. Aufgrund der Reversibilität des Zuckertransports und der Tatsache, dass ZmSUT1 sowohl in „source-“ als auch in „sink“-Gewebe exprimiert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ZmSUT1 sowohl bei der Beladung als auch bei der Entladung des Phloems mitwirkt.

Durch weitere Analysen von ZmSUT1 hinsichtlich der Saccharose- und Protonen-abhängigen transienten und transportassoziierten Ströme konnte ein erstes Modell für den Transportmechanismus entwickelt werden (Geiger 2011). 2013 konnten schließlich durch die Kombination der VCF-Methode (Spannungsklemm-Fluorometrie) und pre-steady-state Messungen sowie der Verwendung des kompetitiven Inhibitors Sucralose, einzelne Schritte im Transportzyklus von ZmSUT1 aufgelöst werden. Dabei stellte die VCF-Technik eine Möglichkeit dar, intramolekulare Bewegungen von ZmSUT1 in Echtzeit sichtbar zu machen (Mannuzzu, Moronne, and Isacoff 1996; Loo et al. 1998; Geibel et al. 2003; Derrer et al. 2013). Es stellte sich heraus, dass die Konformationsänderung des Transporters den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Transportzyklus von ZmSUT1 ist (Derrer et al. 2013).

1.3 Trockenstress

Wasser ist der Hauptbestandteil aller lebenden Zellen. Pflanzen bestehen zu 80-95 % aus Wasser, deshalb ist es für alle lebensnotwendigen Prozesse essenziell. Wasser nimmt in der Pflanzenphysiologie somit eine zentrale Rolle ein, einerseits um den Turgordruck in der Pflanzenzelle aufrechtzuerhalten und andererseits als essenzieller Bestandteil der Photosynthese. Dabei hängt die Entwicklung von Pflanzen davon ab, wie geregelt Wasseraufnahme, Wassertransport und Wasserabgabe erfolgen können.

Sobald der Pflanze zu wenig Wasser in geeignetem thermodynamischem Zustand zur Verfügung steht, spricht man von Trockenstress (Larcher 1994). Die Wasseraufnahme kann z.B. durch Bodenfrost, Bodentrockenheit oder einer eingeschränkten Ausdehnung des Wurzelsystems begrenzt werden. Trockenstress bei Pflanzen entwickelt sich im Gegensatz zu anderen Stressereignissen zunächst langsam, verstärkt sich jedoch mit der Dauer der Trockenheit (Larcher 1994). Auf Trockenstress reagieren Pflanzen in sehr unterschiedlicher Art und Komplexität. Eine Reaktion kann innerhalb von Sekunden, Minuten (Stomaschluss), Stunden (Veränderung der Genexpression), oder Tagen (morphologische Symptome) auftreten.

Bei Trockenstress weisen Blätter unterschiedliche morphologische Reaktionen, wie Welkesymptome, vermindertes Wachstum und Gewebenekrosen auf (Hassanein and Dorion 2006). Eine weitere Anpassung als Reaktion auf diesen abiotischen Stressfaktor stellt die verstärkte Ausbildung des Wurzelsystems dar, um eine Maximierung der Wasseraufnahme erzielen zu können.

Neben diesen genannten Anpassungsmaßnahmen müssen sich Pflanzen bei Trockenheit vor Dehydrierung schützen. Da die Kutikula hydrophob ist, erfolgt der Gasaustausch über spezielle regulierbare Poren (Stomata), die in den meisten zweikeimblättrigen Pflanzen aus zwei spezialisierten Epidermiszellen, den Schließzellen, bestehen (Bergmann and Sack 2007). Der Gasaustausch über die Stomata gewährleistet zum einen die Kühlung der Blattoberfläche und zum anderen stellt sie die CO₂-Aufnahme aus der Luft sicher, um photosynthetisch aktives Gewebe ausreichend mit Kohlendioxid zu versorgen. Durch die Transpiration erhöht sich jedoch der Wasserverlust um bis zu 70%, obwohl die Stomaöffnungen nur einen geringen Teil der Blattoberfläche darstellen (Willmer and Fricker 1996). Am Anfang der Trockenphase werden die Stomata daher geschlossen, um einen weiteren Wasserverlust zu vermeiden und um das Wasserpotenzial im Blatt sowie zelluläre Prozesse weiterhin aufrechterhalten zu können. Jedoch führt dies mit der Zeit zu einem Anstieg der Blatttemperatur (Cook, Dixon, and Leopold 1964).

Pflanzen reagieren aber auch auf physiologischer Ebene auf Trockenheit. Die Pflanze versucht unter diesen extremen Bedingungen z.B. auch eine flexible Anpassung des

osmotischen Potenzials zu erreichen, indem sie osmotisch aktive Substanzen synthetisiert und die Konzentration dieser Osmotika mittels Transport- und Biosyntheseprozessen reguliert (Verslues and Juenger 2011). So produzieren viele Pflanzen v.a. Prolin, Polyole, Trehalose sowie Betaine als osmotische Anpassungsreaktion (Yamada et al. 2005; Hare and Cress 1997; Hayat et al. 2012). In diesem Zusammenhang spielen auch Zucker sowie organische und anorganische Ionen aufgrund ihrer Ladung und polaren Eigenschaften eine wichtige Rolle.

Daneben spielt auch das effiziente Abwenden reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) eine entscheidende Rolle, um Schäden an Proteinen und zellulären Membranen abzuwenden. Dies wird durch die Synthese protektiver Proteine und Substanzen wie z.B. Antioxidantien, Dehydrine sowie Radikalfänger bewerkstelligt (Gadjev et al. 2006). Pflanzen sind aber auch in der Lage, Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA), Ethylen oder Salizylsäure aufgrund von Stressfaktoren wie Trockenheit, niedrigen Temperaturen oder Salz zu bilden. Dabei hat das Phytohormon ABA eine essenzielle Bedeutung in der Stress-Signaltransduktion. Die Hauptaufgabe von ABA ist die Regulation der pflanzlichen Wasserbalance sowie die osmotische Stresstoleranz (Wang et al. 2011; Xiong and Zhu 2003; Zhu 2002). Die Akkumulation und Freisetzung von ABA induziert schließlich den Stomataschluss (Zhu 2002; Schultz and Stoll 2010). Das Schließen der Stomata als Reaktion auf Wassermangel sowie die Verminderung des Wachstums ist als frühe pflanzliche Gegenmaßnahme bei Trockenheit bekannt und schützt die Pflanze vor Wasserverlust, Dehydrierung, Xylemkavitationen und dem Tod (Chaves, Maroco, and Pereira 2003; Chaves et al. 2002).

1.3.1 Die Stomata und ihre Funktion

Aufgrund der unregelmäßigen Wasserverfügbarkeit sind viele Landpflanzen darauf angewiesen ihren Wasserhaushalt so zu steuern, dass sie sich an die unterschiedliche Verfügbarkeit anpassen können (Raven 2002). Das Leitgewebe und die Wurzel haben dabei die Aufgabe die gesamte Pflanze mit dem zur Verfügung stehenden Wasser zu versorgen. Die Kutikula dagegen wirkt der unregulierten Transpiration von Wasser aus dem Spross entgegen. Um trotz der Anwesenheit der Kutikula noch effizient Photosynthese betreiben zu können und um den Transport von Wasser und Nährsalzen über den Transpirationssog in die Blätter zu gewährleisten, verfügen Pflanzen über Stomata, die die Transpiration und CO₂-Versorgung regulieren. Die ersten Stomata sind vor ca. 400 Millionen Jahren entstanden. Sie bestehen aus zwei symmetrisch gegenüberliegenden Epidermiszellen, über welche die Pflanze den Wasserverlust an die Atmosphäre reguliert und zudem eine geregelte CO₂-Aufnahme steuert (Cowan and Farquhar 1977; Edwards, Kerp, and Hass 1998). Durch eine gleichmäßige

Verteilung dieser Schließzellen auf der Blattoberfläche, wird eine ausreichende Versorgung mit Gasen in den inneren Geweben gewährleistet (Peterson, Rychel, and Torii 2010).

Generell gibt es zwei anatomisch unterschiedliche Schließzelltypen. Die meisten zweikeimblättrigen Pflanzen verfügen über zwei relativ große nierenförmige Schließzellen (Helleborustyp), während einkeimblättrige Pflanzen, wie die Gräser, zwei schmale, hantelförmige Schließzellen (Gramineentyp) besitzen, die von zwei oder mehr Nebenzellen umgeben sind (Willmer and Fricker 1996).

Die Stomata monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen unterscheiden sich nicht nur morphologisch voneinander, sondern auch hinsichtlich ihrer Anordnung. Während sich bei den meisten Pflanzenarten die Stomata in der unteren Epidermis der Blätter befinden, sind die Stomata bei den Gräsern sowohl auf der Blattunter-, als auch auf der Blattoberfläche anzutreffen.

Die Stomata sind somit für die Pflanze unentbehrlich, um bei geringer Wasserverfügbarkeit oder erhöhter Transpiration bei niedriger Luftfeuchtigkeit, ihren Wasserverlust möglichst gering zu halten, aber trotzdem noch effizient Photosynthese zu betreiben (Cowan and Farquhar 1977; Wong, Cowan, and Farquhar 1979). Aufgrund der morphologischen Besonderheit der Stomata von Gräsern (hantelförmige Schließzellen, welche von Nebenzellen umgeben sind) sind diese in der Lage effizienter CO_2 aufzunehmen, während sie den Wasserverlust begrenzen.

1.3.2 Die Stomabewegung

Landpflanzen sind in der Lage auf ihre Umwelteinflüsse zu reagieren, indem sie ihre Stomata öffnen und schließen. Bei guter Wasserversorgung öffnen Pflanzen ihre Stomata, so dass Sauerstoff und Wasserdampf entweichen und Kohlendioxid einströmen kann. Bei Wassermangel dagegen schließen sie ihre Stomata und verhindern somit, dass Wasser verdunstet. Jedoch befinden sich Pflanzen in dem Dilemma, dass sie bei geschlossenen stomatären Poren nicht mehr in der Lage sind CO_2 aufzunehmen, so dass ihre Photosynthese zum Erliegen kommt. D.h. Pflanzen müssen eine fein abgestimmte Regulation der Stomataöffnungsweite besitzen, um adäquat auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können.

Bei der Stomabewegung handelt es sich um eine nastische Bewegung, die durch eine Änderung des Turgordrucks in den Schließzellen hervorgerufen wird. Die Öffnungsweite der Stomata wird dabei durch den Turgordruck in den beiden Schließzellen reguliert. Steigt der Turgordruck so öffnet sich das Stoma, fällt der Turgordruck ab, so schließt es sich (Franks et al. 2001). Einen Einfluss auf die Öffnungsweite der Stomata haben aber auch die wesentlich größeren Epidermiszellen, welche die Schließzellen umgeben. Aufgrund ihrer Größe im

Vergleich zu den Schließzellen selbst, haben sie einen „mechanischen Vorteil“ (DeMichele and Sharpe 1973) und kompensieren den Druck der Stomata (Klein et al. 1996). Sie dienen als Widerlager für die Bewegung der Schließzellen.

Dabei hängt der Turgordruck der Schließzellen von der Konzentration an osmotisch-aktiven Substanzen in den beiden Schließzellen ab. Bei der Stomaöffnung werden osmotisch-aktive Substanzen wie Zucker, sowie andere organische und anorganische Ionen in den Schließzellen akkumuliert und erniedrigen so das Wasserpotenzial. Daraufhin strömt Wasser aus dem Apoplasten in die Schließzellen. Bei einer Verringerung der Konzentration gelöster Substanzen dagegen strömt das Wasser in den Apoplasten zurück. Das Wasserpotenzial wird also ausgeglichen, indem es vom Ort mit höherem Wasserpotenzial zu dem Ort mit niedrigerem Wasserpotenzial fließt (Taiz and Zeiger 2014). Für den Transport von osmotisch aktiven Ionen über die Plasmamembran sind membranständige Transportproteine verantwortlich, welche Ionen spezifisch transportieren können. Das Wasser kann dagegen durch biologische Membrane diffundieren und folgt dabei stets dem osmotischen Gradienten. Jedoch erfolgt ein Großteil des Wassertransports nicht durch reine Diffusion, sondern über so genannte Aquaporine. Dabei handelt es sich um wasserpermeable Proteine, welche den Wassertransport beschleunigen (Shope and Mott 2006; Fraysse et al. 2005). Die osmotisch-aktiven Substanzen in den Schließzellen werden nur zum Teil im Zytosol belassen, da zu hohe Ionenkonzentrationen im Zytosol toxisch wirken können, wird ein großer Teil in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (Boller and Wiemken 1986; MacRobbie 2006; Martinoia, Maeshima, and Neuhaus 2007).

1.3.3 Stimuli der Stomabewegung

Durch die kontrollierte Regulation der Stomatabewegung ist die Pflanze in der Lage die Rate des Wasserverlustes zu minimieren. Die Öffnungsweite sowie die Regulation der Stomata sind sowohl an die photosynthetischen Bedürfnisse sowie an den Wasserhaushalt der Pflanze angepasst. Wird Kohlenstoffdioxid für die Photosynthese benötigt, öffnen die Stomata, während sie bei zu hohem Wasserverlust schließen (Cowan and Farquhar 1977; Edwards, Kerp, and Hass 1998).

Sobald das Sonnenlicht auf die Pflanze trifft, wird die Photosynthese stimuliert und die Stomata öffnen sich, welche solange geöffnet bleiben bis die Dunkelheit eintrifft. Wird dieser Mechanismus durch ungünstige Bedingungen gestört so reagieren die Stomata spezifisch auf den neuen Stresstimulus (Kim et al. 2010). Neben Sonnenlicht, begünstigen auch andere Faktoren wie z.B. eine geringe CO_2 -Konzentration sowie ein solides Wasserangebot die Stomaöffnung (Roelfsema and Hedrich 2005).

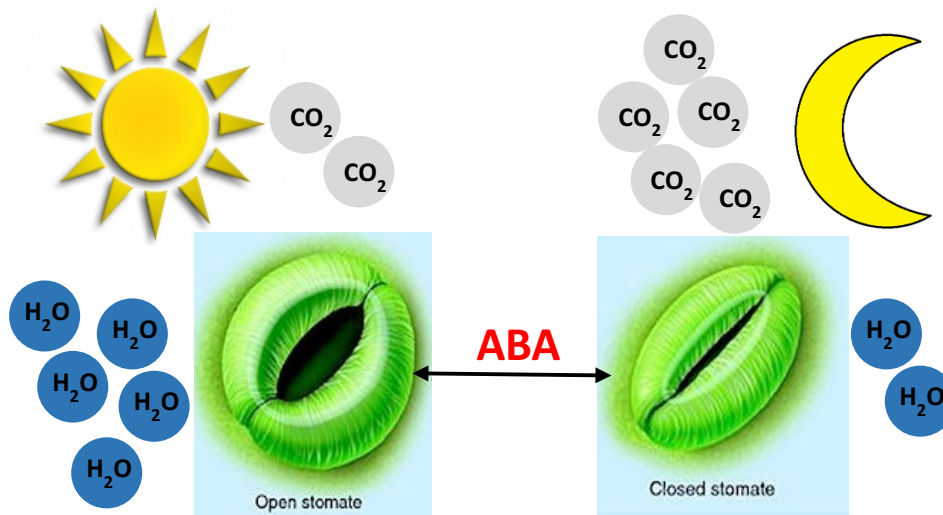


Abbildung 1-13: Die Stomabewegung wird durch unterschiedliche Umwelteinflüsse reguliert

So kommt es zum Beispiel zum Stomaschluss infolge einer zunehmenden inneren CO_2 -Konzentration, bei hohen Temperaturen, Pathogenattacken, geringer Luftfeuchtigkeit oder Trockenheit (Schroeder, Kwak, and Allen 2001) (Abbildung 1-13).

1.3.4 Die Stomaöffnung

Sobald ausreichend Wasser vorhanden ist öffnen Stomata von C_3 -Pflanzen im Licht, um Photosynthese zu betreiben. Außerdem öffnen sich Stomata infolge einer abnehmenden inneren CO_2 -Konzentration sowie bei Belichtung mit Blaulicht (Roelfsema and Hedrich 2005). Dieses Blaulicht wird von den Photorezeptoren PHOT1 und PHOT2 registriert woraufhin es zu einer Aktivierung der plasmamembran-ständigen Protonenpumpen, H^+ -ATPasen, kommt (Emi, Kinoshita, and Shimazaki 2001; Kinoshita and Shimazaki 2001; Shimazaki et al. 2007; Takemiya et al. 2013). H^+ -ATPasen pumpen unter dem Verbrauch von ATP, Protonen aus dem Zytoplasma in den Apoplasten, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht (Lohse and Hedrich 1992). Vor allem mit der Hilfe dieses elektrischen Gradienten (hyperpolarisiertes Membranpotenzial) kommt es zu einem Kaliumstrom in die Zelle (Very et al. 1995; Hoth et al. 1997; Roelfsema and Hedrich 2005). Für den Transport von Kalium in

die Schließzellen sind K^+ -selektive einwärtsrichtende Kanäle in der Plasmamembran verantwortlich (Schroeder, Hedrich, and Fernandez 1984).

Als Gegenionen, zu dem in den Apoplasten aufgenommenem Kalium, dienen vor allem Chlorid und Nitrat, welche höchstwahrscheinlich durch Symport mit apoplastischen Protonen aufgenommen werden (Guo, Young, and Crawford 2003; MacRobbie 1984). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch andere osmotisch aktive Substanzen, wie Zucker und Malat, in den Schließzellen akkumulieren und ebenfalls bei der Stomabewegung von Bedeutung sind (Allaway 1973).

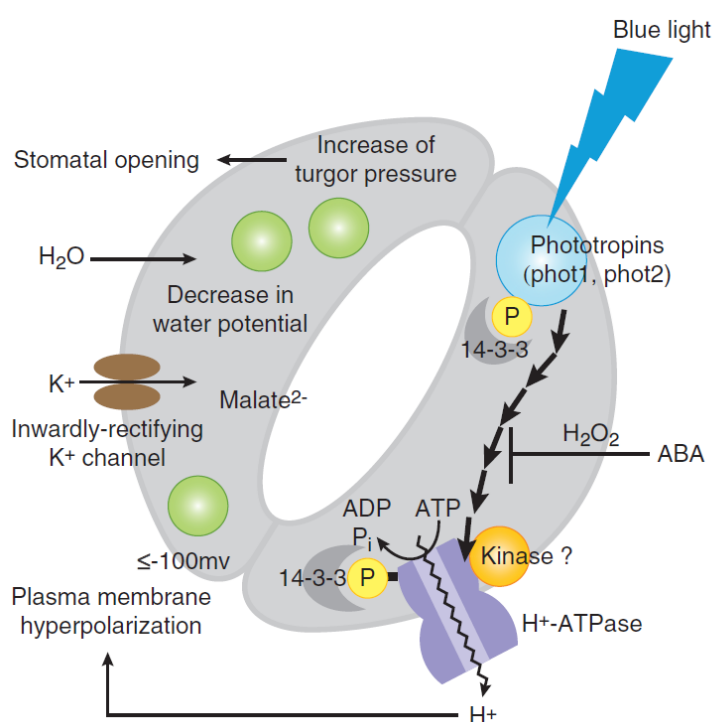


Abbildung 1-14: Blaulicht induziert die Stomaöffnung (Shimazaki et al. 2007)

Durch die Aktivierung der H^+ -ATPase mittels Blaulicht, kommt es zur Hyperpolarisation der Plasmamembran. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von K^+ -Einwärtsgleichrichtern, wodurch es zum K^+ -Einstrom kommt und gleichzeitig Wasser nachströmt, so dass der Turgordruck ansteigt und sich die Stomata öffnet.

1.3.5 Der Stomaschluss

Mithilfe der Regulation der Stomabewegung sind Pflanzen in der Lage auf die Änderungen äußerer Umwelteinflüsse zu reagieren. Bei Wasserknappheit spielt der Stomaschluss eine entscheidende Rolle, da die Pflanze durch das Schließen der Spaltöffnung den Wasserverlust reduziert. Daneben gibt es aber noch viele andere Umweltfaktoren, wie beispielsweise Dunkelheit, erhöhte CO_2 -Konzentration oder Salzstress, die den Stomaschluss einleiten. Besonders bei Trockenheit spielt das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) eine große Rolle, da es das Schließen der Stomata schnell einleitet (MacRobbie 1998). Liegt eine erhöhte CO_2 -Konzentration vor, kann die Pflanze mehr Kohlenstoffdioxid aufnehmen, woraufhin sich die

Spaltöffnung der Schließzellen verkleinern und es nicht unnötig zu einem Wasserverlust kommt.

Der Stomaschluss erfolgt generell deutlich schneller als die Stomaöffnung (Langer et al. 2004). Vermutlich erfolgt der Stomaschluss schneller, da bei dieser mechanischen Bewegung andere Transportmechanismen beteiligt sind. Während die Stomaöffnung hauptsächlich über aktive und sekundäraktive Transportmechanismen zur Schließzellenbeladung gesteuert werden, wird der Stomaschluss größtenteils über den passiven Transport von Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle reguliert (Roelfsema and Hedrich 2005).

1.3.6 Das Trockenstresshormon ABA

Der inhibitorische Effekt des Phytohormons ABA (**abscisic acid**/Abscisinsäure) auf die Transpiration unter Trockenstressbedingungen wurde bereits in den 1960er Jahren aufgedeckt (Little and Eidt 1968; Mittelheuser and Vansteve.Rf 1969). Bei Trockenstress wird die Biosynthese von ABA induziert, was in einem Anstieg der ABA-Konzentration in den Blättern resultiert (Harris et al. 1988). Die Biosynthese des Phytohormons wird jedoch auch durch andere Stressfaktoren, wie zum Beispiel Kälte- oder Salzstress eingeleitet. Daraufhin kommt es zum Ausstrom von Kationen und Anionen, woraufhin das osmotische Potenzial abnimmt. Daraus resultiert ein Absinken des Turgordrucks und letztendlich der Stomaschluss (MacRobbie 1998).

Das Phytohormon ABA gehört zur Klasse der Isoprenoiden bzw. Terpenoiden (Nambara and Marion-Poll 2005; Okamoto et al. 2005). Es besteht aus insgesamt 15 C-Atomen und wird durch die Spaltung von C₄₀-Carotinoiden in den Plastiden gebildet (Milborrow and Lee 1998). Die für die ABA-Synthese verantwortlichen Enzyme, NCED3 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3), ABA2 (ABA deficient 2), und AAO3 (abscisic aldehyde oxidase 3) wurden anfänglich hauptsächlich in den Leitbündeln von Wurzeln entdeckt (Cheng et al. 2002; Tan et al. 2003; Koiwai et al. 2004), so dass bis dahin angenommen wurde, dass ABA in der Wurzel gebildet, anschließend über das Xylem in die Blätter, schließlich zu den Schließzellen transportiert wird (Wilkinson and Davies 2002). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass unter Trockenstress NCED3 im Parenchym der Leitbündel in Blättern akkumuliert wird und an diesem Ort auch ABA2 und AAO3 exprimieren (Koiwai et al. 2004; Endo et al. 2008). Die Annahme, dass die Lokalisation der ABA-Synthese in den Blättern stattfindet, konnte durch weitere Analysen bestätigt werden (Holbrook et al. 2002; Christmann et al. 2005; Christmann et al. 2007; Ikegami et al. 2009).

Der Transport von ABA von den Leitgeweben der Blätter zu den Schließzellen konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre der polare Transport über spezifische Transporter. Es ist aber auch denkbar, dass ein passiver Transport mit dem

Wasserfluss stattfindet, da ABA im protonierten Zustand auch durch die Plasmamembran diffundieren kann. Handelt es sich dabei tatsächlich um eine passive Diffusion, kann ABA, ohne Einfluss von spezifischen Transportern, von niedrigeren pH-Wert- zu höheren pH-Bedingungen transportiert werden, wie es beim Eintritt in die Zelle der Fall wäre. Für den Export von ABA aus der Zelle wäre dann jedoch ein spezifischer ABA-Transporter nötig (Wilkinson and Davies 2002), da im Apoplasten (pH 5-6) ein saureres Milieu als im Zytosol (pH 7.2-7.4) anzutreffen ist. Erst vor wenigen Jahren wurde ein ABC-Transporter, AtABCG25, entdeckt, welcher im Leitgewebe exprimiert wird und dafür verantwortlich ist, ABA aus der Zelle zu transportieren (Kuromori et al. 2010). Des Weiteren wurde ein zweiter ABC-Transporter, AtABCG40, in den Schließzellen gefunden, welcher für die Aufnahme von ABA in die Zelle verantwortlich ist (Kang et al. 2010). Eine Publikation von Bauer et al. zeigte schließlich, dass Schließzellen auch autonom ABA synthetisieren können und unabhängig vom ABA-Import auf niedrige Luftfeuchtigkeit mit einem Stomaschluss reagieren (Bauer et al. 2013).

1.4 Die ABA Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt, spielt das Phytohormon ABA eine wichtige Rolle bei der Anpassung an unterschiedliche Stressfaktoren, wie z.B. Salz-, Kältestress und Wassermangel. Mithilfe genetischer Analysen, Proteininteraktionsstudien sowie Untersuchungen der Stomaregulation konnten unterschiedliche Komponenten der ABA-Signaltransduktionskaskade identifiziert werden. Die Entdeckung dieser einzelnen Komponenten der Signalweiterleitung geben somit Aufschluss, wie genau sie in der Lage sind das Signal in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Zelltypen der Pflanze zu erkennen und schließlich in eine physiologische Reaktion umzuwandeln (Finkelstein 2006). Bei der ABA-Signalkaskade unterscheidet man zwischen einer schnellen und einer langsamen Reaktion.

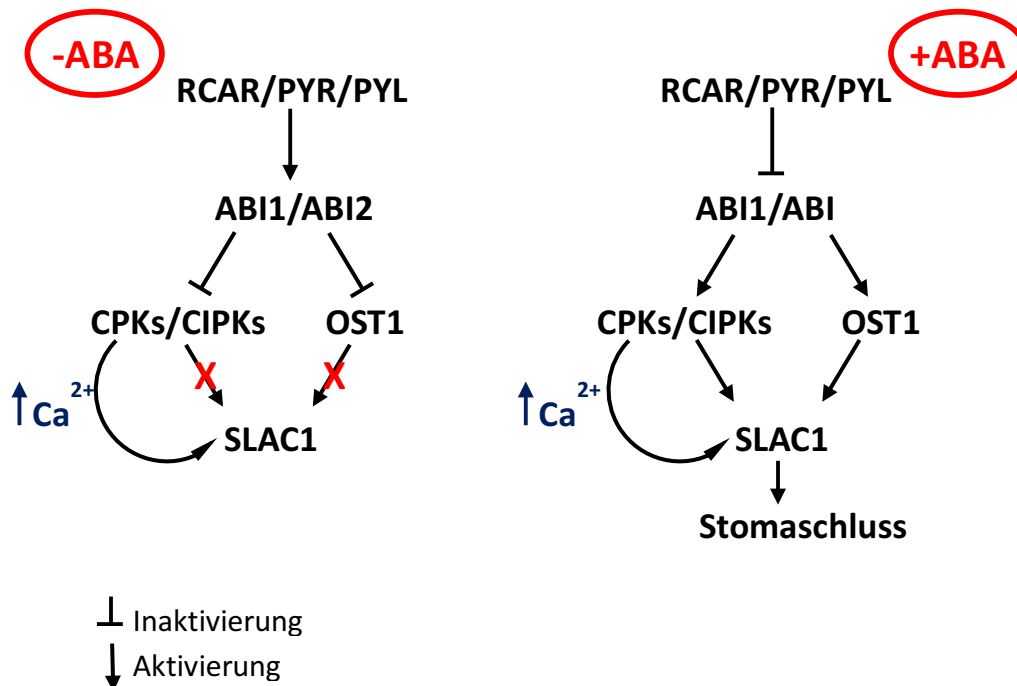


Abbildung 1-15: ABA-Signalkaskade aktiviert den S-Typ Anionenkanal SLAC1 (moduliert nach (Geiger et al. 2009))

In Abwesenheit von ABA sind die PP2C-Phosphatasen ABI1/2 aktiv und inhibieren die Aktivität von SLAC1-aktivierenden Kinasen (Ca^{2+} -abhängige Kinasen der CPK oder CIPK/CBL Familie sowie die Ca^{2+} -unabhängige Kinase OST1 aus der SnRK2 Familie) (linke Abb.). In Anwesenheit von ABA bindet der PYR/PYL-ABA-Rezeptor ABA und inhibiert die Aktivität der PP2C-Phosphatasen ABI1 und 2. Daraufhin autophosphorylieren sich die Kinasen und werden aktiv. Infolgedessen kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des S-Typ Anionenkanals SLAC1. Die Aktivität von SLAC1 initiiert wiederum den Stomaschluss (rechte Abb.).

Bei dem langsamen ABA-Signalweg hat ABA einen Einfluss auf die Regulation der Genexpressionen, die für die Pflanzenentwicklung oder auch für die langfristige Anpassung an verschiedene Stressfaktoren verantwortlich sind (Zeevaart and Creelman 1988; Fujii et al. 2009). Neben diesem langsamen ABA-Reaktionsweg wurde in den Schließzellen auch eine schnelle Reaktion auf ABA beobachtet, bei welcher ABA innerhalb weniger Minuten zum Stomaschluss führt (Abbildung 1-15) (Little and Eidt 1968; Mittelheuser and Vansteve.Rf 1969; Harris et al. 1988). Der Anfang der langsamen und schnellen ABA-Signalkaskade in den Schließzellen wird dabei von denselben Komponenten bewerkstelligt (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010). Zu Beginn des ABA-Signalwegs spielen die Rezeptorproteine der PYR/PYL/RCAR-Familie, welche in gelöster Form im Zytoplasma vorliegen, eine entscheidende Rolle (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Mithilfe der yeast-two-hybrid Methode konnte gezeigt werden, dass es zu einer ABA-abhängigen Interaktion zwischen Rezeptor und verschiedenen Phosphatasen der PP2C-Familie ABI1/2 (ABA-insensitiv 1/2) und HAB1/2 (Homolog zu ABI1/2)-Familie kommt und dadurch die Aktivität dieser Phosphatasen inhibiert (Leonhardt et al. 2004; Santiago et al. 2009; Soon et al. 2012). Aufgrund der negativen Regulation der Phosphatasen der PP2C-Familie werden daraufhin Ca^{2+} -abhängige sowie

Ca²⁺-unabhängige Kinasen aktiviert (Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2006). Eine zentrale Rolle für den langsamen Signalweg von ABA spielt dabei die Ca²⁺-unabhängige Kinase OST1 (open stomata 1/SnRK2.6) (Hrabak et al. 2003), welche die Genexpression von ABA-abhängigen Genen reguliert (Yoshida et al. 2006). Bei der schnellen ABA-Signalkaskade dagegen kommt es zum Stomaschluss, indem die Kinase OST1 durch Interaktion mit R- und S-Typ Anionenkanälen diese direkt aktiviert (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011; Scherzer et al. 2012; Imes et al. 2013). Durch die Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle, wie z.B. SLAC1 (SLOW Anion Channel 1), kommt es zum Anionenausstrom aus der Schließzelle, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran der Zelle führt (Schroeder and Keller 1992; Grabov et al. 1997; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009). Diese Depolarisation führt schließlich zur Aktivierung von K⁺-Auswärtskanälen, so dass neben Anionen auch Kationen aus der Zelle ausströmen. Dies resultiert wiederum in einer Abnahme des Turgordrucks der Schließzellen, was letztendlich zum Stomaschluss führt (Ache et al. 2000; Becker et al. 2003; Hosy et al. 2003).

1.4.1 Die Beteiligung von Anionenkanälen

Durch die Aktivierung der Anionenkanäle kommt es zu einem Ausstrom von Anionen, was in zu einer Depolarisation der Plasmamembran der Schließzelle führt. Anhand von patch-clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba*, wurden zwei unterschiedliche Anionenkanaltypen nachgewiesen; die R-Typ (rapid type)- und die S-Typ (slow type)-Anionenkanäle (Hedrich, Busch, and Raschke 1990; Linder and Raschke 1992; Schroeder and Keller 1992). Diese beiden Typen unterscheiden sich vor allem in ihrer Aktivierungs- bzw. Deaktivierungskinetik. R-Typ Anionenkanäle aktivieren/deaktivieren spannungsabhängig innerhalb weniger Millisekunden (Mumm et al. 2013). S-Typ Anionenkanäle weisen dagegen nur eine schwache Spannungsabhängigkeit auf und die Aktivierung bzw. Deaktivierung verläuft im Sekundenbereich deutlich langsamer ab (Linder and Raschke 1992; Schroeder and Keller 1992; Dietrich and Hedrich 1994).

Sowohl der S- als auch der R-Typ Anionenkanal ist beim Stomaschluss beteiligt, jedoch leisten sie unterschiedliche Beiträge, welcher von den verschiedenen Umwelteinflüssen abhängt. Bei Trockenstress werden sowohl die R-Typ- als auch die S-Typ Anionenkanäle durch ABA aktiviert (Roelfsema, Levchenko, and Hedrich 2004). Ein Anstieg des CO₂-Partialdrucks dagegen löst lediglich eine zuverlässige Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle aus, während die R-Typ Kanäle teilweise sogar deaktiviert werden können (Raschke 2003).

1.4.2 Der S-Typ Anionenkanal

Der erste S-Typ Anionenkanal in der Schließzelle wurde im selben Jahr unabhängig von zwei Forschergruppen bei der Untersuchung von Arabidopsis Mutanten hinsichtlich der O₃-Sensitivität und der CO₂-Insensitivität entdeckt (Kangasjarvi, Jaspers, and Kollist 2005; Negi, Hashimoto, and Iba 2005). Die untersuchten Arabidopsis Mutanten *rcd3* (radical induced cell death 3) und *cdi3* (carbon dioxide insensitive 3) wiesen Mutationen im gleichen Gen (AtSLAC1) auf, welche, seitdem die Funktion des Proteins entschlüsselt wurde, in SLAC1 (SLOW Anion Channel associated 1) umbenannt wurde (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Anhand von Untersuchungen von SLAC1-Verlustmutanten konnte man feststellen, dass die Reaktion des Stomaschlusses auf wesentlich beteiligten Stimuli wie z.B. CO₂ oder ABA gestört war. In den Schließzellen der Verlustmutanten waren nur Ströme des R-Typ Anionenkanals detektierbar. Der S-Typ Anionenkanal SLAC1 wird hoch spezifisch in den Schließzellen exprimiert und spielt beim Stomaschluss die entscheidende Rolle (Negi et al. 2008; Saji et al. 2008; Vahisalu et al. 2008).

Bereits Mitte der 1990er Jahre konnte man anhand vieler Mutanten zeigen, dass die Aktivität der S-Typ Anionenkanäle durch regulatorische Prozesse wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert werden (Schmidt et al. 1995). Aus diesem Grund nahm man an, dass die fehlende Funktionalität von SLAC1 im heterologen Expressionssystem *Xenopus laevis* auf die fehlende regulatorische Komponente zurückzuführen ist (Negi et al. 2008; Saji et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Dieser Verdacht konnte von zwei unabhängigen Studien in *Xenopus laevis* Oozyten bestätigt werden, da der Anionenkanal SLAC1 nur in Koexpression mit der regulatorischen Proteinkinase OST1 makroskopische Anionenströme vermittelt (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009). Anhand der detaillierten Charakterisierung des Kanals, konnte festgestellt werden, dass dieser eine langsame Kinetik sowie eine deutlich höhere Permeabilität für Nitrat (NO₃⁻) und Chlorid (Cl⁻) im Vergleich zu Malat, Bicarbonat oder Sulfat aufweist und somit die Hauptkomponente der S-Typ Anionenströme in der Schließzellen darstellt (Schmidt and Schroeder 1994; Geiger et al. 2009; Chen et al. 2010).

Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass es aufgrund der Interaktion des Anionenkanals SLAC1 mit der Kinase OST1 zu einer Phosphorylierung des Kanals kommt, welche somit essenziell für die volle Aktivierung von SLAC1 ist. Untersuchungen an einer OST1 Verlustmutante *ost1-2* zeigten daher eine deutlich reduzierte Aktivität der S-Typ Anionenkanäle in deren Schließzellen (Geiger et al. 2009). Die Termini von SLAC1 verfügen über mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen für Kinasen, von denen bereits einige experimentell nachgewiesen worden sind (Geiger et al. 2009; Vahisalu et al. 2010; Brandt et al. 2012; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014). Bei den potenziellen Phosphorylierungsstellen handelt es sich um konservierte Serin/Threonin-Reste in den Termini der Kanäle. Pflanzen mit einer

Mutation an dieser Position, insbesondere eine Mutation der Serine S59, S86 oder S120, weisen eine gestörte Stomabewegung auf, welche vergleichbar ist mit der SLAC1 Verlustmutante (Vahisalu et al. 2008; Vahisalu et al. 2010). Anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten, konnten speziell das Serin S120 im N-Terminus von SLAC1 als Phosphorylierungsstelle, welche zur Aktivierung von SLAC1 durch die Kinase OST1 führt, bestätigt werden (Geiger et al. 2009; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014).

Mithilfe der Patch Clamp Technik an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba*, konnte bereits Ende der 1980er Jahren gezeigt werden, dass eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ebenfalls zu einer Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle führt (Schroeder and Hagiwara 1989). Die Umwandlung dieses Ca^{2+} -Signals wird von Ca^{2+} -abhängigen Kinasen bewerkstelligt. So ließ sich z.B. für die aus der CPK-Familie stammenden Proteinkinasen CPK3 und CPK6 eine ABA-abhängige sowie Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von S-Typ Anionenströme nachweisen (Mori et al. 2006).

Anhand von Koexpressionsanalysen in Oozyten konnte gezeigt werden, dass neben den Proteinkinasen CPK3, 6, 21 und 23 aus der CPK-Familie, auch CIPK/CBL Kinasekomplexe, ins besondere CIPK23/CBL1/9, in der Lage sind SLAC1 zu aktivieren (Geiger et al. 2010; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014).

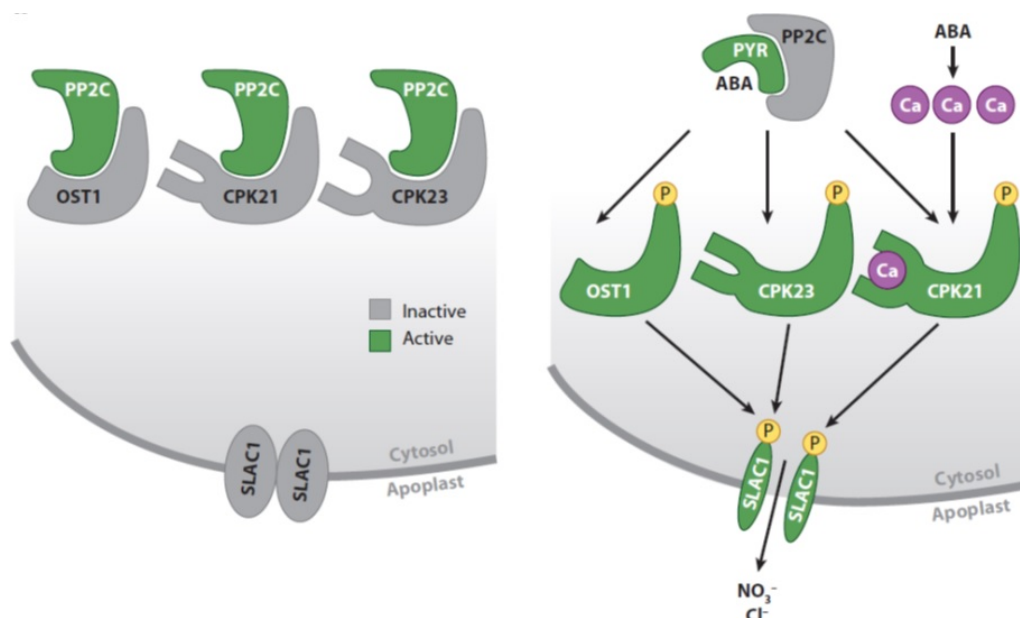


Abbildung 1-16: Vereinfachtes Modell der Regulation des Anionenkanals SLAC1 durch Phosphorylierung mittels Proteinkinasen (Barbier-Brygoo et al. 2011)

In Abwesenheit von ABA wird die Aktivität der Proteinkinasen OST1, CPK21 und CPK23 durch die Proteinphosphatase PP2C negativ reguliert, so dass SLAC1 inaktiv in der Plasmamembran vorliegt. In der Anwesenheit von ABA wird PP2C dagegen durch den ABA-PYR/PYL-Komplex inhibiert, wodurch die Kinasen aktiviert werden (Autophosphorylierung) und folglich SLAC1 phosphoryliert und somit aktiviert wird. Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von SLAC1 erfolgt hauptsächlich durch die Kinase CPK21, da diese im vgl. zu CPK23, stark Ca^{2+} reguliert ist.

1.4.3 Struktur der SLAC1-Typ Anionenkanäle

Anhand der 3D-Strukturanalyse des Telurit-resistenten Proteins *HITehA* aus dem Bakterium dem Bakterium *Haemophilus influenzae*, welches ein Ortholog zu SLAC1 darstellt, ist es schließlich gelungen ein Modell für die Struktur der Superfamilie SLAC1-ähnlicher Kanäle zu erstellen (Taylor et al. 1994; Chen et al. 2010; Thomine and Barbier-Brygoo 2010) (Abbildung 1-17).

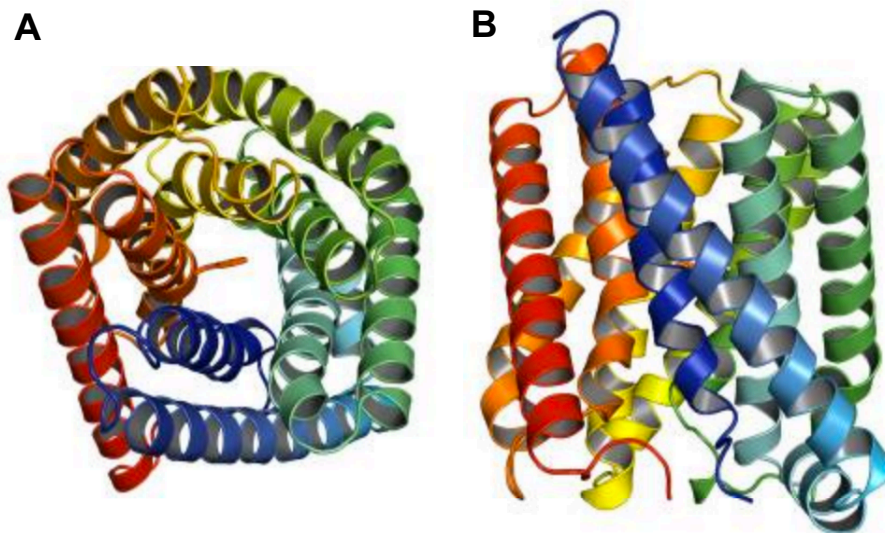


Abbildung 1-17: 3D-Struktur des SLAC1-Proteins (Chen et al. 2010)

Die 3D-Struktur des Proteins SLAC1 wurde mithilfe des Orthologs *HITehA* (Telurit-resistentes Protein) aus dem Bakterium *Haemophilus influenzae* erstellt. Die Struktur dieses Kanals besteht aus insgesamt 10 transmembranen Domänen (B), wobei diese so angeordnet sind, dass je 5 Transmembrane einen äußeren und einen inneren Ring bilden (A). Die 5 Transmembranen, welche den inneren Ring bilden, bilden eine Pore aus (Durchmesser von ca. 5 Å).

Die Struktur dieser Kanäle besteht aus insgesamt 10 transmembranen Domänen, welche so angeordnet sind, dass sie aus je 5 Transmembrane einen äußeren und einen inneren Ring bilden (Abbildung 1-17 A und B). Vergleichende Sequenzanalysen von AtSLAC1 und *HITehA* wiesen stark konservierte sowie weniger stark konservierte Bereiche in den Transmembranen auf, von denen v.a. die 5 Transmembrane, welche den inneren Ring bilden, hoch konserviert sind und im Inneren eine Pore ausbilden (Abbildung 1-17 A). Diese Pore der Kanäle hat einen Durchmesser von ca. 5 Å, welche vorwiegend mit hydrophoben oder Hydroxyl-Resten ausgekleidet ist. Allerdings befindet sich keine Bindestelle für Anionen in oder an der Porenregion, die dagegen bei anderen Cl⁻-Transportproteinen (CLCs) aufzufinden ist (Dutzler et al. 2002). Durch genauere Untersuchung dieser Porenregion stellte sich heraus, dass ein spezielles Phenylalanin (F450 in AtSLAC1) eine wichtige Aminosäure innerhalb der Pore zu sein scheint, die den Permeationsweg durch den Kanal blockiert. Durch Mutation dieser Aminosäure (AtSLAC1 F450A), konnte im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten eine konstitutive Aktivität des Kanals ohne Koexpression einer aktivierenden Kinase

festgestellt werden (Chen et al. 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivität durch die Bewegung des in die Pore gerichtenden Phenylrestes beeinflusst wird und mittels Konformationsänderung den Permeationsweg öffnen kann, so dass der Kanal von einem zuvor geschlossenen in einen offenen Zustand versetzt wird.

Im Genom von Arabidopsis gibt es neben SLAC1 noch vier weitere S-Typ Anionenkanäle, die SLAC1 Homologe SLAH1-4 (Negi et al. 2008; Chen et al. 2010). SLAH1 und SLAH2 werden ausschließlich in den Wurzeln exprimiert, wohingegen SLAH3 in der gesamten Pflanze exprimiert wird. In den Schließzellen trägt SLAH3 einen Teil an den S-Typ Anionenströmen bei (Geiger et al. 2011), wohingegen SLAH3 in den Mesophyllzellen alleine für die S-Typ Anionenströme verantwortlich ist (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011; Demir et al. 2013). SLAC1 und SLAH3 unterscheiden sich deutlich in ihrer Aktivierbarkeit: Während SLAC1 durch die Phosphorylierung durch OST1 und Calcium-abhängige Kinasen der CPK und CIPK/CBL Familien aktiviert wird, kann SLAH3 nur durch Calcium-abhängige Kinasen aber nicht durch OST1 aktiviert werden (Maierhofer, Diekmann, et al. 2014). Zudem benötigt SLAH3 extrazelluläres Nitrat als Liganden für dessen Aktivierung. 2016 konnten Cubero-Font et al. zeigen, dass SLAH3 in den Xylem Parenchymzellen in der Wurzel von Arabidopsis mit der stillen Untereinheit SLAH1 interagiert und maßgeblich an der Beladung des Xylems mit Chlorid beteiligt ist. Das Heteromer aus SLAH3 und SLAH1 benötigt weder eine Kinase noch die Präsenz von Nitrat im extrazellulären Medium, um aktiv zu sein. Interessanterweise ist die Permeabilität des Heteromers für Chlorid deutlich gesteigert, während SLAH3 Homomere bevorzugt Nitrat permeieren lassen (Cubero-Font et al. 2016). Wie SLAC1, benötigen SLAH2 und SLAH3 die Interaktion mit einer aktivierenden Kinase für die Aktivierung des Kanals (Geiger et al. 2011; Maierhofer, Lind, et al. 2014). Auch bei den SLAHs hat das exponierte Phenylalanin einen essenziellen Einfluss auf die Porenregion, welches das Öffnungsverhalten der Pore beeinflusst. Neben Phenylalanin konnte zusätzlich eine weitere essenzielle Aminosäure in SLAH2 entdeckt werden, welche in der Nähe vom Phenylalanin liegt und für die hohe NO_3^- -Selektivität des Kanals verantwortlich ist (Maierhofer, Lind, et al. 2014).

Im Modellsystem der Arabidopsis Schließzellen spielt der S-Typ Anionenkanal SLAC1 die dominierende Rolle bei der Initiierung des ABA-abhängigen Stomaschlusses. Durch die Aktivierung von SLAC1 kommt es zum Ausstrom von Chlorid und Nitrat und der damit verbundenen Depolarisation der Schließzellplasmamembran. Depolarisations-aktivierte Kaliumkanäle entlassen schließlich Kalium, der Turgor sinkt und die Stomata schließen (Abbildung 1-18).

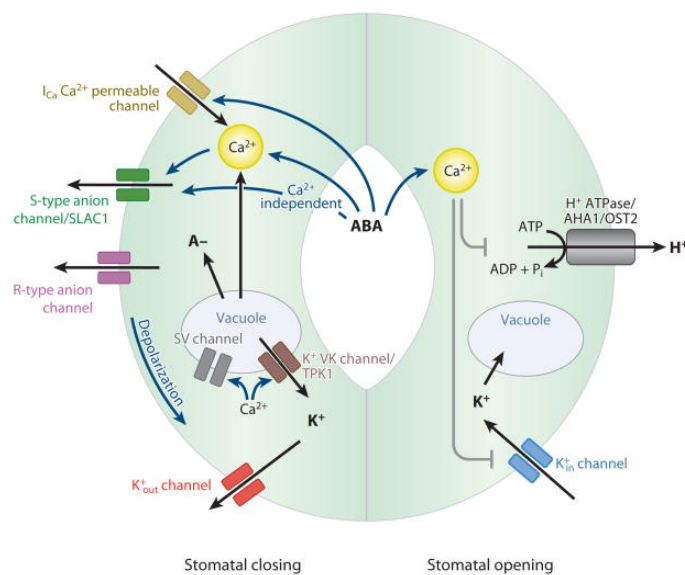


Abbildung 1-18: Zusammenfassendes Modell des ABA Signalwegs in Schließzellen (Kim et al. 2010)

In der linken Schließzelle ist die Regulation aller beteiligten Ionenkanäle während des Stomaschlusses dargestellt, während die rechte Schließzelle die Inhibierung der Stomaöffnung unter dem Einfluss von ABA demonstriert.

Neben den Untersuchungen des ABA-abhängigen Stomaschlusses in der Modellpflanze Arabidopsis gibt es nur wenige Publikationen aus anderen Pflanzen, die sich mit dem ABA vermittelten Stomaschluss und der Rolle von SLAC1 beschäftigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Untersuchungen an den monokotyledonen Pflanzen Gerste und Dattelpalme durchgeführt, die aus morphologischer Sicht völlig andere Stomata-Typen besitzen als Arabidopsis.

Wie bereits oben beschrieben (vgl.1.3.1) unterscheiden sich die monokotyledone Pflanze Gerste und die dikotyledone Pflanze Arabidopsis hinsichtlich ihrer Stomata morphologisch voneinander. Der Helleborus-Typ, besteht aus zwei nierenförmigen Schließzellen und ist bei Dikotyledonen (z.B. *A. thaliana*) und einigen Monokotyledonen aufzufinden. Der Gramineentyp besteht dagegen aus zwei hantelförmigen Schließzellpaaren und ist hauptsächlich bei Poaceaeen wie z.B. der Gerste anzutreffen (Raissig et al. 2016; Chen et al. 2017).

Die Stomata der Dattelpalme *Phoenix dactylifera* besitzen ebenfalls zwei bohnenförmige Schließzellen, welche zudem von vier Nebenzellen umringt ist (tetrazyklische Anordnung) (Muller et al. 2017) (Abbildung 1-19).

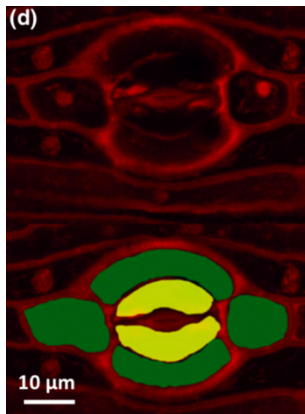


Abbildung 1-19: Morphologie der Stomata und seiner vier Nebenzellen von *Phoenix dactylifera*

LSM-Aufnahme einer mit Propidiumiodid-angefärbten Blattoberfläche der Dattelpalme (Absorption: 458 nm, Emission: 490-550 nm). Die Stomata (gelb) sind von je einem Paar aus lateralen und polaren Nebenzellen (grün) umgeben (Muller et al. 2017).

Wie in Abbildung 1-19 zu sehen, ist der Spaltöffnungsapparat (gelb) der Dattelpalme von insgesamt vier Nebenzellen (grün) umgeben, von denen die sogenannten lateralen Nebenzellen parallel, die zwei polaren Nebenzellen rechtwinklig zur Schließzellenachse liegen.

Inwieweit sich SLAC1 Kanäle aus einkeimblättrigen Pflanzen wie Gerste und Dattelpalme auf funktioneller und struktureller Ebene von Arabidopsis SLAC1 unterscheiden, ist eine zentrale Frage, die im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet wurde.

1.5 Zielsetzung

Die Echte Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) gehört zu einer der wichtigsten Nutzpflanzen im Nahen Osten, in Israel, in den wärmeren Wüstenregionen Nordafrikas und –amerikas, sowie in Indien und auf den Kanarischen Inseln. Sie wird bereits seit langer Zeit als Kulturpflanze genutzt, so dass diese Palmenart zum einen das typische Bild der Oasen prägt und zum anderen eine Grundlage der Kulturen im Nahen Osten und Nordafrika widerspiegelt. Die sehr ertrag- und enorm energiereichen Früchte des Dattelbaumes sind auch der Grund, weshalb schon seit frühester Menschengeschichte die Palme in Kultur genommen wurde.

Da sie als Wüstenpflanze extremen Umweltbedingungen ausgesetzt ist, gilt es in Zeiten des Klimawandels, mehr über diese stresstolerante Pflanze herauszufinden, um zukünftig ihre Überlebensstrategien auf andere Nutzpflanzen zu übertragen. Die Dattelpalme ist auf molekularer Ebene noch weitestgehend unerforscht, deshalb galt es, im Rahmen dieser Arbeit die Temperaturabhängigkeit und den Einfluss des flüchtigen Kohlenwasserstoffs Isopren auf Transportproteine zu untersuchen. Als Modelltransporter wurden hierzu Protonen-gekoppelte Saccharosetransporter aus der hitzetoleranten Dattelpalme (PdSUT1) und Mais (ZmSUT1) vergleichend mithilfe der TEVC-Methode im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten charakterisiert. Diese sekundär aktiven Transporter durchlaufen eine ausgeprägte Konformationsänderung während ihres Transportzykluses. Deshalb sollte die Umgebungstemperatur die Transportaktivität dieses Transportertyps deutlich beeinflussen. Ob und inwieweit der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren, der massiv in Hitzeperioden von Dattelpalmen emittiert wird, den Transmembrantransport beeinflusst, sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Membranständige Zuckertransportproteine spielen eine essenzielle Rolle bei der Kohlenhydratverteilung von den source-Organen in die sink-Organen, wie z.B. Wurzeln und Früchte. Nach Ansicht der heutigen Forschung ist die Verbesserung der Kohlenhydratverteilung unter Stressbedingungen ein zentrales Thema bei der Optimierung von Kulturpflanzen in Zeiten des Klimawandels und der stetig steigenden Weltbevölkerung.

Da die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* unter Extrembedingungen wie langanhaltende Trockenperioden und Hitzewellen überleben kann, müssen diese Pflanzen in der Lage sein, ihren Wasserhaushalt optimal zu regulieren. Bei Trockenstress spielt das Wassermanagement, welches maßgeblich über die Stomata gesteuert wird, eine entscheidende Rolle. Der Schließzellspezifische S-Typ Anionenkanal SLAC1 spielt eine essenzielle Rolle bei der Initiierung des Stomaschlusses. Um weitere Hinweise zu erhalten, wie die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* in der Lage ist, unter extremer Hitze und Trockenheit zu überleben, soll innerhalb dieser Arbeit der Stress-induzierte Stomaschluss der Wüstenpflanze Dattelpalme vergleichend zur Modellpflanze Arabidopsis und der Nutzpflanze Gerste, zwei Pflanzenarten der gemäßigten Klimazone, untersucht werden. Wie die

Dattelpalme gehören auch Gräser zu den monokotyledonen Pflanzen und besitzen zumeist komplexere und effizientere Stomata als Dikotyledonen. Die Stomata der Gerste bestehen aus zwei hantelförmigen Schließzellen, welche zusätzlich von zwei Nebenzellen flankiert sind (Chen 2017). Die Nebenzellen bieten den Gräsern den Vorteil, dass sie direkt im Kontakt mit den Schließzellen stehen und somit einen effizienten und schnellen Austausch von osmotisch aktiven Metaboliten und Ionen ermöglichen (Raschke and Fellow 1971). Diese besondere Zell-Zell-Kommunikation und die Beteiligung ABA-gesteuerter S-Typ Anionenkanäle blieben bislang jedoch weitestgehend unerforscht. Während bereits hinreichende Erkenntnisse über den ABA-abhängigen Stomaschluss in der Modellpflanze Arabidopsis existieren, gibt es nur wenige Publikationen aus anderen Pflanzen, die sich mit dem ABA vermittelten Stomaschluss und der Rolle von SLAC1 befassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen der S-Typ Anionenkanäle der monokotyledonen Pflanzen Gerste (HvSLAC1) und Dattelpalme (PdSLAC1) durchgeführt. Die elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenkanäle monokotyledoner Pflanzen soll im Rahmen dieser Arbeit Hinweise liefern, inwieweit sich die Regulation monokotyledoner von der Regulation dikotyledoner SLAC1 Anionenkanäle unterscheidet und ob die morphologischen Unterschiede der Stomata Auswirkungen auf den ABA-abhängigen Stomaschluss haben. Die Entstehung der besonderen Eigenschaften monokotyledoner SLAC1 Anionenkanäle im Vergleich zu Anionenkanälen aus dikotyledonen Pflanzen sollten schließlich mit phylogenetischen Analysen untermauert und im evolutionären Kontext betrachtet werden.

2 Material und Methoden

Die Grundlagen der folgenden Beschreibungen im Kapitel Material und Methoden wurden zum Teil aus meiner Masterarbeit („Identifikation der Substratbindestelle von pflanzlichen Saccharosetransportern“, 2013) übernommen und dem Sachverhalt dieser Doktorarbeit entsprechend angepasst. Außerdem ist zu erwähnen, dass die gängigen angewandten Methoden im Umgang mit Bakterien sowie RNA und DNA soweit nicht anders erwähnt, nach Current Protocols in Molecular Biology (Wiley) und Molecular Cloning (Sambrook/Russel) durchgeführt wurden.

2.1 DNA-Techniken

2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion beruht auf dem Prinzip, DNA-Fragmente (Templates) *in vitro* zu amplifizieren (Mullis et al. 1986). Bei dieser Methode werden folgende drei Reaktionsschritte mehrmals wiederholt: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Innerhalb des ersten Schrittes, der Denaturierung, wird der Reaktionsansatz auf 95°-98°C erhitzt um die doppelsträngige DNA zu denaturieren, wobei Sekundärstrukturen aufgelöst und beide Stränge voneinander getrennt werden. Im zweiten Schritt, dem Annealing, wird die Stringenz soweit herabgesetzt, dass die erwünschten Primer an die einzelsträngige DNA binden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden sowohl von der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) als auch von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. In dem darauffolgenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf ein Aktivitätsoptimum von 72°-75°C der hitzestabilen DNA-Polymerase gesetzt. Ausgehend von den vorhandenen Primern werden diese durch die Polymerase und die dNTPs verlängert, so dass eine komplementäre Kopie der Ausgangs-DNA erstellt wird. Die Länge der zu duplizierenden DNA wird durch den Abstand zwischen zwei Primern für eine Matrizen-DNA bestimmt.

Diese drei Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholen sich ca. 20-40-mal, wobei innerhalb jedes Zyklus die Menge des Matrizenstranges verdoppelt wird, wodurch es zu einem exponentiellen Wachstum der DNA kommt. Dieser dreistufige Prozess (Aufheizen, Abkühlen, Polymerisation) kann n-mal wiederholt werden, so dass man aus einem einzigen DNA-Molekül 2^n DNA-Moleküle erhält. Es ist ebenfalls möglich durch den Einsatz von geeigneten Primern die amplifizierte Sequenz so zu verändern, dass z.B. Punktmutationen eingefügt oder zusätzliche Schnittstellen angehängt werden können. Ein Standardansatz einer PCR-Reaktion besteht aus folgenden Komponenten:

Reagenz	Menge
DNA-Template	1 μ l (ca.10ng)
DNA-Polymerase Phusion C _x (2 U/ μ L)	1 μ l
5x Reaktionspuffer Phusion HF	10 μ l
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (je 10 mM)	1 μ l
Primer forward (10 μ M)	1 μ l
Primer reverse (10 μ M)	1 μ l
Nuklease-freies H ₂ O	35 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Tabelle 2-1: Standardansatz einer PCR-Reaktion

Die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden in ein steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, wobei die Polymerase zuletzt zugegeben wurde. Der Ansatz wurde gut gemischt und kurz anzentrifugiert. Die PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden folgende Standardbedingungen ausgewählt:

Status	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	1	98	60
Denaturierung	30	98	30
Primer-Annealing		57	30
Elongation		72	x
Termination der Elongation	1	72	90

Tabelle 2-2: Standardprogramm eines PCR-Cyclers

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich sogenannte „proofreading“ (Korrekturlese-) Polymerasen, wie z.B. die Phusion™ DNA Polymerase (Finnzymes) für z.B. eine USER-Klonierung (2.1.2.2) oder für eine T/A-Klonierung (2.1.2.1) ein geeigneter Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech), verwendet. Diese speziellen Polymerasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie zum einen eine exakte Kopie der DNA ermöglichen und zum anderen, dass sie falsch eingebaute Nukleotide erkennen und diese durch richtige ersetzen können.

2.1.1.1 Kolonie PCR

Eine Kolonie PCR dient zur schnellen Überprüfung von Bakterienkulturen auf positive bzw. falschpositive Klone. Im Vergleich zu einer normalen PCR, bei der über den Umweg einer Übernachtskultur (2.1.7) mit anschließender Plasmid-DNA-Isolation (2.1.8) die daraus

resultierende DNA als Template verwendet wird, wird bei einer Kolonie PCR direkt eine Bakterienkolonie eingesetzt.

Vor Beginn der eigentlichen Amplifikation wurde der PCR-Ansatz mit der enthaltenen Bakterienkultur für 20 min. bei 95°C ohne Zugabe der Polymerase erhitzt, um die Bakterienzellwände aufzubrechen, so dass die DNA frei zugänglich wurde. Im Anschluss wurde die Polymerase hinzugegeben und nach Herstellerangaben weiter verfahren. Um positive Klone identifizieren zu können, wurden entsprechende Primer eingesetzt. Das ermittelte PCR-Produkt konnte im Anschluss mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (2.1.3) überprüft und gegebenenfalls sequenziert (2.1.9) werden.

2.1.1.2 USER PCR

Für eine erfolgreiche Durchführung einer Klonierung mittels USER-Technik (2.1.2.2) ist es nötig, an dem zu amplifizierenden USER PCR-Produkt jeweils zwei, mindestens acht, Nukleotid-lange Überhänge am 3'-Ende zu erzeugen. Um diese Überhänge zu erzeugen, wurden spezielle USER-Primer verwendet, indem am 5'-Ende der Primer sowie am 3'-Ende der mind. 8 Nukleotid-langen, zum Vektor-Überhang komplementären Sequenz, ein Desoxyuridin (dU) eingebaut wurde. Dadurch entstanden geeignete Überhänge, welche eine Hybridisierung des USER PCR-Produkts und des USER Vektors ermöglichten. Nähere Erklärungen zu den hierfür benötigten, speziell designten Primern (Norholm 2010), sowie der Klonierungsmethode selbst sind unter 2.1.2.2 aufgeführt.

Um erfolgreich eine USER PCR durchführen zu können, ist ebenfalls darauf zu achten, dass die verwendete Polymerase nicht nur eine „proofreading“ Funktion besitzt, sondern dass sie ebenso in der Lage ist Uracile zu lesen, damit diese nicht fälschlicherweise während der Amplifikation entfernt werden.

2.1.1.3 Gerichtete Mutagenese

Um Punktmutationen mittels gerichteter Mutagenese erfolgreich in die kodierenden Sequenzen der Zielgene einzufügen, wurde die USER-Technik (2.1.2.2) angewendet. Für diese Methode wurden spezielle, sich überlappende Gen-spezifische Primer-Paare hergestellt, welche in dem Überlappungsbereich der Primersequenz die gewünschte Mutation enthalten.

Diese Mutagenese-Primer wurden mit Primern, welche in der Ampicillin-Resistenz aufsetzten, in zwei unterschiedlichen PCRs kombiniert (jeweils der Mutagenese forward Primer mit dem Amp-reverse Primer und umgekehrt). Der PCR-Reaktionsansatz sowie die Einstellungen des Thermocyclers entsprachen dabei den Standardbedingungen wie unter 2.1.1 (Tabelle 2-1, Tabelle 2-2) bereits aufgeführt. Nach der Entfernung methylierter Matrizen-DNA (DpnI-Verdau) konnten beide PCR-Produkte mittels USER-Klonierung (2.1.2.2) wieder zu einem

vollständigen Vektor mit der eingefügten Mutation und der funktionellen Ampicillin-Resistenz zusammengefügt werden. Anschließend konnte die gewünschte mutierte Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien transformiert und vermehrt werden (2.1.6).

2.1.1.4 *In vitro* PCR

Mithilfe einer *in vitro* PCR (IVT-PCR) kann ein cDNA-Fragment synthetisiert werden, welches als Ausgangstemplate zur Herstellung von cRNA mittels einer *in vitro* Transkription (2.2.1) dient. Durch Verwendung spezieller IVT-Primer ist es möglich, linearisierte DNA-Matrizen zu erstellen. Die Bindestellen dieser speziellen 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*) als auch die dazwischenliegende klonierte cDNA mit einbindet. Je nach Vektor war es möglich, die kodierende Sequenz des klonierten Gens C-terminal oder N-terminal mit der kodierenden Sequenz eines Reportergens (z.B. YFP) zu fusionieren. Durch die Anwendung dieses Verfahrens ist eine Linearisierung des zu verwendenden Vektors mittels Restriktionsverdau vor der *in vitro* Transkription überflüssig. Der PCR-Reaktionsansatz sowie die Einstellungen des Thermocyclers entsprachen dabei den Standardbedingungen wie unter 2.1.1 (Tabelle 2-1, Tabelle 2-2) bereits aufgeführt.

Das PCR-Produkt konnte nach einer Überprüfung auf einem 1%-igen Agarose-Gel (2.1.3) und einer Aufreinigung mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) zur *in vitro* Transkription (2.2.1) verwendet werden.

2.1.2 Klonierungsmethoden

Bei einer Klonierung handelt es sich um eine Methode, bei der ein DNA-Fragment (z.B. die kodierende Sequenz eines Gens) in einen geeigneten Vektor integriert wird. Dieses mittels Klonierung erworbene Konstrukt kann anschließend in unterschiedliche Wirte transformiert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde als Empfängerorganismus ausschließlich das Bakterium *Escherichia coli* verwendet. Plasmidvektoren sind ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen repliziert und amplifiziert werden. Bei der herkömmlichen Klonierungstechnik werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um Plasmidvektoren an der gewünschten Klonierungsstelle aufzuschneiden, so dass einzelsträngige Überhänge an den Schnittstellen entstehen. An dieser Stelle können im Anschluss DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen inseriert werden. Vektoren enthalten meist Antibiotika-Resistenz-Gene, so dass nach einer Transformation des Konstruktes eine Selektion der positiv transformierten Zellen möglich ist.

2.1.2.1 T/A-Klonierung mittels pGEM[®] T-Easy Vektorsystem

Für eine T/A-Klonierung wurde das pGEM[®] T-Easy Vektorsystem (Promega) eingesetzt. Bei dieser Klonierungsmethode wird, durch 5'-Adenin (A)-Überhängen an dem PCR-Produkt sowie 3'-Thymin (T)-Überhängen am entsprechenden Vektor, das DNA-Fragment über eine Ligase mit dem Vektor verknüpft. Diese speziell verwendete Polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix; Clontech) ermöglicht es, an das 3'-Ende des zu synthetisierenden Stranges ein zusätzliches Nukleotid, überwiegend ein Adenin, anzuhängen. Der dafür vorgesehene pGEM[®] T-Easy Vektor enthält bereits am 5'-Ende Thymin-Überhänge und liegt linearisiert vor. Bei Verwendung des pGEM[®] T-Easy Vektorsystem (Promega) wurde folgender Ligationsansatz angesetzt:

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 miteinander gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 1 h bei RT. Danach konnte dieser sofort in chemisch kompetente MRF'-Zellen transformiert werden (2.1.6).

Da es sich bei der T/A-Klonierung immer um eine ungerichtete Insertion handelt, konnte das PCR-Produkt sowohl in die sense als auch in die anti-sense Richtung in den Vektor inseriert werden, so dass die Orientierung des DNA-Inserts nach der Klonierung entweder mittels Restriktionsverdau (2.1.5) oder Kolonie PCR (2.1.1.1) überprüft werden.

2.1.2.2 Klonierung mittels USER-System

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Klonierungen wurden u.a. mithilfe der USER[™] Methode (engl. uracil-specific excision reagent) (New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt (Nour-Eldin et al. 2006).

Das USER-System ermöglicht rasches Klonieren eines PCR-Fragments mit einem Vektor ohne den Zwischenschritt der Ligation.

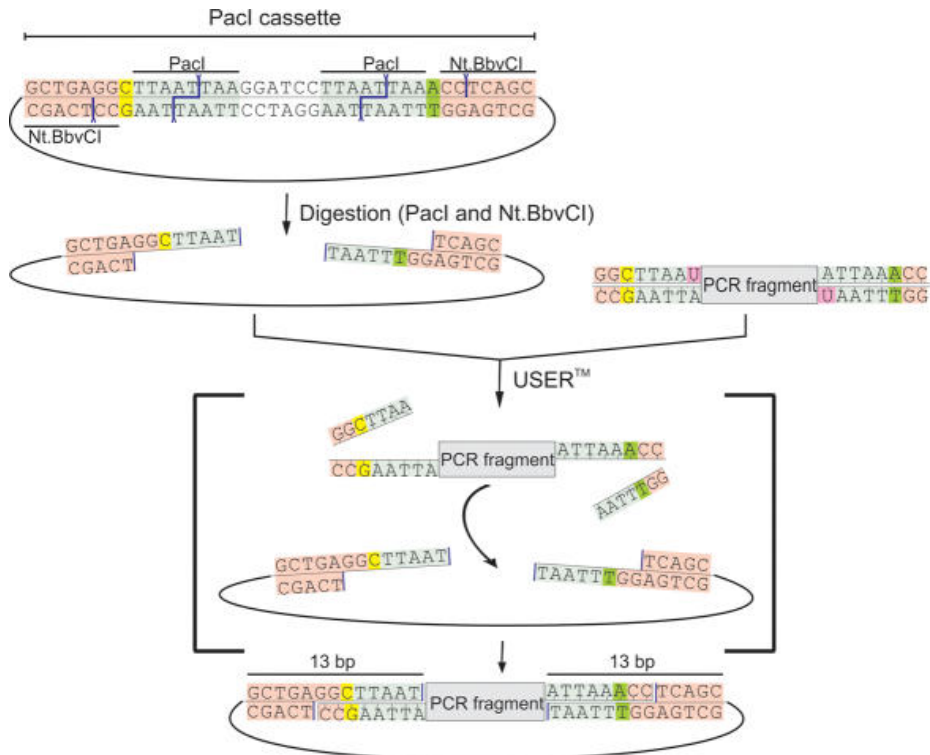


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der USER™ Technik

Der USER-Vektor, mit inserierter 38 bp langer Pacl Kasette (links oben), wird zunächst mit Pacl sowie NtBbvCI verdaut um 8 bp lange Überhänge am 3'-Ende zu erzeugen (links Mitte). Das einzubringende PCR-Produkt, welches mit Uracil (pink) haltigen Primern hergestellt wurde, wird im Anschluss zu dem linearisierten Vektor gegeben und mittels USER Enzym inkubiert (37°C, 25 min). Hierbei werden die Uracile sowie die 5'-Enden vom PCR-Fragment entfernt. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung von Vektor und PCR-Fragment. Die Abbildung wurde aus (Nour-Eldin et al. 2006) bezogen.

Das Verfahren beruht darauf, dass am PCR-Fragment sowie am Vektor Überhänge von 8 bp generiert werden, so dass diese ohne Ligation ein stabiles Hybridisierungsprodukt ergeben. Um diese Überhänge am Vektor herzustellen, wird eine 38 Basenpaare lange Pacl-USER-Kassette in die multiple cloning site des Ausgangsvektors (pGEMKN) angebracht. Durch einen anschließenden enzymatischen Verdau dieser USER-Vektoren mit Pacl (Fermentas) und NtBbvCI (New England Biolabs, Ipswich, USA) am 3'-Ende entstehen Überhänge mit einer Länge von acht Nukleotiden, die zueinander nicht komplementär sind. So entstand aus dem ursprünglichen Vektor pGEMKN der als USER kompatible Oozyten-Expressionsvektor (2.1.2.3).

Um eine erfolgreiche Hybridisierung zwischen dem PCR-Fragment und dem Vektor zu ermöglichen, benötigt das PCR-Fragment an dem 5'-Ende Überhänge von acht Nukleotiden Länge, welche komplementär zu den 3'-Überhängen der Vektoren sind. Dafür werden in einer PCR-Reaktion spezielle Primer verwendet, welche am 5'-Ende solch einen Überhang aufweisen, jedoch am Übergang zum genspezifischen Bereich des Primers ein Uracil beinhalten. Der Sense-Primer beinhaltet hierbei die Basenpaarabfolge 5'-GGCTTAAU-3', wohingegen beim Antisense-Primer 5'-GGTTTAAU-3' die USER spezifische

Überhangsequenz ausmacht. Beim Ablauf einer PCR werden die amplifizierten Bereiche um diese Basenpaare verlängert und somit USER-kompatibel. In diesen Sequenzverlängerungen ist das achte Nukleotid immer ein Uracil. Nach dem Ablauf der PCR-Reaktion wird das PCR-Produkt mit einem USER Enzymmix, welches aus einer Uracil DNA Glycosylase und einer DNA Glycosylase-Lyase Endo VIII (New England Biolabs Inc.) besteht, versetzt. Diese Enzyme katalysieren die Abspaltung des Uracils aus den im PCR-Produkt integrierten Primern und die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrates an dieser Stelle, so dass zum Vektor kompatible einzelsträngige Überhänge entstehen. Solche PCR-Reaktionen sind nur mit einer Variante der DNA-Polymerase Phusion zu bewerkstelligen. Diese Mutante (Phusion C_x) besitzt ihre volle proof-reading Funktion, überliest jedoch die Uracile in den USER-Primern (Norholm 2010). Nach der Amplifikation des PCR-Produkts wurde die Matrizen-DNA (methylierte Template-DNA) mittels eines DpnI-Verdau (Fermentas) zerschnitten, um das Vorkommen von falsch positiven Klonen möglichst zu verringern. Das DpnI Enzym wurde im Anschluss thermisch inaktiviert. Für den DpnI-Verdau wurde 1 µl des Enzyms zu dem Reaktionsansatz dazugegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte bei 80°C für 20 min eine Inaktivierung des DpnI-Enzyms.

Bei der darauffolgenden USER-Reaktion sorgt das USER-Enzym für das Entfernen der Uracile, so dass das PCR-Produkt, an dem die gewünschten Überhänge entstehen, mit dem geeigneten Vektor hybridisiert. Die USER-Reaktion wurde für 25 min bei 37°C und anschließend bei 25°C für weitere 25 min inkubiert.

Reagenz	Menge
PCR-Produkt/Insert	3 µl (ca. 300 ng)
USER-kompatibler aufgeschnittener Vektor	2 µl
USER TM -Enzym-Mix (New England Biolabs) (Uracil-DNA-Glykosylase/DNA-Glykosylase-Lyase-Enso VIII)	1 µl (1 Unit)
EB-Puffer	4 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Tabelle 2-3: Standardansatz einer USER-Reaktion

Nach Abschluss der USER-Reaktion wird das entstandene Produkt in chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen transformiert und vervielfältigt (2.1.6). In dieser Arbeit wurden ausschließlich MRF'-Stämme verwendet.

2.1.2.3 Verwendete Vektoren zur USER-Klonierung

Die verwendeten Vektoren zur Expression im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten basierten auf dem Ausgangsvektor pGEMKN und wurden, wie in (Nour-Eldin

et al. 2006) beschrieben, modifiziert. Nach der USER-Klonierung (2.1.2.2) sowie Transformation in *E. coli* (2.1.6) konnten positive Bakterienkolonien mittels der in den Vektoren enthaltenen Ampicillin-Resistenz-Gene selektiert werden. Für Interaktionsstudien mittels BiFC (engl. Bimolecular fluorescence complementation) war an die Vektoren pNBI u #18 und #20 jeweils downstream der USER-Kassette mit einer Hälfte der kodierenden Sequenz ein YFP (yellow fluorescent protein) angehängt. Dabei stellten die Aminosäuren 1-155 die N-terminale und die Aminosäuren 156-239 die C-terminale Hälfte dar. Nach Insertion des Zielgens entstanden somit folgende Fusionsproteine: Zielgen::YC und Zielgen::YN. Diese konnten anschließend durch Expression in *Xenopus* Oozyten für BiFC-Studien bzw. Interaktionsstudien (2.5.1) eingesetzt werden. Für Lokalisationsstudien wurde an den Vektor pNBI #22 downstream der USER-Kassette ein vollständiges Fluoreszenzprotein YFP angehängt, so dass nach Insertion des Zielgens folgendes Fusionsprotein entstand: Zielgen::YFP, welches ebenfalls zur Expression in *Xenopus* Oozyten verwendet werden kann.

Im Folgenden werden die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Vektoren für die Expression in *Xenopus* Oozyten aufgelistet:

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
#22	pNB1u C-term YFP	USER-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor; YFP downstream der USER-Kassette; Lokalisationsstudien

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren

2.1.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Da die DNA aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen ist, wandert diese, sobald ein elektrisches Feld angelegt wird, zum Pluspol (Anode). Durch die geringe Ladung und die netzartige Struktur des Agarose-Gels wandern kleinere Fragmente schneller als größere. Über die Agarose im Gel und die angelegte Spannung ist es möglich die Laufgeschwindigkeit zu beeinflussen. Je niedriger die Konzentration des Polymerzuckers Agarose in diesen Gelen ist, desto größer ist die Maschengröße des Gels. Für DNA-Fragmente größer 1000 bp werden 1 %-ige Agarose-Gele verwendet, für Fragmente <1000 bp sind 2 %- bzw. 3 %-ige Gele besser geeignet. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain, BIOTUM, Hayward, California, USA) (5 µl/100ml) ist es möglich, die aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen. Dabei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA und emittiert Licht, sobald es mit UV-Licht der Wellenlänge 254-366 nm angeregt wird. Der zusätzlich verwendete DNA-Marker (λ -Pst) ermöglicht die direkte Zuordnung der Bandengröße der zu untersuchenden Probe sowie eine Aussage über die Menge der aufgetragenen DNA. Bei diesem Marker handelt es sich um ein Gemisch aus DNA-Probenpuffer und eine mit dem Restriktionsenzym PstI vollständig verdaute DNA des λ -Phagen.

2.1.3.1 Durchführung und Analyse von DNA in Agarose-Gelen

Um ein 1 %-iges Agarose-Gel herzustellen, werden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz	Menge
Agarose	5 g
1x TAE	500 ml
GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain, BIOTUM)	25 µl
Gesamtvolumen	500 ml

Tabelle 2-5: Standardherstellung eines 1%-igen Agarosegels für DNA

Das fertig hergestellte Gel konnte nun in einem Wärmeschrank gelagert werden um zu verhindern, dass das Gel auspolymerisiert.

Mit einem Gelschlitten wurde ein 1 %-iges Gel gegossen, welches durch Einspannen eines Kammes Taschen für die Proben enthielt. Nach etwa 15 min war das Gel abgekühlt und auspolymerisiert. Anschließend wurde der Schlitten mit dem fest gewordenen Gel in eine Gelelektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überführt. Das Gel wurde anschließend mit den 5x DNA-Probenpuffer versetzten Proben in die Taschen beladen und zusammen mit dem

Vergleichsmarker bei einer Spannung von ca. 100 mV für etwa 30 min elektrophoretisch aufgetrennt.

	Reagenz	Menge
1x TAE Puffer:	Tris	40 mM
	Essigsäure	40 mM
	Na-EDTA	1 mM
5x DNA-Probenpuffer:	Glycerin (w/v)	50 %
	EDTA	100 mM
	Bromphenolblau (w/v)	0,25 %
	Xylen Cyanol FF	0,25 %

Tabelle 2-6: Standardpuffer für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Detektion und fotografische Darstellung der entstandenen Banden erfolgte an einem Intas UV Imager (Intas UV-Systeme).

2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

2.1.4.1 Agarose-Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Extraktion der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten DNA aus einem Agarose-Gel erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde das Agarose-Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung auf einen UV-Tisch platziert, um die durch GelGreen (Biotium) angefärbten Banden sichtbar zu machen. Die gewünschte Bande wurde im Anschluss mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von ca. 700 µl QG-Puffer folgte eine 10-minütige Inkubation bei 60°C (Thermo Shaker TS-100, PeqLab), bis sich das Gelstück komplett aufgelöst hatte. Um die gewünschte DNA an die Matrix der QIAquick MiniElute Säule zu binden, wurde der Ansatz auf die Säulchen pipettiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit der gebundenen DNA wurde erneut mit 500 µl QG-Puffer gewaschen. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses wurde das Säulchen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen, indem wieder für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Nachdem der Durchfluss erneut verworfen wurde, erfolgte ein weiterer 1-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm, um die Säule zu trocknen. Im Anschluss wurde das Säulchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die gebundene DNA aus der Säulenmatrix zu eluieren, wurde zweimal jeweils 10 µl Nuklease-freies Wasser mittig auf die QIAquick Membran der Säule pipettiert. Nach einer 1-minütigen Inkubation bei RT folgte

jeweils ein weiterer 1-minütiger Zentrifugationsschritt. Der Durchfluss, in dem sich die eluierte DNA befand, konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

2.1.4.2 Aufreinigung einer PCR-Reaktion

Die Aufreinigung eines PCR-Produkts erfolgte mithilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kit von Qiagen. Dieses Kit ermöglicht es, die PCR-Fragmente von Primern, Nukleotiden und Enzymen zu befreien. Hierfür wurden zu 50 μl PCR-Produkt 250 μl PB-Puffer dazugegeben und gemischt. Das Binden der DNA erfolgte, indem der Ansatz auf eine QIAquick spin column in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 sec zentrifugiert wurde. Auf die Säule des QIAquick spin column wurden anschließend 750 μl PE-Puffer gegeben und erneut für 30 sec zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde noch einmal der Durchfluss verworfen und für 1 min zentrifugiert um mögliche Ethanol-Reste aus dem PE-Puffer zu entfernen. Die Säule wurde nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die gebundene DNA zu eluieren, wurden 30 μl Elutionspuffer auf die Mitte der Säule pipettiert und für 30 sec zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde dann bei -20°C aufbewahrt oder direkt für die *in vitro* Transkription (2.2.1) verwendet.

2.1.5 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Mithilfe eines Restriktionsverdau ist es möglich, doppelsträngige DNA durch Verwendung von Restriktionsenzymen (aus Bakterien stammende Endonukleasen) an einer bestimmten Position mittels hydrolytischer Spaltung aufzuschneiden. Endonukleasen erkennen innerhalb der DNA-Sequenz palindromische Erkennungssequenzen, die im Sense- und Antisense-Strang eine exakt entgegengesetzte Basenabfolge aufweisen, welche dann entweder innerhalb dieser Sequenz oder in unmittelbarer Nähe geschnitten werden. Je nach Restriktionsenzym können diese Schnittstellen entweder „blunt ends“ (glatte Enden) oder „sticky ends“ (klebrige Enden; mit einseitigem Überhang) aufweisen. Durch dieses Verfahren ist es möglich, z.B. unterschiedliche DNA-Fragmente miteinander zu hybridisieren, so dass neue DNA-Konstrukte entstehen (präparativer Restriktionsverdau).

In dieser Arbeit wurde allerdings hauptsächlich ein sogenannter analytischer Restriktionsverdau durchgeführt, bei welchem die DNA mit geeigneten Enzymen geschnitten wurde um über die entstandene Länge den Erfolg einer Klonierung bzw. die Orientierung eines Inserts zu überprüfen. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.6 Bakterien-Transformation durch Hitzeschock

Bei der Transformation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen eingebracht wird. Die Transformation der Plasmid-DNA erfolgt über Hitzeschock. Bei den für diese Arbeit verwendeten, chemisch kompetenten Bakterien handelte es sich um *E. coli*-Zellen, deren Zellwand durch eine chemische Vorbehandlung für Plasmid-DNA durchlässiger gemacht wurde. Für die Transformation wurde zunächst ein bei -80°C gelagertes 50µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, um eine Regeneration der geschädigten Zellwand zu gewährleisten. Anschließend wurde der komplette Klonierungsansatz (z.B. aus einer USER-Reaktion; 2.1.2.2) zu den kompetenten Bakterien gegeben. Ein anschließender Hitzeschock für 40 sec bei 42°C im Wasserbad sorgte für die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien. Nach der Inkubation im Wasserbad wurde der Reaktionsansatz für weitere 3 min auf Eis gestellt. Die transformierten Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte, welche zuvor mit dem geeigneten Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml LB-Agar) versetzt wurde, ausplattiert. Das Antibiotikum sorgte dafür, dass nur transformierte Zellen, welche ein Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten und dadurch eine Resistenz erlangten, sich auf dem Selektionsagar vermehren konnten. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, damit sich die Zellen erfolgreich vermehren können.

2.1.7 Anfertigung von Übernachtskulturen

Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurden ca. 10 µl Flüssigkultur einer Bakterienkolonie oder einer einzelnen, gepickten Bakterien-Kolonie von einer LB-Platte in 5 ml LB-Medium/+ Ampicillin (50 µg/ml) angeimpft. Unter ständigem Schütteln (Inkubator Shaker Model G25“, New Brunswick scientific co. Inc) wurden die Bakterien bei 37°C über Nacht inkubiert um ein optimales Bakterienwachstum von *E. coli* zu erreichen.

2.1.8 Plasmid-DNA Isolierung

Um die Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien erfolgreich isolieren zu können, ist es nötig, die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und den bakteriellen Proteinen zu trennen.

Für diese Methode wurde eine Mini-Präparation mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen durchgeführt und sich dabei an die Herstellerangaben gehalten.

Für die Isolierung wurden 1,5 ml der Übernachtskultur (2.1.7) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß für 30 sec bei Raumtemperatur (RT) und 9.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das verbleibende Pellet in 250 µl P1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl P2-Puffer hinzugegeben und erneut gevortext um die Zellwände aufzuschließen. Im Anschluss erfolgte die Neutralisation des Lysats, indem 350 µl N3-Puffer

dazugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2 min wurde der Ansatz erneut gut gevortext und anschließend für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Schritt gelang es, die Plasmid-DNA von Zellwandbestandteilen, genomischer DNA sowie von Lipiden und Proteinen zu trennen.

Der Überstand mit der enthaltenden Plasmid-DNA wurde vorsichtig entnommen, in die QIAprep spin columns überführt und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die an der Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA konnte nun mit 750 µl PE-Puffer und einer weiteren Zentrifugation von 1 min gewaschen werden. Anschließend wurde der noch an der Säule haftende Waschpuffer durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von 2 min entfernt. Nun wurde 50 µl Nuklease-freies Wasser auf die Säulenmatrix gegeben und für 1 min inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA mittels eines weiteren Zentrifugationsschrittes von 1min in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) photometrisch ermittelt.

2.1.9 DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Grundlagen der Sequenzierung beruhen auf der Didesoxy-Methode (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977). Das Sequenzieren diente sowohl zur Kontrolle als auch zum Nachweis amplifizierter und klonierter Gensequenzen. Die Sequenzierungen wurden extern von der Firma GATC-Biotech oder LGC Genomics durchgeführt. Hierfür wurden die Proben (aufgereinigtes DNA-Fragment (2.1.4.2) oder isolierte Plasmid-DNA (2.1.8)) nach den Vorgaben der entsprechenden Firma verdünnt und vorbereitet. Um die eingereichten Proben sequenzieren lassen zu können, wurden Vektor-spezifische Primer verwendet, die entweder bei der Firma im System hinterlegt waren oder mitgeschickt wurden.

Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte mit der Software Vector NTI von Invitrogen.

2.2 RNA-Techniken

2.2.1 *In vitro* Transkription

Um ein bestimmtes Protein in *Xenopus* Oozyten exprimieren lassen zu können, muss zuerst die entsprechende cRNA hergestellt werden. Für die Umschreibung der DNA in cRNA (*in vitro* Transkription) wurde die zuvor aufgereinigte IVT-PCR (2.1.1.4) eingesetzt. Diese Methode wird durch den Einsatz der T7-RNA-Polymerase ermöglicht, welche nur dann arbeiten kann, wenn die zur RNA-Synthese verwendete Matrize zusätzlich den T7-Promotor beinhaltet. Die Herstellung der cRNA erfolgte mithilfe des Ampli Cap-Max™ T7 High Yield Message Maker Epicentre Kits (Cellscript Inc.).

Für die IVT-Reaktion wurde folgender Standardansatz verwendet:

Reagenz	eingesetzte Menge
DNA-Template	2,75 μ l (~1 μ g)
10x Transcription Buffer	1 μ l
Cap/NTP PreMix	4 μ l
DTT (100 mM)	1 μ l
T7 Polymerase	1 μ l
RNAse Inhibitor	0,25 μ l

Tabelle 2-7: Standardansatz einer *in vitro* Transkription

Der Ansatz wurde gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1,5 h. Durch die anschließende Zugabe von 20 μ l Ammoniumacetat-Präzipitationslösung (5 M) wurde die Reaktion abgestoppt. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 30 min bei -20°C, in der die synthetisierte RNA ausfiel. Danach wurde für 30 min und maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die cRNA wurde dann mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und für weitere 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet für ca. 20 min in einem Heizblock bei 37°C getrocknet. Zum Schluss wurde die cRNA in 10 μ l Nuklease-freiem H₂O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) und wurde zusätzlich auf einem RNA-Agarosegel überprüft (2.2.2).

2.2.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der cRNA wurde ein RNA-Agarosegel hergestellt, mit dem die Nukleinsäuren, wie bei der DNA-Agarose-Gelelektrophorese (2.1.3), entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und ihre Reinheit und der Denaturierungsgrad überprüft wurden. Zur Erstellung des RNA-Agarosegels wurden 0,5 g Agarose mit 41 ml 1x MEN-Puffer in einem Glasgefäß gemischt und 2,5 μ l GelRed (Nucleic Acid Stain, BIOTUM Hayward, California, USA) dazugegeben. Nach kurzem Aufkochen, damit sich die Agarose löst, wurde das Glasgefäß auf ca. 60°C abgekühlt und 9 ml 37%-iges Formaldehyd hinzugegeben. Das Gel wurde in ein für RNA-Gele vorgesehenen Schlitten luftblasenfrei gegossen. In der Zwischenzeit wurde 1 μ l der cRNA mit 2 μ l Glyoxal-Lösung vermischt und - um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden - für 20 min. bei 55°C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben für 2 min auf Eis gestellt und anschließend mit 2 μ l 2x RNA-Probenpuffer versetzt.

Reagenz	Menge
Agarose	0,5 g
1x MEN	41 ml
Formaldehyd (37%)	9 ml
GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain, BIOTUM)	2,5 µl
Gesamtvolumen	50 ml

Tabelle 2-8: Standardherstellung eines 1%-igen Agarosegels für RNA

Als Laufpuffer diente 1x MEN-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung der cRNA wurde bei einer Spannung von 60-80 V durchgeführt. Die anschließende Detektion und fotografische Darstellung der entstandenen Banden erfolgte an einem Intas UV Imager (Intas UV-Systeme).

2.3 Quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real time-PCR, qPCR)

Für die Quantifizierung der Expression von bestimmten Genen wurden die entsprechenden Transkripte mittels qPCR analysiert. Mithilfe der qPCR ist es möglich, über die kontinuierliche Detektion der Fluoreszenz eines DNA-Doppelstrang-spezifischen Farbstoffs, welche proportional zur entstandenen DNA-Menge ansteigt, sowohl die Kinetik als auch das Produkt einer PCR-Reaktion quantitativ zu ermitteln. Da hierbei eine lineare Abhängigkeit zur ursprünglich eingesetzten DNA-Menge existiert, kann über eine Eichgerade sowie einem Vergleich zu konstitutiv exprimierten „Housekeeping-Genen“ das ursprüngliche RNA Expressionslevel einzelner Transkripte bestimmt werden (Lind et al. 2006).

Bevor mit der Durchführung einer qPCR gestartet werden konnte, wurden folgende Methoden durchgeführt:

2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA aus frischem Pflanzenmaterial

Die Isolation der Gesamt-RNA aus frischem Pflanzenmaterial erfolgte mittels des Nucleo Spin® RNA Plant Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG). Für die RNA-Isolation wurde das Pflanzenmaterial zunächst mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden dann ca. 100 mg zusammen mit drei Keramikkugeln in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und zweimal für je 1 min bei 25 1/s in einer, mittels flüssigem Stickstoff gekühlten, Schwingmühle homogenisiert.

Die darauffolgende Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Eluiert wurde in 33 µl DEPC-H₂O. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit dem Nanodrop 2000c

Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die RNA konnte anschließend bei -20 °C gelagert werden.

2.3.2 DNase-Verdau, RNA-Präzipitation und reverse Transkription

Um eine qPCR (2.3.3) durchführen zu können, musste als Nächstes die gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt, um die DNA-Spuren, welche durch Verwendung der Säulchen mit Silica-Membranen des RNA Isolations Kits ebenfalls eluiert werden, zu entfernen. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz durchgeführt:

Reagenz	Menge
gesRNA	2 µg
RNase-freie DNase I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)	1 µl (1 Unit)
10x DNase-Puffer	2 µl
RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)	0.5 µl (1 Unit)
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2-9: Reaktionsansatz für einen DNase-Verdau

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und für 45 min bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die RNA gefällt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und durch die Zugabe von 10 µl NH₄Ac (5 M in 100 mM EDTA) sowie 75 µl Isopropanol versetzt. Als Fällungshilfe wurde zusätzlich 1 µl Glycogen (RNA grade, 20 mg/ml, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation (20.000 x g, 4 °C, 45 min) pelletiert, durch Zugabe von 500 µl 70-%igem Ethanol gewaschen (20.000 x g, 4 °C, 30 min), bei 37 °C getrocknet und in 7 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Für die anschließende cDNA-Synthese wurde eine M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Madison, USA) für den folgenden Reaktionsansatz verwendet:

Reagenz	Menge
RNA	6,7 µl
Oligo-dT-Primer (100 µM)	0,4 µl
dNTPs (10µM)	0,5 µl
5x RT-Puffer	2 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Tabelle 2-10: Reaktionsansatz für eine reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 0,4 µl (= 80 U) der Reversen Transkriptase wurde die Reaktion für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und letztendlich bei -20°C gelagert.

2.3.3 Quantifizierung mittels qPCR

Für die qPCR wurde, wie bereits beschrieben die Gesamt-RNA isoliert (2.3.1). Die daraus synthetisierte cDNA (2.3.2) wurde 20-fach mit tRNA-H₂O verdünnt, da die Puffer nicht kompatibel sind. Bei tRNA-H₂O handelte es sich um HPLC-H₂O (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10 ng/µl tRNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) versetzt wurde. Durch die Zugabe von tRNA wurden Probenverluste, welche durch Bindung der cDNA an die Gefäßwände entstehen können, unterbunden. Die qPCR wurde entweder in einem Roche LightCycler® 2.0 (Carousel based Instrument, Roche; Software Version 3.5) oder einem Realplex Mastercycler® (ep realplex2S, Eppendorf; Software Version 2.2) durchgeführt. Unter Verwendung des ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix (Thermo Scientific) wurden für einen Reaktionsansatz folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz	Menge
Template (cDNA; 1:20 verdünnt)	2 µl
ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix	10 µl
Primer fwd (50 µM)	0,12 µl
Primer rev (50 µM)	0,12 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2-11: Standardreaktionsansatz für eine qPCR

Die verwendeten Primer der qPCR wurden so designt, dass die optimale Primerlänge von 17-18 Nukleotiden und eine Produktlänge von 200-500 bp eingehalten wurden. Außerdem sollten die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primerpaare zwischen 52 °C und 60 °C liegen. Die

optimale Annealing-Temperature für jedes Primerpaar wurde mittels eines Temperaturgradienten bestimmt. Die verwendeten Primer für die qPCR wurden von TIB Molbiol (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Deutschland) bezogen und waren GSF aufgereinigt (Sephadex® Gelfiltration).

Die eigentliche Durchführung der qPCR erfolgte nach einem Standardprotokoll (Tabelle 2-12).

Status	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
„Hot Start“	1	95	900
Denaturierung	45	95	15
Primer-Annealing		52-60	20
Elongation		72	20
Detektion		79	10
Schmelzpunktanalyse	1	95	10
	1	60	15
	1	ΔT_m (60° C → 95 °C)	[0,3 °C/sec]
	1	95	5
Ende	1	40	120

Tabelle 2-12: Standard-Cycler Programm für eine qPCR

Der erste lange 15-minütige Schritt bei 95°C diente dazu, die im Absolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix verwendete „Hot Start“ Polymerase zu aktivieren. Durch die im Anschluss durchgeführte Schmelzpunktanalyse war es möglich direkt festzustellen, ob es sich beim PCR-Produkt um das gewünschte spezifische Fragment handelte oder ob eventuell sekundäre Nebenprodukte durch unspezifische Primerbindungen entstanden waren.

2.3.4 Herstellung von Standardreihen für die qPCR

Für die Herstellung der Standardreihen der einzelnen Transkripte wurden die entstandenen Produkte zunächst gelelektrophoretisch überprüft, vereinigt, um eine möglichst große Ausbeute zu erhalten und letztlich mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Eluiert wurde in 2x 20 µl DEPC-H₂O. Im Anschluss wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (Nanodrop 2000c Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific). Die Standardreihen wurden dazu benutzt um neue Primer zu testen sowie um Eichgeraden zu erhalten, mit denen über die in den Proben gemessene Fluoreszenz bzw. den CT-Wert (engl.: threshold cycle) der Proben die Ausgangsmenge des jeweiligen Transkripts ermittelt werden konnte.

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurde der Standard #1 (Std 1) auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

# Standard	Verdünnung	in	Endkonzentration
1	10 ng/ µl	HPLC-H ₂ O	10 ng/µl
3	198 µl + 2µl Std 1	HPLC-H ₂ O	100 pg/µl
5	198 µl + 2µl Std 3	HPLC-H ₂ O	1 pg/µl
7	198 µl + 2µl Std 5	tRNA-H ₂ O	10 fg/µl
8	180 µl + 20µl Std 7	tRNA-H ₂ O	1 fg/µl
9	180 µl + 20µl Std 8	tRNA-H ₂ O	0,1 fg/µl
10	180 µl + 20µl Std 9	tRNA-H ₂ O	0,01 fg/µl

Tabelle 2-13: Herstellung einer Standardreihe für die qPCR

Für die Messungen wurden die Standards #7, #8, #9 und #10 verwendet. Die zu verwendeten Standards wurden bei 4°C gelagert.

Um schließlich die Expression der Transkripte unterschiedlicher Proben miteinander vergleichen zu können, wurden für die Berechnung der Molekülzahlen die gemessenen Transkriptmengen auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen EF1α normiert. So konnte die Anzahl der Moleküle eines Produkts pro 10.000 Molekülen EF1α bestimmt werden. Die verwendeten Primer für die qPCR sind im Anhang (5.6) zu finden.

2.4 *Xenopus laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Gattung der Krallenfrösche (*Xenopus*). Das reife *Xenopus*-Ei ist anhand eines hellen, dotterreichen, vegetativen Pols und eines dunklen, animalen Pols zu erkennen. Vor der Befruchtung ist die Eizelle von einer schützenden Vitellinmembran umgeben. Die Eier enthalten, im Vergleich zu normalen Körperzellen, eine beträchtliche Menge an Zytoplasma mit Speicherstoffen, welche für das Wachstum des Embryos essenziell sind. Der Durchmesser eines *Xenopus*-Eies beträgt ca. 1 mm.

Aufgrund der hohen Anzahl an maternalen Ribosomen und der hohen Konzentration von Bestandteilen, welche für die Translation notwendig sind, eignet sich der Krallenfrosch hervorragend als heterologes Expressionssystem. Aufgrund dessen, dass Gurdon et al. herausgefunden haben, dass nach der Injektion von fremder RNA in *Xenopus* Oozyten das entsprechende Protein translatiert und in die Oozytenmembran eingebaut wird, werden die Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs seit 1971 erfolgreich als heterologes

Expressionssystem eingesetzt (Gurdon et al. 1971a). Eine funktionelle Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen wurde 1983 erstmalig nachgewiesen (Gundersen, Miledi, and Parker 1983a, 1983b). Seitdem zählt das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten als Standardmethode für die elektrophysiologische Charakterisierung von Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren.

Dieses heterologe Expressionssystem weist einige Vorteile gegenüber anderen heterologen Expressionssystemen sowie auch nativen Geweben auf. Zum einen lassen sich die Oozyten sehr gut mithilfe der TEVC-Methode (Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik, 2.6) untersuchen, da sie aufgrund ihrer Größe relativ leicht angestochen werden können und durch ihre relativ große Oberfläche Ströme im μA -Bereich aufweisen können. Zum anderen besitzen sie eine hohe Translationsfähigkeit und führen die meisten posttranslationalen Modifikationen an fremden Proteinen sowie deren richtigen Einbau in die Zellmembran durch.

2.4.1 Gewinnung und Präparation der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die südafrikanischen Krallenfrösche wurden in kleinen Gruppen von bis zu 5 Tieren pro Aquarium bei 18°-20°C Wassertemperatur gehalten.

Zur Gewinnung der Oozyten wurde ein Frosch mit Tricaine (3-Aminobenzoessäure-ethylester; 0,75 g/l) in Narkose gelegt und anschließend auf Eis gebettet. So war es möglich durch einen kleinen operativen Eingriff Teile der Ovarlappen zu entfernen. Dazu wurden die Bauchdecke und das darunterliegende Muskelgewebe geöffnet und einige Ovarlappen mithilfe einer Pinzette aus dem Bauchraum gezogen. Der Schnitt wurde nach der Entnahme zugenäht. Nach etwa 6 Monaten regeneriert sich das Ovar so weit, dass ein erneuter operativer Eingriff an demselben Frosch durchgeführt werden konnte. Die Ovarlappen wurden unter dem Binokular mit Uhrmacherpinzetten grob zerkleinert, um die Zugänglichkeit der einzelnen Oozyten für die weiteren Schritte zu verbessern. Im Anschluss wurden die Oozyten mehrfach mit kalziumfreier ND-96-Lösung gewaschen. Durch Zugabe des Enzyms Collagenase (0,14 mg/ml kalziumfreie ND-96) wurden das Ovargewebe, Blutgefäße und Follikelzellen bei Raumtemperatur für 1,5 h verdaut. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Oozyten mehrmals mit kalziumfreier ND-96-Lösung und anschließend mit kalziumhaltiger ND-96-Lösung (1mM CaCl_2) gewaschen, so dass die Oozyten von den Follikelzellen sowie von der Collagenase befreit wurden. Um möglich auftretende bakterielle Infektionen zu vermeiden, wurde der kalziumhaltigen ND-96-Lösung Gentamycin (50 mg/l) zugegeben. In dieser Lösung konnten sowohl die uninjizierten als auch die injizierten Oozyten bei 16°C einige Tage aufbewahrt werden.

Reagenz	Menge
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Hepes	10 mM; pH 7.4 mit NaOH
Gentamycin	50 mg/l
mit D-Sorbitol auf	220 mosmol/kg
Ca²⁺-freie ND96	ohne CaCl ₂ und Gentamycin

Tabelle 2-14: Zusammensetzung der ND96-Lösung

2.4.2 Injektion von cRNA in Oozyten von *Xenopus laevis*

Die Injektion der cRNA erfolgte innerhalb von 24 h nach der Gewinnung der Oozyten mithilfe des Nanoject II Auto Nanoliter Injectors (Drummond). Hierfür wurden zunächst aus speziellen Glaskapillaren (31/2“ Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Company) mit dem Kapillarieziehgerät (Scientific Instrument Lab, Narishige Japan) Injektionskapillaren gezogen. Der Durchmesser dieser Mikropipetten betrug maximal 1-2 µm. Mithilfe eines Mikroskops (Mikroschmiede, Leitz) konnte die Spitze der Injektionskapillare schräg abgebrochen werden, um die Membran der Oozyte nicht unnötig zu verletzen. Vor der Injektion musste diese im Anschluss vollständig mit einem inerten, inkompressiblen Öl luftblasenfrei befüllt werden, bevor die cRNA in gewünschter Konzentration, in die Spitze der Kapillare aufgezogen wurde. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden mittels Druckstoß ca. 50 nl cRNA injiziert. Die injizierten Oozyten wurden in eine kalziumhaltige ND-96-Lösung mit Gentamycin (50 mg/l) (1mM CaCl₂) überführt und bei 16°C im Klimaschrank bis zur Messung gelagert. Je nach Konstrukt war nach 2-5 Tagen das Maximum des Expressionsniveaus erreicht, so dass die Oozyten mithilfe der TEVC-Methode (2.6) gemessen werden konnten.

2.5 Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen

2.5.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC)

Um potenzielle Interaktionspartner für ein Protein *in vivo* zu detektieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die sogenannte **Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation** (engl. **bimolecular fluorescence complementation**; **BIFC**) eingesetzt. Das Prinzip der BIFC-Technik beruht auf der Fusion der zu untersuchenden Proteine mit nicht-fluoreszierenden Fragmenten eines Fluoreszenzproteins. Sobald die Proteine miteinander interagieren, lagern sich die beiden Hälften des Fluorophors zusammen, so dass es zur Fluoreszenzkomplementation kommt. Bei

der Spaltung des Fluorophors handelt es sich meist um YFP (yellow fluorescent protein). Im Vergleich zur **Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer** Technik, bei der die Proteininteraktion durch die Weitergabe der Fluoreszenz von einem Fluoreszenzprotein auf das nächste ermittelt wird, hat die BIFC-Technik den Vorteil, dass es nur einen Zustand des YFPs gibt, fluoreszierend und nicht-fluoreszierend. Somit stellt BIFC eine einfache Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen dar (Kerppola 2008). Der Nachteil bei dieser Methode ist jedoch, dass die YFP-Komplementation irreversibel ist und es zur Selbstkomplementation beider YFP-Hälften kommen kann, was schließlich falsch positive Interaktionen hervorruft (Walter et al. 2004). Für Interaktionsstudien von Anionenkanälen und Kinasen wurden, die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine in die BIFC-kompatiblen Oozyten Vektoren (2.1.2.3) mittels USER-Technik (2.1.2.2) kloniert. Eine YFP-Komplementation konnte also stattfinden, wenn eines der zu untersuchenden Proteine in Vektor #18 und das andere in Vektor #20 eingebracht wurde. Nach der Co-Injektion der zu untersuchenden Konstrukte in *Xenopus* Oozyten konnte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop die BiFC-Analyse durchgeführt werden.

2.5.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die Dokumentation der BIFC-Interaktionsstudien (2.5.1) in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) von Leica (Leica DM6000 CS, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland). Dabei wurde das Fluorophor YFP bei einer Wellenlänge von 514 nm mit einem Argon-Laser angeregt und die Emission von Licht mit einer Wellenlänge größer als 560 nm detektiert. Die Oozyten wurden hierzu in der Äquatorebene, mittels des fokussierten Argon-Lasers, Punkt für Punkt abgerastert. Für diese BIFC-Interaktionsstudien wurde ein Leica HCX IRAPO L25x/0.95W Objektiv verwendet. Die einzelnen aufgezeichneten Bildpunkte wurden mithilfe der Software LAS AF (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) zu einem Bild zusammengefügt und die Fluoreszenz des YFPs als gelber Kanal dargestellt.

2.6 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (engl. **Double-Electrode-Voltage-Clamp**, TEVC) wurde Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals angewendet (Cole and Moore 1960; Hodgkin, Huxley, and Katz 1952; Hodgkin and Katz 1949a; Marmont 1949). Mit dieser Methode gelang es durch das Einstechen zweier Elektroden in das Riesenaxon eines Tintenfisches die Membranspannung der Zelle auf einen bestimmten Wert zu klemmen und

gleichzeitig Ionenströme abzuleiten. Diese Technik in Kombination mit dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten ermöglichte die elektrophysiologische sowie strukturelle Charakterisierung von bestimmten Membranproteinen wie Transportern, Ionenkanälen und Rezeptoren (Finkel and Gage 1985; Finkel and Redman 1984; Gurdon et al. 1971b; Hille 1992).

2.6.1 Das Messprinzip

Bei der TEVC-Technik werden zwei Mikroelektroden in die Oozyte eingestochen (Guan, Chen, and Zhang 2013). Somit ist es möglich, Ströme bei konstant gehaltener Membranspannung aufzuzeichnen. Dabei wird die Potenzialdifferenz zwischen der eingestochenen Potzialelektrode (PE) und der Referenzelektrode (RE), welche sich in der Messlösung nahe der Oozyte befindet, gemessen und diese Membranspannung (U_m , Ist-Spannung) mittels eines Differentialverstärkers mit der vorgegebenen Soll-Spannung (U_{soll}) verglichen. Über eine weitere eingestochene Stromelektrode (SE) wird ein definierter Strom appliziert, welcher dafür sorgt, die vorgegebene Potenzialdifferenz aufrechtzuerhalten (Abbildung 2-2). Der zu applizierende Strom wird durch die Differenz der aktuellen Membranspannung (U_m) und der vorgegebenen Soll-Spannung (U_{soll}) berechnet und ist direkt proportional zu dem Ionenstrom, welcher durch alle Transporter und Kanäle in der gesamten Oozytenmembran fließt.

Sobald die Membranspannung geändert wird, setzt sich der gemessene Strom aus dem Strom durch z.B. den Transporter und einem kapazitiven Strom zusammen. Der initiale kapazitive Strom deutet auf die Umladung der Membran hin. Der kapazitive Strom fließt nur während der Umladung, so dass dieser nicht bei der Messung stört und nicht abgeglichen werden musste.

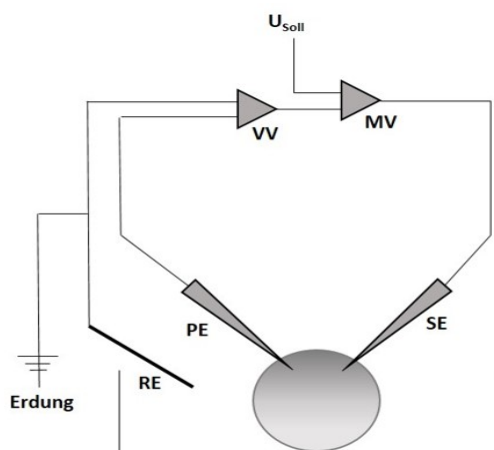


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik

Das Membranpotenzial (U_m) wird über die Potzialelektrode (PE) und dem Vorverstärker (VV) gemessen. Mittels des Messverstärkers (MV; Differentialverstärker) wird das Membranpotenzial (U_m) mit der Soll-Spannung (U_{soll}) verglichen. Über die Stromelektrode (SE) wird vom MV so viel Strom injiziert, dass U_m gleich U_{soll} ist. Die Referenzelektrode (RE), die im Badmedium direkt neben der Oozyte liegt, dient als Referenz für PE und SE sowie als Erdung.

2.6.2 Der Messaufbau

Um die TEVC-Messapparatur vor äußeren möglichen Störfaktoren zu schützen, war diese, zur Vermeidung mechanischer Einflüsse, auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut und zur Abschirmung von elektrischen Störungen von einem Faraday'schen Käfig geschützt. Zusätzlich wurden alle leitenden Bestandteile des Messplatzes geerdet. Die Messapparatur bestand aus zwei Mikromanipulatoren (Micromanipulator, Märzhäuser MM33, Drummond Scientific Company, Broomall, USA) der Badkammer mit Perfusionssystem sowie der Stereolupe (SZ40, Olympus) inklusive einer Lichtquelle (KL 1500 electronic, Schott).

Die Oozyte wurde in die Mitte der Badkammer platziert und konnte mit wechselnder Lösung gleichmäßig perfundiert werden. Die Fließgeschwindigkeit der Lösung wurde durch das Perfusionssystem vorgegeben. Mithilfe der beiden Mikromanipulatoren, an denen die Strom- und Spannungselektrode angebracht waren und auf der gegenüberliegenden Seite der Oozyte positioniert wurden, konnten beide Elektroden in die Oozyte eingestochen werden. Die Referenzelektrode wurde an die Erde des Vorverstärkers der Spannungselektrode angeschlossen und direkt neben der Oozyte in der Badkammer positioniert. Alle elektronischen Messelemente, mit Ausnahme des Vorverstärkers, waren außerhalb des Faraday'schen Käfigs positioniert.

Die von der Membran abgeleitete Stromantwort wurde über den Vorverstärker an den eigentlichen Messverstärker (Turbo TEC 01C, NPI electronics, Tamm, Deutschland) weitergeleitet. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, wurden die analogen Signale im Messverstärker tiefpassgefiltert, anschließend über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert und schließlich an den Messrechner (IBM PC, Maxdata) weitergeleitet. Mithilfe der Software Patchmaster (HEKA, Lambrecht, Deutschland) konnten verschiedene Spannungspuls-Protokolle erstellt und an die Oozytenmembran appliziert werden. Die Daten wurden anschließend im ASCII Format exportiert und sowohl mit der Software Excel (Microsoft, USA) als auch mit IGOR Pro (WaveMetrics, USA) ausgewertet.

2.6.3 Messelektroden

Bei den verwendeten Mess- und Referenzelektroden handelte es sich um Silber/Silberchlorid-Elektroden, welche aus Silberdraht (World Precision Instruments Inc., USA) bestanden und mithilfe eines Chloriergeräts (ACI-01, npi-Electronics, Tamm, Deutschland) in 2 M KCl-Lösung chloriert wurden. Für die Strom- und Spannungselektroden wurden mit einem Kapillarziehgerät (Scientific Instrument Lab, Narishige Japan) Einstichkapillaren aus Borosilikatgaskapillaren (KWIK-FIL™, World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) gezogen, mit 3 M KCl-Lösung

befüllt und auf die chlorierten Silberdrähte gesteckt. Der Öffnungsdurchmesser der Messkapillaren wurde dabei so gewählt, dass die Widerstände in der Badlösung zwischen 0,3 und 1,5 M Ω lagen. Die Referenzelektrode bestand aus einem Polyvenylschlauch, der ebenfalls mit 3 M KCl befüllt und auf den chlorierten Silberdraht gesteckt wurde. Der Schlauch wurde mit einem Agarstopfen (2 % Agar in 3 M KCl) verschlossen, um zu verhindern, dass die KCl-Lösung aus dem Schlauch in die Messlösung der Badkammer gelangt.

2.6.4 Konventionen

Die Membranspannung wird definiert über die Potenzialdifferenz zwischen zwei Kompartimenten, welche durch die Membran voneinander getrennt sind. Dabei wird das extrazelluläre Potenzial biologischer Zellen gemäß Konvention auf null gesetzt, so dass durch einen Influx von Kationen als auch durch einen Efflux von Anionen negativer Strom generiert. Durch einen Efflux von Kationen bzw. durch einen Influx von Anionen wird dagegen ein positiver Strom registriert.

2.6.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle

Nach dem Eintauchen beider Elektroden (Strom- und Spannungselektrode) in die Badlösung wurde zunächst das Offset-Potenzial beider Elektroden auf null abgeglichen, da die Badlösung immer eine geringere Chloridkonzentration als die Elektrodenlösung (3 M KCl) aufwies und sich dadurch ein Potenzialgradient bildete. Zudem wurden die Widerstände beider Elektroden geprüft. Lagen diese in einem Bereich von 0,3 bis 1,5 M Ω , konnten die Messkapillaren zum Einstechen in die Membran verwendet werden. Das Einstechen der Elektroden in die Oozyte konnte sowohl mikroskopisch durch ein Binokular, als auch durch ein akustisches Signal, welches den Pipettenwiderstand wiedergab, kontrolliert werden. Nach dem Einstechen beider Elektroden in die Oozyte wurde in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet, in welchem die Spannung auf eine definierte Spannung (Haltespannung, U_H) geklemmt wurde. Um die Abdichtung zwischen der Membran und den Elektroden zu überprüfen, wurde ein Testpuls appliziert. Während des Testpulses wurden Spannungssprünge von +20 auf -20 mV relativ zur Haltespannung (V_H) mit einer Dauer von 10 ms durchgeführt. Bei Single-Puls-Messungen wurde die Stromantwort als Reaktion auf die jeweiligen Lösungsbedingungen im zeitlichen Verlauf bei einer vorgegebenen Haltespannung aufgezeichnet. Die Wahl der applizierten Spannung richtete sich dabei nach dem zu untersuchenden Kanal- und Transportprotein. Für eine detailliertere Charakterisierung der Proteine wurde ihr Verhalten in Abhängigkeit von der Membranspannung untersucht. Dieses sogenannte Einfachspannungspuls-Protokoll variierte, je nachdem, ob es sich bei dem zu untersuchenden Protein um einen Kanal oder

Transporter handelte. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung von Transportproteinen wurde, ausgehend von der Haltespannung (V_H) von -20 mV, eine Testspannung für 20 ms angelegt, um danach wieder zur Haltespannung zurückzukehren. Das Pulsprotokoll bestand aus 22 aufeinanderfolgenden Durchläufen, wobei die Spannung, beginnend bei $+40$ mV, um 10 mV-Schritte erniedrigt wurde (Testspannungen von $+40$ bis -180 mV). Für die Auswertung der Transportproteine wurden die Gleichgewichtsströme (steady-state Ströme, I_{ss}), welche sich im hinteren Bereich der durch die Testspannungen ausgelösten Stromantwort befinden, abgegriffen (Abbildung 2-3).

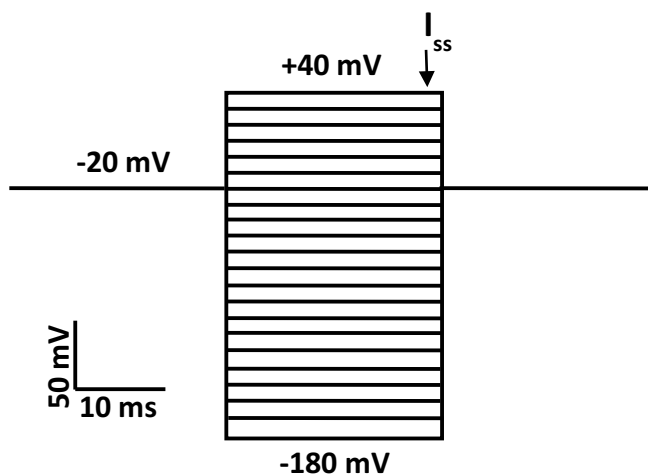


Abbildung 2-3: Standard-Einfachspannungspuls-Protokoll für Transporter

Nach dem Anlegen der Haltespannung (V_H) von -20 mV für 20 ms wird für 20 ms eine Testspannung appliziert, um dann wieder auf die Haltespannung zurückzukehren. Bei jedem Durchgang wird die Testspannung um 10 mV-Schritte erniedrigt, so dass der Messbereich von $+40$ bis -180 mV reicht. Das Pulsprotokoll besteht aus insgesamt 22 aufeinanderfolgenden Durchläufen. Greift man die durch die Testspannung ausgelösten Ströme im hinteren Bereich ab, so können die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) gewonnen werden.

Zur elektrophysiologischen Untersuchung von Kanälen wurde die Oozyte zu Beginn auf eine Haltespannung von 0 mV geklemmt und anschließend verschiedene Membranspannungen für eine bestimmte Zeitspanne angelegt. Das Standard-Pulsprotokoll zur elektrophysiologischen Charakterisierung von Anionenkanälen ist in Abbildung 2-4 dargestellt. Das Pulsprotokoll bestand aus 14 Durchläufen, wobei die Spannung von $+60$ mV um 20 mV-Schritte erniedrigt wurde (Testspannungen von $+60$ bis -200 mV). Dabei wurden die unterschiedlichen Spannungen für jeweils 20 Sekunden appliziert. Zu Beginn und am Ende des Pulsprotokolls wurde die Oozyte auf die Haltespannung von 0 mV geklemmt. Bevor jedoch am Ende wieder die Haltespannung angelegt wurde, wurde kurzzeitig für 3 Sekunden ein Folgepuls von -120 mV angelegt. Zwischen den einzelnen Durchläufen waren die Oozyten für 35 Sekunden auf die Haltespannung geklemmt. Für die Auswertung der zu untersuchenden Kanäle wurden die Stromantworten an drei unterschiedlichen Zeitpunkten abgegriffen (I_{inst} , I_{ss} , I_{tail}) (Abbildung 2-4).

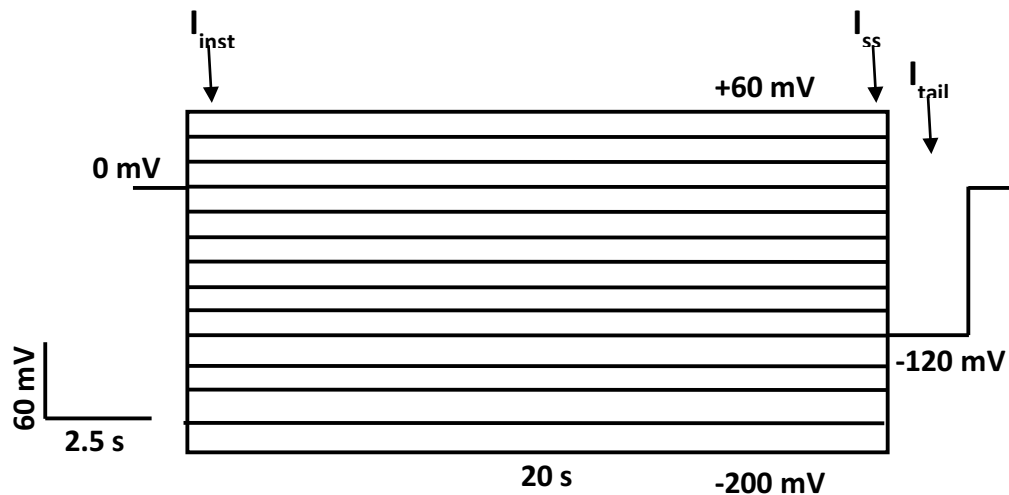


Abbildung 2-4: Standard-Spannungspuls-Protokoll für Anionenkanäle

Nach dem Anlegen der Haltespannung von 0 mV für 1 Sekunde, folgt für 20 Sekunden eine Testspannung, bei der die Spannung in jedem der 14 Durchläufe, ausgehend von +60 mV, um 20 mV-Schritte erniedrigt wird. Im Anschluss an die jeweilige Testspannung wird für 3 Sekunden ein Folgebuss bei -120 mV appliziert. Am Ende folgt wieder das Anlegen der Haltespannung von 0 mV für 1 Sekunde. Zwischen den einzelnen Durchläufen wird die Oozyte für 35 Sekunden ebenfalls auf die Haltespannung geklemmt. Greift man die aus der applizierten Spannung resultierenden Ströme nach ca. 50 ms ab, so erhält man die instantanen Ströme (I_{inst}), nach ca. 19 Sekunden dagegen erhält man die Gleichgewichtsströme (I_{ss}). Die Tailströme (I_{tail}) erhält man, wenn die resultierende Stromantwort aus dem Folgebuss abgegriffen wird.

Um S-Typ Anionenkanäle unabhängig von deren zeitlichen Spannungsabhängigkeit zu untersuchen, wurde die Stromantwort 50 ms nach der Applikation der verschiedenen Spannungen abgegriffen (instantane Ströme, I_{inst}). Dagegen wurden zur Analysierung der Spannungsabhängigkeit die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) herangezogen. Zur Ermittlung der relativen Offenwahrscheinlichkeit wurden die Ströme kurz nach dem Spannungssprung auf -120 mV verwendet (tail Ströme, I_{tail}).

Da bei der Messung von Kanälen die Membran auf null geklemmt wurde, entsprach das gemessene Membranpotenzial gleich dem Umkehrpotenzial für die betrachteten Ionen. So war es möglich, anhand des gemessenen Umkehrpotenzials, in der Anwesenheit verschiedener Messlösungen (mit jeweils nur einer Sorte von Anionen) die relative Permeabilität der S-Typ Anionenkanäle für das jeweilige Ion zu ermitteln.

2.6.6 Messlösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transportproteine wurden auf ihre pH-Abhängigkeit und ihre Selektivität hin untersucht. Zudem erfolgten weitere Charakterisierungen hinsichtlich ihrer Temperaturabhängigkeit sowie der Bestimmung der Substratkonzentration. Für die einzelnen Messreihen wurden folgende Lösungen verwendet:

Reagenz	Konzentration
Na-Gluconat	30 mM
K-Gluconat	2 mM
LaCl ₃	2 mM
Ca-Gluconat	1 mM
Mg-Gluconat	1 mM
D-Sorbitol	65 mM
MES/Tris	10 mM
+	
0 Suc-Lösung: D-Sorbitol	100 mM
100 Suc-Lösung: D-Saccharose	100 mM
bzw.	
0 Gluc-Lösung: D-Sorbitol	100 mM
100 Gluc-Lösung: D-Saccharose	100 mM

Tabelle 2-15: Standardmesslösungen für Zuckertransporter

Mithilfe des Vapor Pressure Osmometers 5520 (Schlag GmbH, Bergisch Gladbach) wurde die Osmolalität der Messlösungen bei Bedarf mit D-Sorbitol auf 220 mosmol/kg eingestellt. Das in der Lösung enthaltene Sorbitol konnte, je nachdem welcher Zuckertransporter untersucht werden sollte, durch andere Zucker wie beispielsweise Saccharose oder Glucose ersetzt werden. Die pH-Werte wurden mit MES/Tris (pH 6 – 7) und Citrat/Tris (pH 3 – 5) gepuffert und mit einem Digital-pH-Meter (Knick) bestimmt. Zur Herstellung unterschiedlicher Zuckerkonzentrationen wurde der entsprechende Zucker mit D-Sorbitol ersetzt.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenkanäle wurden folgende Messlösungen verwendet:

Reagenz	Konzentration
Natriumsalz des verwendeten Anions (Na-Gluconat, NaNO ₃ , NaCl)	100 mM
Ca-Gluconat	1 mM
Mg-Gluconat	1 mM
MES/Tris (pH 5.6)	10 mM

Tabelle 2-16: Standardmesslösung für Anionenkanäle

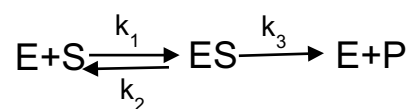
Zur Herstellung von Lösungen mit reduzierter Anionenzahl wurde das entsprechende Anion durch Na-Gluconat ersetzt. Zu den Messlösungen wurde teilweise 1 mM LaCl₃ hinzugefügt, um eine mögliche Aktivierung endogener Oozytenkanäle zu vermeiden. Für Untersuchungen der Anionenkanäle hinsichtlich ihrer Selektivität wurde die Standardlösung mit je 50 mM des entsprechenden Anions versetzt und der pH-Wert mit Tris/MES auf pH 7.5 eingestellt.

2.7 Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse

Mithilfe der oben aufgezeigten Spannungsprotokolle für Transportproteine (Abbildung 2-3) und Kanalproteine (Abbildung 2-4) war es möglich, folgende charakteristischen Eigenschaften zu analysieren.

2.7.1 Enzymkinetik-Ermittlung des K_m-Wertes

Die Michaelis-Menten-Theorie beschreibt die Kinetik von Enzymen und trifft Aussagen über eine quantitative Bestimmung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Das Enzym (E) bindet dabei reversibel an das Substrat (S) und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) aus. Das Substrat wird anschließend umgewandelt und der Komplex zerfällt in das Enzym (E) und dessen Produkt (P). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Umwandlung von ES zu P. Eine enzymatisch katalysierte Reaktion lässt sich vereinfacht durch folgende Reaktionsgleichung beschreiben:



Gleichung 1

E = Enzym

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P = Produkt

k_{1,2,3} = Geschwindigkeitskonstante

Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen kann bei enzymatischen Reaktionen eine Sättigung erreicht werden. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen können alle Bindestellen eines Enzyms durch das umzusetzende Substrat besetzt sein, so dass die Umsatzgeschwindigkeit V (beschrieben durch die Geschwindigkeitskonstante k₃) nicht weiter erhöht werden kann und die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{max} erreicht wird. Daraus resultiert der sogenannte K_m-

Wert, welcher die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit darstellt und als Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dient.

Die Michaelis-Menten-Theorie kann auch bei TEVC-Messungen (2.6) Anwendung finden. Die gemessenen Gleichgewichtsströme (I_{ss}) bei verschiedenen Substratkonzentrationen können ebenso eine Sättigungskinetik aufzeigen, welche mittels der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2) beschrieben werden kann. Daraus können folgende Parameter wie der K_m -Wert, die halbmaximale Substratkonzentration sowie der durch das Transportprotein erreichte maximale Strom (I_{max}) bestimmt werden.

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

Gleichung 2

I=Strom

I_{MAX} = maximaler Strom

S = Substratkonzentration

K_m = halbmaximale Substratkonzentration

Ein niedriger K_m -Wert weist darauf hin, dass bereits bei geringen Substratkonzentrationen ein Transport über die Membran stattfindet, der effizient und mit hoher bis maximaler Geschwindigkeit ablaufen kann.

Durch die Bestimmung des K_m -Wertes eines Transportproteins ist es möglich, dieses in die Gruppe der nieder- oder hochaffinen Transporter einzuordnen.

Für die Bestimmung des K_m -Wertes wurden die jeweiligen ermittelten Differenzströme des zu untersuchenden Transporters bei unterschiedlichen SUC-Konzentrationen eingesetzt.

Aus diesen Messwerten wurden die Ströme der jeweiligen Saccharosekonzentration für die Membranspannung -130 mV, -100 mV und -30 mV herausgegriffen und mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung gefittet. Dadurch erhielt man die maximalen Ströme bei der jeweiligen Membranspannung. Im Anschluss wurden diese auf den maximalen Strom bei einer Membranspannung von -130 mV (I_{max}) normiert. Daraus konnten für jede Spannung die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen berechnet werden. Die normierten Ströme wurden dann gegen die Saccharosekonzentration bei den jeweiligen Membranspannungen (-130 mV, -100 mV und -30 mV) aufgetragen; anhand dieses Diagramms wurde letztendlich der K_m -Wert bei den entsprechenden Spannungen bestimmt.

Zusätzlich wurde die prozentuale Inhibierung der Transportströme durch Sucralose (I_{in}) als $100 (I_0 - I_{ScI}) / I_0$ berechnet, wobei I_0 und I_{ScI} entsprechend die Ströme in Abwesenheit von Substrat und in Anwesenheit von Sucralose (ScI) darstellten. Mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung wurden die Daten mathematisch angenähert,

$$I_{in} = \frac{100 [\text{ScI}]}{([\text{ScI}] + K_{\text{ScI}})}$$

Gleichung 3

K_{ScI} = halbmaximale Ligandenkonzentration der Inhibierung (IC_{50})

I_{in} = Inhibierung i %,

$[\text{ScI}]$ = Sucralosekonzentration

2.7.2 Q_{10} -Wert

Sowohl in physiologischen als auch in biochemischen Prozessen kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Änderung der Temperatur beeinflusst werden. Dies wird durch die **Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel)**, oder auch die van't-Hoff'sche-Regel genannt, beschrieben. Sie besagt, dass sich, durch eine Erhöhung der Temperatur (T) um 10 Kelvin, die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis verdreifacht. Der Faktor, um den die Reaktionsgeschwindigkeit steigt, sobald die Temperatur um 10 Kelvin erhöht wird, wird als Q_{10} -Wert bezeichnet und wird wie folgt definiert:

$$Q_{10} = \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{10K}{T_2 - T_1}}$$

Gleichung 4

$k_{1,2}$ = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

$T_{1,2}$ = Temperaturen in Kelvin (K)

Generell weisen temperaturunabhängige Prozesse einen Q_{10} -Wert von etwa 1 auf. Das bedeutet, eine Temperaturerhöhung hat keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei chemischen Prozessen dagegen spielt die Temperatur meist eine große Rolle auf die Reaktionsgeschwindigkeit, so dass der Q_{10} -Wert meist zwischen 2 und 3 liegt.

Transportproteine wie Carrier (Transporter) weisen aufgrund von Konformationsänderungen eine temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitsrate auf, woraus sich ein Q_{10} -Wert von ≥ 2 ergibt. Der Transport über Kanälen dagegen ist relativ temperaturunabhängig, so dass sie einen geringeren Q_{10} -Wert von 1.2 bis 1.5 aufweisen (Hille 2001).

2.7.3 Relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit (P_0)

Unter der Annahme, dass die zu untersuchenden Kanäle nur in zwei unterschiedlichen Zuständen, dem offenen und dem geschlossenen Zustand, vorliegen können, hängt der Strom (I) über die gesamte Oozytenmembran ausschließlich von der Anzahl (N) der Kanäle in der Membran, dem Einzelkanalstrom (i) bei einer bestimmten Spannung sowie der Offenwahrscheinlichkeit P_0 ab. Unter diesen Voraussetzungen können diese Ganzzellströme über die Oozytenmembran durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I(U, t) = N \cdot i(U) \cdot p_0(U, t)$$

Gleichung 5

I = Ganzzellstrom

N = Anzahl der Kanäle

i = spannungsabhängiger Einzelkanalstrom

p_0 = Offenwahrscheinlichkeit

Aufgrund der konstanten Spannung des Folgepulses, welcher durch das vorgegebene Spannungs-Pulsprotokoll (Abbildung 2-4) festgelegt wurde, konnte über die daraus resultierenden Tailströme (I_{tail}) zum Zeitpunkt $t=0$ direkt auf relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit P_0 , zurückgeschlossen werden, so dass $N \cdot i(U) = \text{konstant}$ gilt. Die in Gleichung 5 angegebene Offenwahrscheinlichkeit p_0 kann mithilfe der Boltzmann Funktion näher beschrieben werden.

2.7.4 Bestimmung des Umkehrpotenzials und der relativen Permeabilität

Das Umkehrpotenzial U_{rev} beschreibt die Membranspannung, bei der die Summe aller Ionenströme über die Membran gleich null ist. Die treibende Kraft für diesen Ionenfluss wird über den elektrochemischen Gradienten aller beteiligten Ionen bewerkstelligt. Mithilfe der **Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK)** ist es möglich, das Umkehrpotenzial eines Transportproteins, unter der Beteiligung verschiedener Ionen, zu berechnen (Goldman 1943; Hodgkin and Katz 1949b).

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

Gleichung 6

R = molare Gaskonstante (8.31 J/mol*K)

T = absolute Temperatur in Kelvin (K)

F = Faradaykonstante (96485.33 C/mol)

P = Permeabilitätskoeffizient der einzelnen Ionen

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

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Anionenkanäle in Anwesenheit eines einzelnen permeierenden Anions untersucht, so dass sich das Umkehrpotenzial U_{rev} ausschließlich nach dem elektrochemischen Gradienten dieses Ions richtet und die GHK-Gleichung zur Nernst-Gleichung vereinfacht werden kann.

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{z_x \cdot F} * \ln \frac{P_x * [X^-]_{innen}}{P_x * [X^-]_{außen}}$$

Gleichung 7

Handelt es sich um ein einwertiges Anion ($z_x=1$) und eine absolute Temperatur von 298,15 K, so kann die Nernst-Gleichung weiter vereinfacht werden.

$$U_{rev} = 59,1 \text{ mV} * \lg \frac{P_x * [X^-]_{innen}}{P_x * [X^-]_{außen}}$$

Gleichung 8

Unter Berücksichtigung dieser Gleichung verschiebt sich das Umkehrpotenzial U_{rev} bei einer 10-fachen Änderung der extrazellulären Anionenkonzentration um 59,1 mV.

Da die intrazelluläre Anionenkonzentration im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten nicht bekannt ist, wurden bei den Messungen, mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC-Technik), die relativen Permeabilitäten für unterschiedliche Anionen im Vergleich zu einem definierten Kontrollmedium mit 50 mM NaNO₃ (2.6.6) bestimmt:

$$\frac{P_x}{P_{NO_3^-}} = 10^{\frac{\Delta U_{rev}}{59,1 \text{ mV}}} * \frac{[NO_3^-]_{innen}}{[X^-]_{außen}}$$

Gleichung 9

Dabei wird U_{rev} definiert durch die Differenz der NO₃⁻ und der der X⁻ gemessenen Umkehrpotenziale.

2.8 Verwendete Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades *pro analysis* der Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der Anpassung von Pflanzen an trockene und/oder heiße Habitats untersucht. Zum einen wurden der Einfluss der Temperatur auf die Transporteigenschaften von Saccharosetransportern aus der Dattelpalme beleuchtet (3.1) und zum anderen die Eigenschaften und die posttranslationale Regulation von Schließzell-spezifischen Anionenkanälen aus der Dattelpalme und der Gerste verglichen (3.2).

3.1 Identifizierung und Klonierung von Transportproteinen aus der Dattelpalme

Die Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) vermag es, bei extremer Hitze in der Wüste zu überleben und dabei stark zuckerhaltige Früchte zu produzieren. In Abschnitt 3.1 der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, wie es der Dattelpalme unter Wüstenbedingungen gelingt, Saccharose in den Phloemzellen und später in der Dattelfrucht zu akkumulieren. Deshalb wurden die Transporteigenschaften von Saccharosetransportern aus *Phoenix dactylifera* im Vergleich mit dem bereits hinreichend analysierten Saccharosetransporter ZmSUT1 elektrophysiologisch charakterisiert. Anhand von Genom- und Transkriptomsequenzierungen der Dattelpalme (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem, Hu, and Zhang 2013) war es möglich, Zuckertransporter zu identifizieren und erste Vorhersagen über die phylogenetische Einordnung sowie die Funktion dieser Proteine zu treffen. Mithilfe dieser Vorhersagen gelang es, einige Saccharosetransporter aus *Phoenix dactylifera* zu klonieren.

3.1.1 Klonierung der Transportproteine aus *Phoenix dactylifera*

Auf Basis von veröffentlichten Genom- und Transkriptominformationen der Dattelpalme (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem, Hu, and Zhang 2013) aus *Phoenix dactylifera* wurden Orthologe zu bereits bekannten Zuckertransportern monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen identifiziert. Die Gene wurden anschließend aus cDNA der Pflanze kloniert oder anhand der bekannten und verifizierten Sequenzen synthetisiert (GeneART Gene Synthesis Verfahren; Thermo Fisher Scientific®).

Die unterschiedlichen Transportproteine wurden mir zu Beginn meiner Doktorarbeit vom Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften als cDNA im pGEMTeasy Vektor bereitgestellt (vgl. 2.1.2.1), welche im Anschluss von mir mittels Sanger-Sequenzierung (vgl. 2.1.9) überprüft wurden. Nach erfolgreicher Verifizierung der einzelnen Sequenzen konnten diese in die entsprechenden Expressionsvektoren (vgl. 2.1.2.3) zur elektrophysiologischen Charakterisierung in *Xenopus laevis* Oozyten umkloniert werden. Für die

elektrophysiologischen Analysen der unterschiedlichen Transporter wurde die zuvor hergestellte cRNA (vgl. 2.2.1) in das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten injiziert und zur Expression für 4-5 Tage bei 16°C inkubiert.

In der folgenden Tabelle sind alle Transportproteine, die erfolgreich anhand ihrer Homologie identifiziert und kloniert wurden, aufgelistet.

Insgesamt vier verschiedene putative Saccharosetransporter (SUTs) aus *Phoenix dactylifera* konnten kloniert und verifiziert werden. Die Homologien der Datteltransporter zu den bekannten Orthologen aus Mais bewegen sich zwischen 66 und 72 % identische Aminosäuren. Der Trivialname der einzelnen aufgelisteten Proteine richtet sich dabei nach der phylogenetischen Klassifizierung und den untersuchten Transportcharakteristika, auf die in den folgenden Kapiteln im Detail eingegangen wird.

Trivialname	Homologie zu <i>Zea mays</i>
PdSUT1	70,849 % zu ZmSUT1
PdSUT3a	66,218 % zu ZmSUT3
PdSUT3b	68,067 % zu ZmSUT3
PdSUT4	71,372 % zu ZmSUT4

Tabelle 3-1: Auflistung der identifizierten und klonierten Transportproteine aus *Phoenix dactylifera*

In der Tabelle sind die Transportproteine mit ihren Trivialnamen aufgelistet. Zusätzlich ist für die aufgelisteten Transportproteine die Homologie (% identische Aminosäuren) zu den bereits bekannten Transportproteinen aus *Zea mays* angegeben.

3.1.2 Phylogenetische Einordnung der identifizierten putativen Saccharosetransportproteine

Basierend auf Sequenzhomologien können Transportproteine phylogenetisch in unterschiedliche Transporter-Familien eingruppiert werden. Innerhalb der einzelnen Familie tritt oftmals noch eine weitere Klassifizierung in Untergruppen auf. Anhand dieser phylogenetischen Einordnung können erste Vorhersagen hinsichtlich ihrer Funktion sowie Transportcharakteristika der zu untersuchenden Proteine getroffen werden.

3.1.3 Eingruppierung der PdSUTs innerhalb der pflanzlichen Saccharosetransporter-Familie

Phylogenetisch können die zu untersuchenden pflanzlichen Saccharosetransporter der Dattelpalme (PdSUTs) in der GPH-Kationen-Symporter-Familie innerhalb der MFS-Superfamilie eingruppiert werden. Aufgrund der großen Anzahl an zur Verfügung stehenden Proteinsequenzen aus unterschiedlichsten Pflanzenarten und funktionellen Studien lassen

sich diese hinsichtlich ihrer Struktur und unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilen: Typ I, II und III (Aoki et al. 2003; Reinders, Sivitz, and Ward 2012). Alle Landpflanzen besitzen Typ II und III SUC-Transporter, während der Typ I nur bei Eudikyledonen gefunden werden konnte. Der Typ I ist für grundlegende Funktionen wie z.B. der Beladung des Phloems verantwortlich (Riesmeier, Willmitzer, and Frommer 1994; Gottwald et al. 2000; Sivitz, Reinders, and Ward 2008). Monokotyledone Pflanzen hingegen nutzen Typ II Saccharosetransporter für die Beladung des Phloems mit Saccharose. Der Typ II wird dabei nochmals in zwei Unterfamilien, Typ IIA und IIB, unterteilt (Braun and Slewinski 2009). Vertreter des Typs IIA scheinen, aufgrund ihres verlängerten zentralen Loops, eine Ahnenform des Typs IIB zu sein. Das Genom von allen Angiospermen besitzt vermutlich ein Gen der IIA Untergruppe. Im Vergleich zu Typ I und Typ II der SUC-Transporter, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, sind Vertreter des Typs III in der Vakuolenmembran anzutreffen (Reinders et al. 2008).

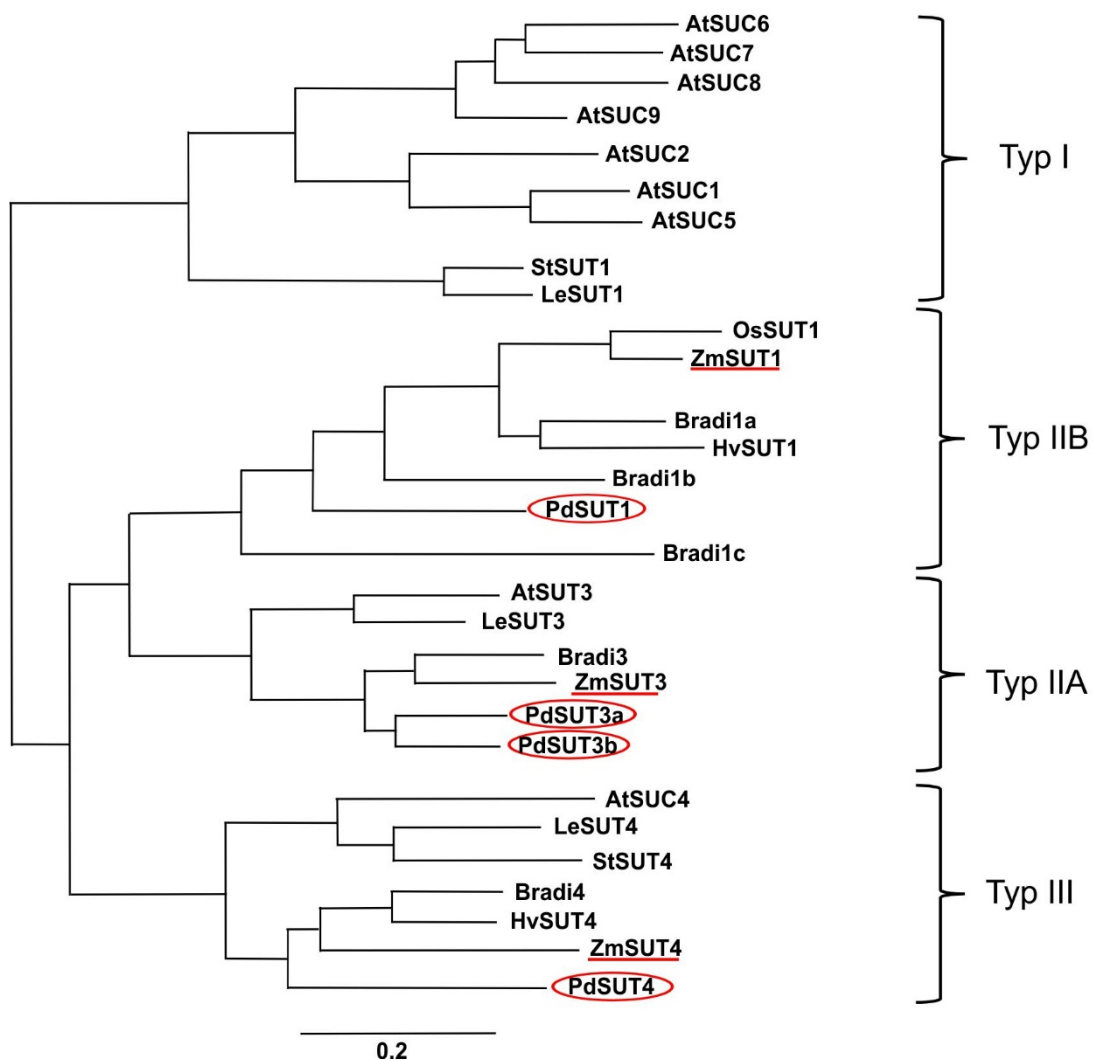


Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung der Saccharosetransporter aus *Phoenix dactylifera*
 Die Einteilung basierte auf den Aminosäuresequenzen der klonierten Transporter. Zur Klassifizierung wurden SUC-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (At), *Zea mays* (Zm), *Hordeum vulgare* (Hv), *Solanum tuberosum* (St), *Lycopersicon esculentum* (Le) und *Brachypodium distachyon* (Bd) herangezogen. Die einzelnen SUC-Transporter aus *Phoenix dactylifera* werden umrandet dargestellt und das orthologe Transportprotein aus *Zea mays* ist mit einem Unterstrich gekennzeichnet. Für die korrekte phylogenetische Einordnung ist eine Sequenzidentität von über 40 % ein zwingendes Kriterium. Phylogeny.fr „One Click“ Verfahren (http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi)

Die phylogenetische Analyse der *Phoenix dactylifera* Saccharosetransporter (PdSUTs) in Abbildung 3-1 zeigt, dass sich die klonierten Transportproteine innerhalb der drei bekannten Familien (Typ I, II und III) der pflanzlichen SUC-Transporter einordnen.

PdSUT1 konnte aufgrund seiner Sequenzhomologie zu den Saccharosetransportern des Typs IIB dieser Familie zugeordnet werden. PdSUT3a und PdSUT3b dagegen wurden phylogenetisch dem Typ IIA zugeteilt. Alle SUC-Transporter, die bislang charakterisiert worden

sind, stellen energieabhängige Protonensymporter dar, die Saccharose sehr spezifisch mit K_m -Werten zwischen 0,3-12 mM transportieren. Vertreter der Typ-II-Transporter wie z.B. ZmSUT1 weisen, im Vergleich zu den Typ-I-Transportern, höhere K_m -Werte für Saccharose auf und gehören damit zu den niederaffinen (low affinity) Transportern (Aoki et al. 2003; Carpaneto et al. 2005; Reinders et al. 2006). Diese monokotyledonen spezifischen Saccharosetransporter des Typs II werden für die Beladung des Phloems mit Saccharose genutzt. Der größte Verwandtschaftsgrad mit der höchsten Sequenzidentität von PdSUT1 bestand mit 70.85 % zu ZmSUT1 aus *Zea mays*, mit 66.93 % zu Bradi1a aus *Brachypodium distachyon* und mit 66.41 % zu HvSUT1 aus *Hordeum vulgare*. PdSUT3a zeigte die höchste Sequenzidentität mit 68.14 % zu Bradi3 aus *Brachypodium distachyon*, mit 66.22 % zu ZmSUT3 aus *Zea mays* und schließlich mit 65.29 % zu LeSUT3 aus *Lycopersicon esculentum*. PdSUT3b zeigte, im Vergleich zu PdSUT3a, sehr ähnliche Verwandtschaftsgrade zu den Mitgliedern des Typs IIA. Die Sequenzanalysen von PdSUT3b zu Bradi3 ergaben eine Identität von 68.97 %, zu ZmSUT3 von 68.07 % und zu LeSUT3 lag eine Identität von 64.80 % vor.

PdSUT4 dagegen wurde aufgrund der analysierten Aminosäuresequenz dem Typ III der SUC-Transporter zugeordnet. Im Vergleich zu Typ I und Typ II von Saccharosetransportern, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, werden die Mitglieder des Typs III mit der Vakuolenmembran assoziiert, die für Saccharoseabgabe aus der Vakuole ins Zytoplasma verantwortlich sind (Weise et al. 2000; Reinders et al. 2008; Schulz et al. 2011). Die Sequenzanalysen von PdSUT4 zeigten den größten Verwandtschaftsgrad mit 71.37 % zu ZmSUT4, mit 69.75 % zu Bradi4 und schließlich mit 66.93 % zu HvSUT4.

Die ermittelten phylogenetischen Zugehörigkeiten der unterschiedlichen Transportproteine aus der Dattelpalme sollten im Folgenden durch detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt werden, da sich die Transporter der einzelnen Familien nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch in ihren funktionellen Charakteristika unterscheiden.

3.1.4 Expressionsmuster und funktionelle Charakterisierung der Saccharosetransporter aus der Dattelpalme

Um die korrekte phylogenetische Klassifizierung der PdSUTs innerhalb der verschiedenen Gruppen pflanzlicher Saccharosetransporter zu überprüfen, wurden diese elektrophysiologisch, mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik auf ihre Funktion hin charakterisiert (2.6). Des Weiteren wurde das Expressionsmuster anhand von Transkriptanalysen untersucht, um erste Hinweise auf die physiologische Funktion der SUC-Transporter in spezifischen Pflanzengewebe zu erhalten.

3.1.5 Expressionsverhalten der PdSUTs

Für die Quantifizierung der Expression der SUC-Transporter aus *Phoenix dactylifera* wurden diese mittels qPCR (2.3) analysiert. Anhand der gewonnenen Daten war es möglich, das Expressionsverhalten dieser Transportproteine in unterschiedlichen Geweben zu detektieren und somit die phylogenetische Einordnung zu verifizieren sowie erste Informationen über deren mögliche funktionelle Beteiligung innerhalb der unterschiedlichen Pflanzengewebe zu gewinnen. Um differenzieren zu können, innerhalb welcher Pflanzengewebe die SUC-Transporter exprimiert werden, wurden zunächst Proben aus Blatt, Spross und Wurzel der Dattelpalme für die Ermittlung des jeweiligen Expressionslevels von PdSUT1, PdSUT3a, PdSUT3b und PdSUT4 herangezogen. Um letztendlich die Expression der Transkripte unterschiedlicher Proben miteinander vergleichen zu können, wurden für die Berechnung der Molekülnzahlen, die gemessenen Transkriptmengen auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen *EF1 α* (elongation factor 1 α), welches die GTP-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle von Ribosomen während der Proteinbiosynthese fördert, normiert. Dadurch konnte die Anzahl der Moleküle eines Produkts pro 10.000 Molekülen *EF1 α* bestimmt werden.

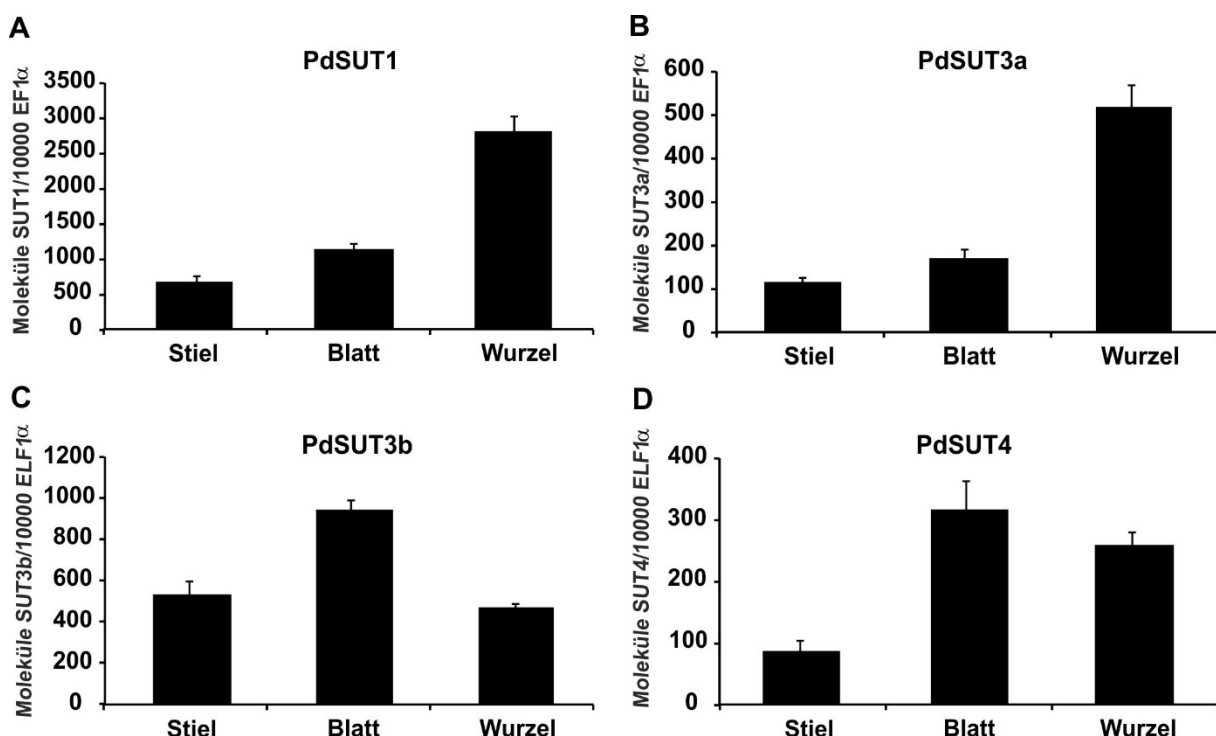


Abbildung 3-2: Expressionsanalysen der PdSUTs in unterschiedlichen Geweben

Transkriptanalysen von PdSUT1, 3a, 3b und 4 aus der Dattelpalme in unterschiedlichen Geweben (Stiel, Blatt, Wurzel). Die Dattelpalmen wurden unter Standardbedingungen (35° C, 60% Luftfeuchtigkeit, Belichtungsdauer: 16h/8h) im Gewächshaus gehalten. Angegeben sind jeweils die gemessenen Transkriptmengen, welche auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen *EF1 α* normiert worden

sind. Die ermittelte Molekülzahl jedes Saccharosetransporters wurde somit pro 10.000 Molekülen *EF1 α* angegeben. Die (A) PdSUT1 weist in der Wurzel das höchste Expressionslevel im Vergleich zu Blatt und Stiel auf. (B) PdSUT3a zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie PdSUT1, jedoch sind die Transkriptmengen insgesamt deutlich geringer. (C) Bei PdSUT3b konnte das höchste Expressionslevel im Blatt detektiert werden, (D) PdSUT4 dagegen zeigte sowohl im Blatt als auch in der Wurzel das höchste Expressionslevel.

Anhand der Expressionsanalyse der unterschiedlichen Transportproteine aus der Dattelpalme konnte gezeigt werden, dass die jeweils untersuchten Zuckertransporter in den analysierten Gewebetypen Blatt, Stiel und Wurzel unterschiedlich stark vertreten waren (Abbildung 3-2). PdSUT1 wies deutlich die höchste Expression in der Wurzel auf, jedoch konnten auch im Stiel und im Blatt relativ hohe Transkriptmengen, im Vergleich zur Wurzel, detektiert werden.

PdSUT3a zeigte ein sehr ähnliches Expressionsmuster, jedoch mit insgesamt geringeren Transkriptmengen im Vergleich zu PdSUT1. Transkripte von PdSUT3a waren am stärksten in der Wurzel zu finden; sie konnten aber auch im Stiel und Blatt nachgewiesen werden. Transkripte von PdSUT3b konnten ebenfalls in allen drei Gewebetypen nachgewiesen werden, wobei die größte Transkriptmenge im Blatt induziert wurde. Die Genaktivität von PdSUT4 war sowohl im Blatt als auch in der Wurzel höher als im Stiel.

Die Expressionsdaten der unterschiedlichen Zuckertransporter weisen, aufgrund ihrer unterschiedlich starken Präsenz in den jeweiligen Gewebetypen, auf unterschiedliche physiologische Funktionen hin.

Aoki et al. gelang es bereits im Jahr 1999 den Modelltransporters ZmSUT1 zu klonieren und konnte dessen Expression in „source“- und „sink“-Gewebe, wie in ausgewachsenen Blattspalten, Blattscheiden und auch im Stängel nachweisen. Zudem konnte er zum einen beweisen, dass das Expressionslevel von ZmSUT1 ausgehend von der Blattbasis zur Blattspitze signifikant ansteigt, und zum anderen konnte er zeigen, dass das Expressionsmuster von ZmSUT1 einen diurnalen Verlauf mit maximaler Expression am Ende des Tages und minimaler Expression in der Nacht aufweist (Aoki et al. 1999).

Um nun im Folgenden herauszufinden, ob das Expressionsmuster der Zuckertransporter der Dattelpalme ein ähnliches Verhalten aufweist, wurden die Blätter der Dattelpalme aus unterschiedlichen Blattbereichen (Blattbasis, Blattmitte, Blattspitze) hinsichtlich ihres Expressionslevels untersucht. Zudem wurden „künstliche Sinks“ generiert, indem Teile des Blatts für 45 Stunden mit Alufolie umwickelt wurden. Da in diesen Bereichen keine Photosynthese stattfinden kann, muss das Gewebe mit Kohlenhydraten versorgt werden (sink-Gewebe). Dieser Ansatz sollte zeigen, ob eine Genaktivität der Transporter in „source“- und/oder in „sink“-Gewebe vorhanden ist.

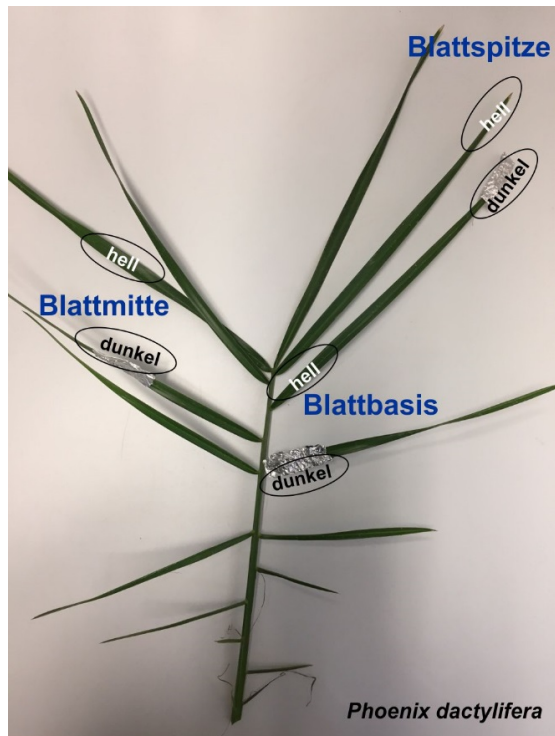


Abbildung 3-3: Veranschaulichung der Probenvorbereitung zur Bestimmung des Expressionslevels innerhalb der unterschiedlichen Blattbereiche von Blättern aus *Phoenix dactylifera*
Für die Untersuchung des Expressionsverhaltens der unterschiedlichen Blattregionen wurden drei verschiedene Bereiche (Blattbasis, Blattmitte, Blattspitze) der Dattelpalme herangezogen. Die Dattelpalmen wurden unter Standardbedingungen (35° C, 60% Luftfeuchtigkeit, Belichtungsdauer: 16h/8h) im Gewächshaus gehalten. Zusätzlich wurden dabei Proben der jeweiligen Bereiche für 45 Stunden abgedunkelt (künstliches „sink“-Gewebe). Die Proben der „source“-Gewebe wurden nach 10 h Belichtung entnommen. Die Proben der „source“ und „sink“-Gewebe wurden zeitgleich gegen Mittag entnommen.

Im Folgenden wurde die Expression der einzelnen Zuckertransporter der Dattelpalme detailliert in unterschiedlichen Blattbereichen untersucht. Anhand dieser Expressionsanalyse war es möglich, das Expressionsmuster innerhalb eines Blattes sowohl in Licht „source“ als auch in Dunkelheit „sink“ zu betrachten

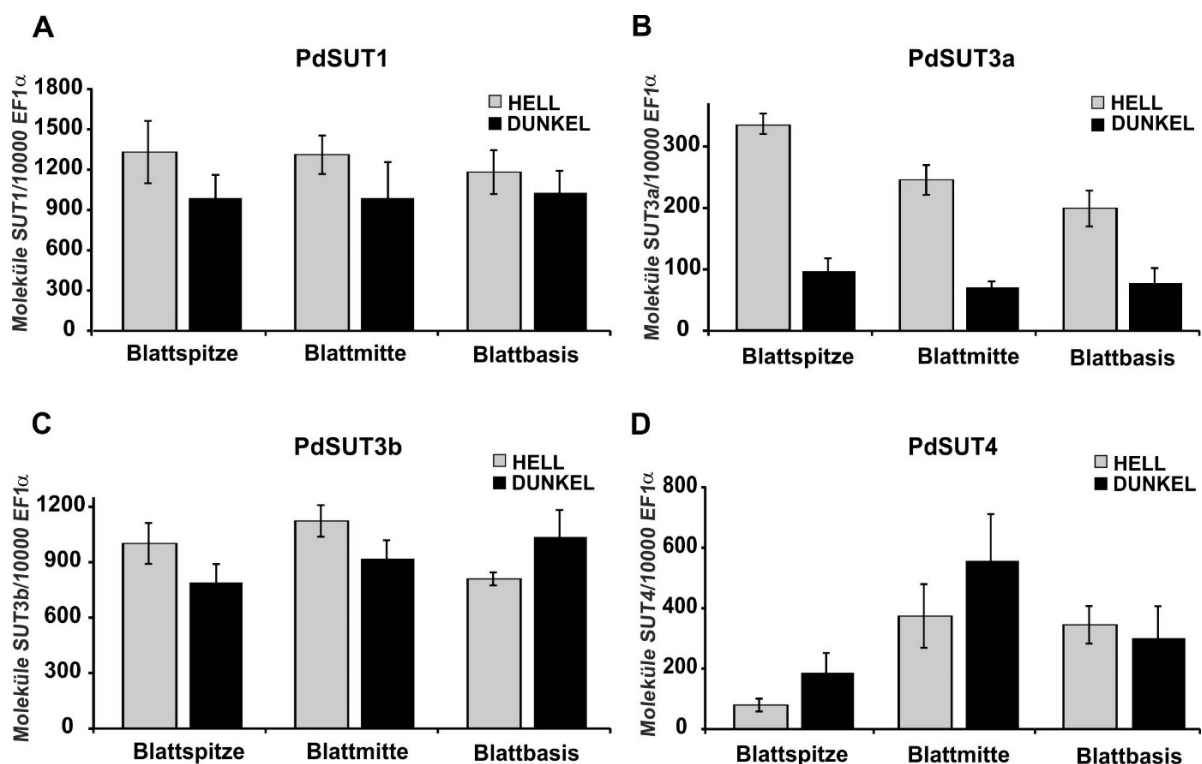


Abbildung 3-4: Expressionsanalysen der PdSUTs von unterschiedlichen Blattbereichen im Licht und in Dunkelheit

Transkriptanalysen von PdSUT1, 3a, 3b und 4 aus der Dattelpalme innerhalb unterschiedlicher Blattbereiche (Blattbasis, Blattmitte, Blattspitze). Die Dattelpalmen wurden unter Standardbedingungen (35° C, 60% Luftfeuchtigkeit, Belichtungsdauer: 16h/8h) im Gewächshaus gehalten. Zusätzlich wurden die zu untersuchenden Blattbereiche parallel für 45 Stunden dunkel gehalten. Angegeben sind dabei jeweils die gemessenen Transkriptmengen, welche auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen *EF1α* normiert worden sind. Die ermittelte Molekülzahl jedes Saccharosetransporters wurde somit pro 10.000 Molekülen *EF1α* angegeben.

Anhand der Transkriptanalyse wird deutlich, dass das Expressionslevel von PdSUT1 in den Blättern deutlich höher ist als bei den anderen Transportern. Zudem konnte durch die Analyse gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied im Expressionslevel zwischen im Licht gehaltenen bzw. in abgedunkelten Blättern besteht. Im Vergleich zu PdSUT1 weist PdSUT3a insgesamt ein deutlich geringeres Expressionslevel in allen getesteten Blattbereichen auf, wobei die ermittelten Transkriptmengen von belichteten Blattabschnitten bei PdSUT3a deutlich höher sind als von abgedunkelten Blattabschnitten. Während im Dunkeln kein Unterschied im Expressionslevel zu verzeichnen ist, sinkt das Expressionslevel im Hellen von der Blattspitze zur Blattbasis, so dass im Licht die höchste Expression in der Blattspitze und die geringste in der Blattbasis zu verzeichnen ist. PdSUT3b weist ein ähnliches Expressionsmuster, mit vergleichbar hohen Transkriptmengen wie PdSUT1 auf. Die untersuchten Blattbereiche exprimieren PdSUT3b ähnlich stark, wobei auch keine „sink“- oder „source“-Abhängigkeit zu verzeichnen war.

Bei PdSUT4 sind auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der Blattbasis und der Blattmitte zu erkennen. Die analysierten Transkriptmengen unterscheiden sich auch nicht zwischen den abgedunkelten und nicht abgedunkelten Bereichen. In der Blattspitze ist das Expressionslevel jedoch insgesamt sowohl bei belichteten als auch abgedunkelten Blättern viel niedriger im Vergleich zur Blattbasis.

3.1.6 Funktionelle Expression von PdSUT1 in *Xenopus* Oozyten

Im Folgenden soll die Funktion der klonierten PdSUTs im heterologischen Expressionssystem der Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) untersucht werden. PdSUT4 zeigt die höchste Homologie zu vakuolenspezifischen Typ-III-Zuckertransportern. Vertreter dieses Typs repräsentieren H⁺-gekoppelte Symporter, welche Saccharose zusammen mit Protonen aus der Vakuole in das Zytoplasma transportieren (Weise et al. 2000; Reinders et al. 2008; Schulz et al. 2011). Bisher konnten vakuoläre Transportproteine nur in seltenen Fällen in der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten exprimiert und funktionell vermessen werden. PdSUT4 stellt hier keine Ausnahme dar: es konnte keine Saccharose-induzierte Stromantwort (Transportaktivität) mittels der TEVC-Technik festgestellt werden. Deshalb konnte keine weitere funktionelle Analyse von PdSUT4 im Rahmen dieser Arbeit erfolgen. Ähnlich verhielt es sich mit PdSUT3a

und PdSUT3b. Diese SUTs werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie dem Typ IIA zugeordnet. Vertreter dieser Gruppe von Saccharosetransportern konnten bisher noch nie in Oozyten exprimiert und hinsichtlich ihrer Funktion elektrophysiologisch charakterisiert werden. Lediglich eine Expression vom *A. thaliana* AtSUC3 in Hefezellen deutete darauf hin, dass Transporter des Typs IIA höchstwahrscheinlich als Saccharosetransporter fungieren (Meyer et al. 2004). Wie erwartet, waren PdSUT3a und PdSUT3b in Oozyten elektrisch nicht aktiv, und da mir das Hefesystem nicht zur Verfügung stand, konnte ich diese Transporter nicht charakterisieren.

PdSUT1 dagegen gehört den monokotspezifischen Typ-IIB-Transportern an und weist, wie bereits oben erwähnt, einen hohen Verwandtschaftsgrad zu dem Zuckertransporter *ZmSUT1* aus Mais auf. *ZmSUT1* wurde als erster SUC-Transporter der C_4 -Pflanzen bereits Ende der 1990er Jahre erfolgreich kloniert und bewiesen, dass dieser pflanzliche Zuckertransporter in den „source“ und „sink“-Gewebe wie in ausgewachsenen Blattspreiten, Blattscheiden und Stängel lokalisiert ist (Aoki et al. 1999). Wie auch andere Vertreter des Typ IIB ist *ZmSUT1* in der Plasmamembran des Phloems lokalisiert, wodurch der Transport von Saccharose in das Phloem gewährleistet wird.

Da der Saccharose/Protonen-Symporter *ZmSUT1* bereits hinreichend elektrophysiologisch charakterisiert worden ist (Carpaneto et al. 2005; Wippel et al. 2010), wurde im Folgenden dieses Transportprotein direkt mit den neu gewonnenen funktionellen Charakteristika von PdSUT1 verglichen bzw. ergänzt. Die im Folgenden angewandte TEVC-Methode ermöglicht es, die Protonenströme, die den Transport von Saccharose begleiten, über der Membran unter kontrollierten Membranspannungsbedingungen zu detektieren, so dass PdSUT1 hinsichtlich seiner Funktion im Detail charakterisiert werden konnte.

Der niederaffine plasmamembranständige SUC/ H^+ -Symporter *ZmSUT1* aus der apoplastisch beladenen Pflanze *Zea mays* ist maßgeblich an der Aufnahme von extrazellulärer Saccharose in das Phloem beteiligt (Aoki et al. 1999; Carpaneto et al. 2005) und zeigt hohe Homologien zu PdSUT1. Deshalb wurde *ZmSUT1* als Referenztransporter für die Analyse von PdSUT1 herangezogen. Der Mais Saccharosetransporter ist aufgrund seiner hohen Saccharose-induzierten Protonenströme von bis zu 4 μA hervorragend für elektrophysiologische Untersuchungen geeignet (Carpaneto et al. 2005; Wippel et al. 2010). Diese hohen Transportströme, die bei *ZmSUT1* erreicht werden können, unterscheidet den Saccharose/Protonen-Symporter von allen anderen bislang bekannten Saccharosetransportern, welche lediglich Protonenströme im nA-Bereich aufweisen (Boorer et al. 1996; Zhou et al. 1997; Chandran, Reinders, and Ward 2003). Diese überaus hohen Transportströme machen *ZmSUT1* zu einem idealen Modelltransporter für elektrophysiologische Charakterisierungen.

Die vergleichenden Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden für beide Transportproteine ZmSUT1 und PdSUT1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten anhand elektrophysiologischer Messungen unter Verwendung der TEVC-Methode mit konstanten Spannungsklemmbedingungen durchgeführt. Dafür wurde die generierte cRNA mit einer Konzentration von je 500 ng/μl in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Nach einer Expressionszeit von 3-4 Tagen wurden die Oozyten für die Messungen mit der TEVC-Methode herangezogen.

Wie bereits oben erwähnt, konnte für ZmSUT1 bereits in vorangegangenen Arbeiten eine Expression in der Membran von *Xenopus laevis* Oozyten mit Saccharose-induzierten Strömen im μA-Bereich gezeigt werden. Für alle elektrophysiologischen Messungen wurde, wenn nicht anders erwähnt, PdSUT1 in den entsprechenden USER-kompatiblen Oozyten-Expressionsvektor kloniert und charakterisiert (Tabelle 2-4). Um die erfolgreiche Expression und damit die Funktionalität des Transportproteins PdSUT1 in der Plasmamembran der Oozyten zu untersuchen, wurden Messungen mit konstanter Haltespannung von -20 mV durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden mit Wasser injizierte Oozyten unter denselben Bedingungen vermessen (Abbildung 3-5). Bei der elektrophysiologischen Untersuchung von PdSUT1 in *Xenopus* Oozyten konnten bei einer angelegten Haltespannung von -20 mV und in Abwesenheit von SUC keine makroskopischen Ströme detektiert werden. Das Perfusionssystem wurde schließlich von SUC-freier (0 mM SUC) zu SUC-haltiger Lösung (100 mM SUC) umgeschaltet, was ein Einströmen von SUC im Symport mit Protonen (Kationeneinstrom) in die Oozyten und damit eine negative Stromantwort von -2.3 μA zur Folge hatte. Der erneute Wechsel zu SUC-freier Lösung bewirkte ein erneutes Verstummen der Stromantwort.

Für die Expressionsanalyse von PdSUT1 mit der Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen wurde die kodierende Sequenz des Transporters mit der kodierenden Sequenz des Fluoreszenzproteins YFP fusioniert.

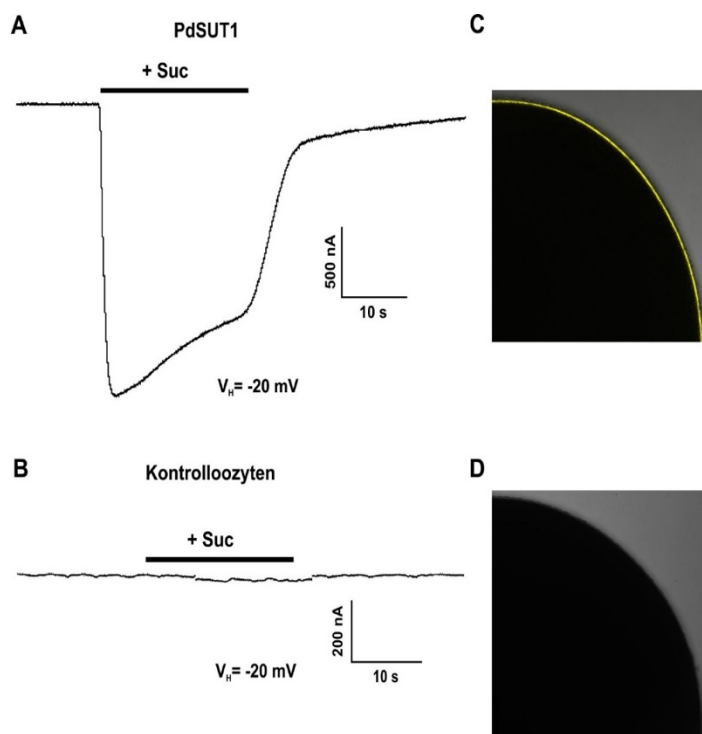


Abbildung 3-5: Transporter-vermittelnde Ströme von PdSUT1 nach Saccharozugabe

Stromantwort von repräsentativen Zellen bei einer Haltespannung (V_H) von -20 mV und einem Lösungswechsel von 0 mM SUC zu 100 mM SUC.

(A) SUC-induzierte Stromantwort von PdSUT1 bei einem pH-Wert von 5.6. (B) Bei den mit Wasser injizierten Kontroll-Oozyten konnten, unter denselben Bedingungen, keine makroskopischen Ströme detektiert werden. (C) Das Fluoreszenzbild von PdSUT1 zeigt die hohe Expression des Transporters im Vergleich zu der Wasserkontrolle (D).

Die ermittelten negativen SUC-induzierten Gleichgewichts-Transportströme (I_{ss}) von PdSUT1 als Antwort auf die Zugabe von 100 mM Saccharose waren das Resultat einer funktionellen Expression in der Oozytenmembran, was anhand der deutlichen YFP-Fluoreszenz in der Peripherie von *Xenopus* Oozyten zusätzlich bestätigt wird (vgl. Abbildung 3-5 A und C). Zudem konnten bei der Messung der Negativkontrolle keine makroskopischen Ströme nach Zugabe von SUC vermittelt werden. Die Fluoreszenzaufnahme führte zu keiner detektierbaren Fluoreszenz an der Oozyten-Peripherie, so dass eine Autofluoreszenz der gemessenen Kontrolloozyten ausgeschlossen werden kann (vgl. Abbildung 3-5 B und D).

Somit konnte gezeigt werden, dass neben ZmSUT1 auch PdSUT1 eine Expression in der Membran von *Xenopus laevis* Oozyten mit Saccharose-induzierten Protonenströmen im μ A-Bereich aufweist.

Carpaneto et al. konnte bereits 2005 anhand biophysikalischer Techniken zeigen, dass ZmSUT1 in einem breiten Spannungsbereich aktiv ist und die Transportströme mit hyperpolarisierender Spannung stetig zunehmen. Um genaue Kenntnisse über die spannungsabhängige Aktivität von PdSUT1 zu erhalten, wurden Messungen mit Standard-Einfachspannungspulsprotokollen (IV's; vgl. 2.6.5) durchgeführt, welche die Saccharose-induzierten Transportströme in 10 mV Schritten in dem Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV erfassen. Die Einzelspannungspulsprotokolle wurden dazu in An- und Abwesenheit von 5 mM Saccharose pH 4.0 aufgezeichnet. Aus den erhaltenden Gleichgewichtsströmen wurden die Differenzströme als Differenz der Ströme in An- bzw. Abwesenheit von Saccharose

berechnet, um die reinen Saccharose-induzierten Ströme zu erhalten. Somit wurden eventuell auftretende Leckströme, die z.B. durch das Anstechen der Oozyte verursacht werden können, ausgeschlossen.

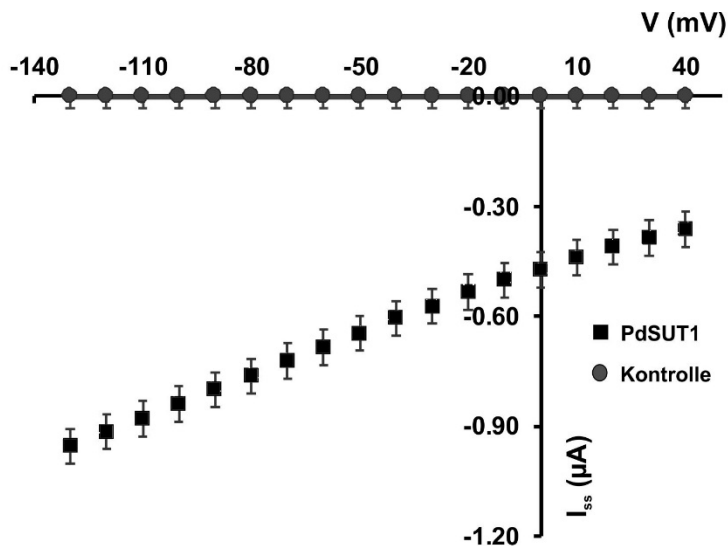


Abbildung 3-6: Stromantwort von PdSUT1-exprimierenden Oozyten als Antwort auf Einzelspannungspulse bei pH 4.0

Strom-Spannungskurve der Differenzströme (I_{ss}) von PdSUT1 und uninjizierten Kontrollloozyten bei einer externen SUC-Konzentration von 5 mM im Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV. Die Saccharose-induzierten Ströme von PdSUT1 (schwarzes Viereck) nahmen mit hyperpolarisierter Membranspannung zu. Die Kontrollloozyten (graue Kreise) zeigten keine Saccharose-abhängigen Stromantworten ($n=5, \pm SD$).

Wie auch im Falle von *ZmSUT1*, resultierte das Auftragen der Differenzströme von PdSUT1 gegen die angelegte Spannung ebenfalls in einer linearen Strom-Spannungskennlinie. Die Differenzströme des Transportproteins PdSUT1 nahmen mit hyperpolarisierter Membranspannung zu (vgl. Abbildung 3-6). Wie erwartet konnten bei den Messungen mit uninjizierten Oozyten (Negativkontrollen) keine SUC-induzierten Ströme detektiert werden.

3.1.7 Ermittlung der Substratabhängigkeit von PdSUT1

In der Plasmamembran des SE/CC-Komplexes sind verschiedene Saccharose-, Peptid-, Polyol- und Aminosäuretransporter lokalisiert, welche unter Verwendung der protonenmotorischen Kraft in der Lage sind, ihr entsprechendes Substrat im Symport mit Protonen in den SE/CC-Komplex zu transportieren (Li and Bush 1990; Boorer, Loo, and Wright 1994; Jamai, Chollet, and Delrot 1994; Frommer et al. 1995; Rentsch et al. 1995; Chen and Bush 1997; Carpaneto et al. 2005; Sauer 2007). Carpaneto konnte bereits im Jahre 2005 zeigen, dass *ZmSUT1* zu den schwach affinen Saccharose-Transportern gehört, da sich der K_m -Wert bei einem pH-Wert von 5.6 und einem Membranpotenzial von -130 mV bei etwa 2 mM befindet. Sowohl die kinetischen Parameter für Saccharose sowie für Protonen weisen dabei eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit auf, denn je negativer die Membranspannung ist, desto höher ist die Affinität (Carpaneto et al. 2005).

Inwiefern die Aktivität des Transporters PdSUT1 von der SUC-Konzentration als treibende Kraft bestimmt wird, wurde über die Höhe der Saccharose-induzierten Transportströme (I_{ss}) in Anwesenheit unterschiedlicher SUC-Konzentrationen bei pH 4 ermittelt. Zwischen jeder Applikation von Saccharose wurde in Saccharose-freiem Medium gemessen, um die Differenz der Ströme in An- und Abwesenheit von Saccharose für die jeweilige Konzentration bilden zu können. Die Messung wurde mit aufsteigender Saccharosekonzentration durchgeführt, welche von 0 mM Saccharose bis 30 mM Saccharose reichte. Durch Variation der Substratkonzentration bei den Messungen konnten die Affinitäten des jeweiligen Transporters zum Substrat (Saccharose) über Ermittlung des K_m -Wertes bestimmt werden.

Zur Ableitung von PdSUT1 vermittelnden Stromantworten bei definierter Membranspannung wurden unter variierenden SUC-Konzentrationen Messungen mit Standard-Einfachspannungspulsprotokollen (IV's; vgl. 2.6.5) durchgeführt (Abbildung 3-7 A). Zur Ermittlung der K_m -Werte von PdSUT1 wurden die Saccharose-induzierten Ströme bei einer gegebenen Spannung (-30, -100 und -130 mV) gegen die Saccharosekonzentration aufgetragen und mit der Michaelis-Menten-Gleichung (vgl. Kapitel 2.7.1) beschrieben. Die Michaeliskonstante (K_m) gibt die Substrat-Konzentration an, bei welcher die halbmaximale Aktivität des Enzyms bzw. Transportproteins erreicht ist. Der K_m -Wert gilt dabei als Maß für die Affinität eines Proteins gegenüber seinem Substrat (Abbildung 3-7 B).

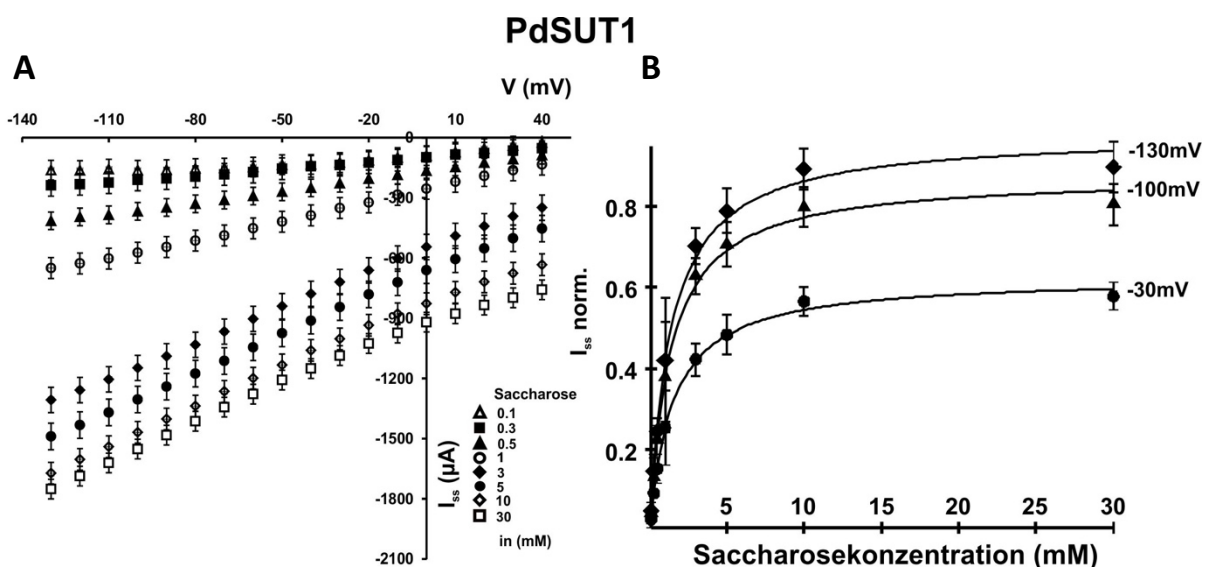


Abbildung 3-7: Bestimmung der Saccharose-abhängigen Transportströme sowie des K_m -Wertes von PdSUT1 und pH 4.0

(A) Strom-Spannungskurve der Differenzströme (I_{ss}) von PdSUT1 in Anwesenheit verschiedener SUC-Konzentrationen im Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV. (B) Mittelwerte der Saccharose-induzierten Stromantworten von PdSUT1 bei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen. Die tatsächlich Saccharose-induzierten Ströme der unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen wurden dazu auf die Membranspannung von -130 mV (I_{max} bei 30 mM SUC) normiert und bei den Membranspannungen -30, -100, und -130 mV gegen die Saccharosekonzentration aufgetragen. Die

verwendeten Saccharosekonzentrationen waren: 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 10, 30 mM Saccharose bei einem pH-Wert von 4.0. (n=8, \pm SD).

Die detektierten Transportströme von PdSUT1 bei Zugabe von unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen resultierten in einer nahezu linearen Strom-Spannungskurve, die mit steigender hyperpolarisierter Membranspannung erhöht werden konnte (Abbildung 3-7 A). Die höchsten Transporter-vermittelten Stromantworten wurden folglich bei einer Membranspannung von -130 mV in Anwesenheit von 30 mM Saccharose detektiert.

Mit steigender Konzentration stiegen die SUC-induzierten Gleichgewichtsströme des Transportproteins an, um zwischen 10 mM und 30 mM Saccharose in Sättigung zu kommen. Der in der Abbildung 3-7 B dargestellte Kurvenverlauf von PdSUT1 weist auf eine Sättigungskinetik hin und konnte mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Aus dem Fit mit der Michaelis-Menten-Gleichung konnten folgende K_m -Werte für PdSUT1 ermittelt werden:

Bei einer Membranspannung von -30 mV lag der K_m -Wert von PdSUT1 bei 1,49 mM. Der K_m -Wert bei einer Membranspannung von -100 mV lag bei 1,33 mM und bei einer Membranspannung von -130 mV bei 1,39 mM (vgl. Abbildung 3-7 B). Wie bereits von Carpaneto et al. 2005 gezeigt wurde, nahm die Affinität des Transporters ZmSUT1 zu Saccharose mit der Hyperpolarisation der Membran geringfügig zu (Carpaneto et al. 2005). Im Vergleich dazu, blieb die Affinität von PdSUT1 zu seinem Substrat bei den getesteten Membranspannungen jedoch fast gleich (vgl. Abbildung 3-7 B).

Die halbmaximale Transportaktivität von PdSUT1 lag im millimolaren Konzentrationsbereich, was PdSUT1 ebenfalls als einen niederaffinen Saccharosetransporter klassifiziert.

3.1.8 Der Einfluss von Protonen auf die Transporteigenschaften von PdSUT1

Die Akkumulation von Saccharose wird durch die Membranspannung und dem Protonengradienten energetisiert, was auf eine enge Kopplung des Protonen- und Zuckertransports schließen lässt. Der Protonengradient, der in Pflanzen von H^+ -ATPasen über der Plasmamembran aufgebaut wird, stellt eine wesentlich treibende Kraft des Transportprozesses dar. Für ZmSUT1 wurde ein Transport von Saccharose im Symport mit Protonen belegt, welcher im stöchiometrischen Verhältnis von 1 Proton zu 1 Saccharosemolekül transportiert. Mit steigender extrazellulärer H^+ -Konzentration sind bei SUC/ H^+ -Symportern aufgrund einer Erhöhung der Triebkraft für den SUC/ H^+ -Transport in die Oozyte auch höhere Einwärtsströme zu erwarten. Dies konnte 2005 im Falle unseres Modelltransporters ZmSUT1 in einem Bereich zwischen pH 4,5 und pH 6,5 bereits bestätigt werden (Carpaneto et al. 2005).

Um nun im Folgenden den Einfluss von Protonen auf die Transporteigenschaften von PdSUT1 zu klären, wurde die pH-Abhängigkeit unter Spannungskontrolle im heterologen Expressionssystem der Oozyten überprüft. Dabei wurde die Transportaktivität nach SUC-Zugabe bei verschiedenen extrazellulären H^+ -Konzentrationen bestimmt.

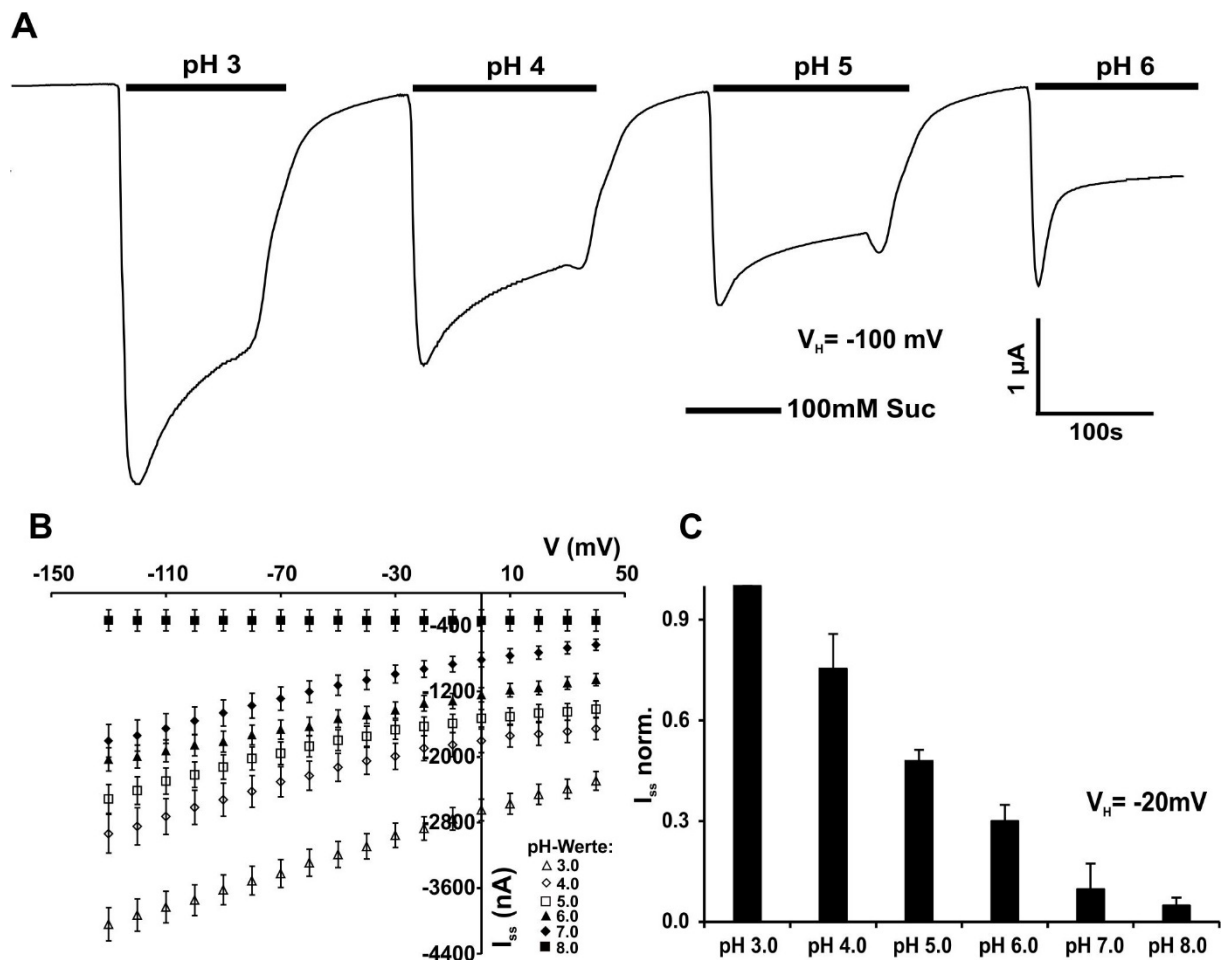


Abbildung 3-8: Gleichgewichtsströme von PdSUT1 bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen

(A) Repräsentative Stromantwort bei einer Haltespannung von -100 mV auf die Zugabe sättigender SUC-Konzentration (100 mM SUC) bei den pH-Werten 3, 4, 5 und 6. (B) Stromspannungskennlinie der Differenzströme (I_{ss}) in Anwesenheit unterschiedlicher Protonenkonzentrationen (pH 3-8) sowie sättigender SUC-Konzentration (100 mM) im Spannungsbereich zwischen $+40$ und -130 mV. Die Saccharose-induzierten Ströme von PdSUT1 nahmen mit hyperpolarisierter Membranspannung und aufsteigender H^+ -Konzentration zu. (C) Dargestellt sind die aus Fig.3.9 B ermittelten normierten Differenzströme bei den pH-Werten 3-8 und einer Haltespannung von -20 mV. Die Ströme von PdSUT1 wurden auf den Wert von 100 mM SUC bei pH 3 normalisiert ($n=6$, \pm SD).

In Abbildung 3-8 A sind die Originalströme bei einer Haltespannung von -100 mV und sättigenden SUC-Konzentrationen (100 mM) sowie pH-Werten im Bereich zwischen 3 und 6 von PdSUT1-exprimierenden Oozyten dargestellt. In Anwesenheit von 100 mM Saccharose konnten bei pH 3 die höchsten Transportströme detektiert werden. Eine Abnahme der H^+ -Konzentration in dem Perfusionssystem führte gleichzeitig auch zu einer Abnahme der

Gleichgewichtsströme (I_{ss}). Die Transportaktivität von PdSUT1 war bei pH 4 um 33 % vermindert im Vergleich zu der Stromantwort bei pH 3. Bei einer weiteren Verringerung der Protonenkonzentration im externen Medium, von pH 3 auf pH 6, war ein deutlicher Verlust der Transportaktivität um 44 % zu verzeichnen (Abbildung 3-8).

In der Abbildung 3-8 B wurde der physiologische Bereich der pH-Werte (pH 3-8) mit Einzelspannungspuls-Messungen untersucht, um die Aktivität des Transporters über einen definierten Spannungsbereich ermitteln zu können. Die daraus resultierenden Differenzströme wurden gegen die Spannung aufgetragen und sind in Strom-Spannungskennlinien dargestellt (Abbildung 3-8 B). Die aus Abbildung 3-8 B ermittelten Differenzströme wurden zusätzlich normiert und als Balkendiagramm bei den untersuchten pH-Werten 3-8 bei einer Haltespannung von -20 mV dargestellt (Abbildung 3-8 C).

Wie bereits in Abbildung 3-8 A gezeigt werden konnte, führte eine Zunahme der H^+ -Konzentration bei allen getesteten Spannungen zu höheren Transportströmen. Die höchsten Ströme wurden bei pH 3 detektiert. Bei einem leicht basischen pH-Wert von 8 konnten immer noch geringe SUC-induzierte Protonenströme vermittelt werden. Um den Einfluss von Protonen auf die Transportaktivität nun im direkten Vergleich zu unserem Modelltransporter ZmSUT1 treffen zu können, wurden die oben genannten Messungen zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit auch für ZmSUT1 durchgeführt. In der folgenden Abbildung 3-9 sind dazu die normierten Differenzströme von ZmSUT1 bei den untersuchten pH-Werten 3-8 bei einer Haltespannung von -20 mV dargestellt.

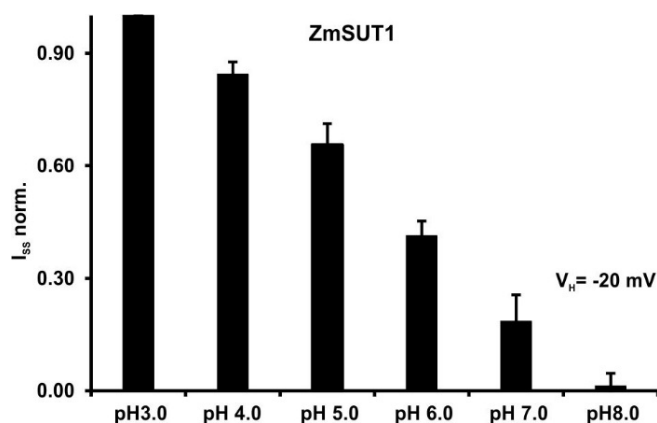


Abbildung 3-9: Ermittlung der Transportaktivität von ZmSUT1 bei unterschiedlichen pH-Werten

Dargestellt sind die normierten Differenzströme Transporter-vermittelter I_{ss} bei sättigender SUC-Konzentration (100 mM) bei den pH-Werten 3-8 und einer Haltespannung von -20 mV. Die Ströme von ZmSUT1 wurden auf den Wert von 100 mM SUC bei pH 3 normalisiert ($n=6$, \pm SD).

Die ermittelten Differenzströme von ZmSUT1 wurden, wie bei PdSUT1, auf den Wert von 100 mM SUC bei pH 3 normalisiert.

Wie bereits für PdSUT1 in Abbildung 3-8 C gezeigt werden konnte, führte auch bei ZmSUT1 eine Zunahme der extrazellulären H^+ -Konzentration zu höheren Transportströmen. ZmSUT1 zeigte über den gesamten getesteten Spannungsbereich (Daten nicht gezeigt) einen linearen Kurvenverlauf, wobei die Transportströme mit hyperpolarisierenden Spannungen bei allen

getesteten H^+ -Konzentrationen nahezu gleich waren. Die Stromamplituden von ZmSUT1 bei den unterschiedlichen pH-Werten lagen auf ähnlichem Niveau wie die von PdSUT1 generierten Transportströme. Die höchsten Ströme wurden somit bei pH 3 detektiert. Jedoch konnte, im Vergleich zu PdSUT1, bei ZmSUT1 und leicht basischer extrazelluläre Protonenkonzentration (pH 8) nahezu keine Transportaktivität mehr detektiert werden (Abbildung 3-9). Somit konnte für beide Transportproteine eine starke pH-Abhängigkeit des SUC-Transports gezeigt werden, wobei die Transportaktivität von beiden Proteinen über einen breiten pH-Bereich verfügt.

Diese Transporteigenschaften von PdSUT1 zeigen, dass der PdSUT1 vermittelnde SUC-Transport durch die protonenmotorische Kraft energetisiert wird, da ein einwärtsgerichteter Protonengradient sowie negative Membranpotenziale den Transport von Saccharose begünstigen (Abbildung 3-8).

3.1.9 Die Substratspezifität von PdSUT1

Im Vergleich zu Saccharosetransporter des Typs I, die über eine relativ breite Substratspezifität verfügen, sind Typ-II-Transporter, zu denen auch ZmSUT1 und PdSUT1 gehören, selektiv für Saccharose und transportieren zusätzlich nur Maltose, Salicin und synthetische α -Phenylglykoside (Reinders, Sivitz, and Ward 2012). Um nun im Folgenden die Substratspezifität des Typs II SUTs PdSUT1 zu analysieren, wurde cRNA von PdSUT1 in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert und nach 4-5 Tagen Expression die Zucker-induzierten Ströme mittels TEVC-Technik aufgezeichnet. Die Messungen zur Ermittlung der Substratspezifität wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Standard-Einfachspannungspulsprotokollen (IVs; vgl. Kapitel 2.6.5) erworben und mit bereits ermittelten Permeabilitätsdaten von ZmSUT1, die von Dr. Carmen Derrer stammen (Daten nicht gezeigt; (Derrer et al. 2013)), verglichen (Abbildung 3-10).

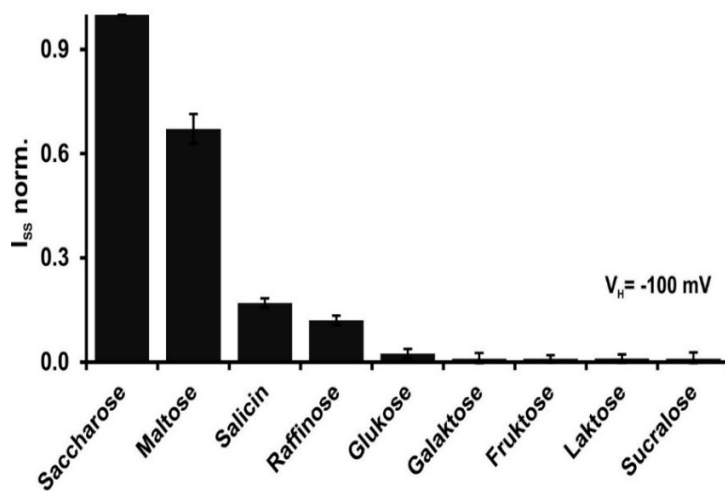


Abbildung 3-10: Substratspezifität von PdSUT1.

Die normierten Gleichgewichtsströme (I_{ss} norm.) von PdSUT1 exprimierender Oozyten wurden bei einer Haltespannung (V_H) von -100 mV in Anwesenheit unterschiedlicher Zucker (je 100 mM) und einem pH-Wert von 5.6 dargestellt. Die Gleichgewichtsströme wurden dazu auf die Stromantworten in Anwesenheit von 100 mM Saccharose bei -100 mV normiert ($n=7$; \pm SD).

In Abbildung 3-10 ist die Substratspezifität von PdSUT1 in Anwesenheit unterschiedlicher Testzucker (je 100 mM) bei einer Membranspannung von -100 mV und einem pH-Wert von 5.6 dargestellt. Bei den untersuchten Testzuckern handelt es sich im Einzelnen um natürliche Monosaccharide wie Glukose, Fruktose und Galaktose, um Disaccharide wie Saccharose, Maltose und Laktose, um Trisaccharide wie Raffinose und Salicin sowie um den synthetischen Zucker Sucralose (Trichlorgalactosaccharose).

Zur Ermittlung der reinen Substrat-induzierten Gleichgewichtsströme wurden die gemessenen Ströme in Abwesenheit des jeweiligen Substrats von den Strömen in Abwesenheit von Zucker subtrahiert. Diese erhaltenen Differenzströme wurden im Anschluss auf die Ströme in Anwesenheit von 100 mM Saccharose bei einer Haltespannung von -100 mV normiert.

Durch Betrachtung der Substrat-induzierten Gleichgewichtsströme wird deutlich, dass für PdSUT1 der bevorzugte Transportzucker, und somit auch das primäre Substrat, das Disaccharid Saccharose darstellt, gefolgt von dem Disaccharid Maltose. PdSUT1 ist aber auch in der Lage Trisaccharide wie Salicin und Raffinose zu transportieren. Im Gegensatz dazu stellen die getesteten Monosaccharide Glukose, Fruktose und Galaktose keine geeigneten Substrate dar, da bei diesen Testzuckern keine nennenswerten Substrat-induzierten Gleichgewichtsströme vernommen werden konnten. Auch der künstliche Süßstoff Sucralose sowie das Disaccharid Laktose dienen PdSUT1 nicht als Substrat und konnten keine Protonenströme induzieren (Abbildung 3-10).

Vergleicht man nun die ermittelten Permeabilitätsdaten von PdSUT1 mit denen von ZmSUT1 (Derrer et al. 2013), wird deutlich, dass beide Transportproteine über eine nahezu identische Substratspezifität verfügen, mit der Ausnahme, dass ZmSUT1, im Vergleich zu PdSUT1, nicht in der Lage ist, das Trisaccharid Raffinose zu transportieren.

Da PdSUT1 über ein sehr ähnliches Substratspektrum wie ZmSUT1 verfügt, repräsentiert PdSUT1 ebenfalls einen typischen Vertreter der monokotyledonen Typ-II-Saccharosetransporter (Reinders, Sivitz, and Ward 2012).

3.1.10 Der Einfluss von Sucralose (Srl) auf die Transportaktivität von PdSUT1

Für eine detaillierte Analyse von Transportmechanismen werden häufig spezielle Inhibitoren eingesetzt. Im Vergleich zu Typ I SUTs transportieren Typ-II-Saccharosetransporter sehr selektiv und sind, im Vergleich zu Typ I SUTs, auch nicht in der Lage Sucralose zu permeieren. (Reinders, Sivitz, and Ward 2012). Es ist bereits gelungen, den Einfluss von Sucralose auf den Saccharosetransport von Typ II SUTs aufzuklären, indem gezeigt werden konnte, dass Sucralose sowohl für ShSUT1 (*Saccharum officinarum*) als auch für ZmSUT1 (*Zea mays*) als kompetitiver Inhibitor des Saccharosetransports fungiert (Reinders et al. 2006; Derrer et al. 2013).

Bei Sucralose ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$, 1,6-Dichloro-1,6-Dideoxy- β -D-Fruktofuranosyl-4-Chloro-4-Deoxy- α -D-Galaktopyranosid) handelt es sich um einen künstlichen Süßstoff (E 955), welcher mittels Chlorierung von Saccharose industriell hergestellt wird.

Wie bereits in Abbildung 3-10 deutlich wird, stellt Sucralose bei hohen Konzentrationen (100 mM) sowie einem pH von 5.6 kein geeignetes Substrat für PdSUT1 dar. Im Folgenden soll nun geprüft werden, ob die Applikation von Sucralose (100 mM) bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 4, 5 und 6) und verschiedenen Spannungen (+40 mV bis -130 mV) ebenfalls eine Einschränkung auf die Transportaktivität von PdSUT1 aufweist.

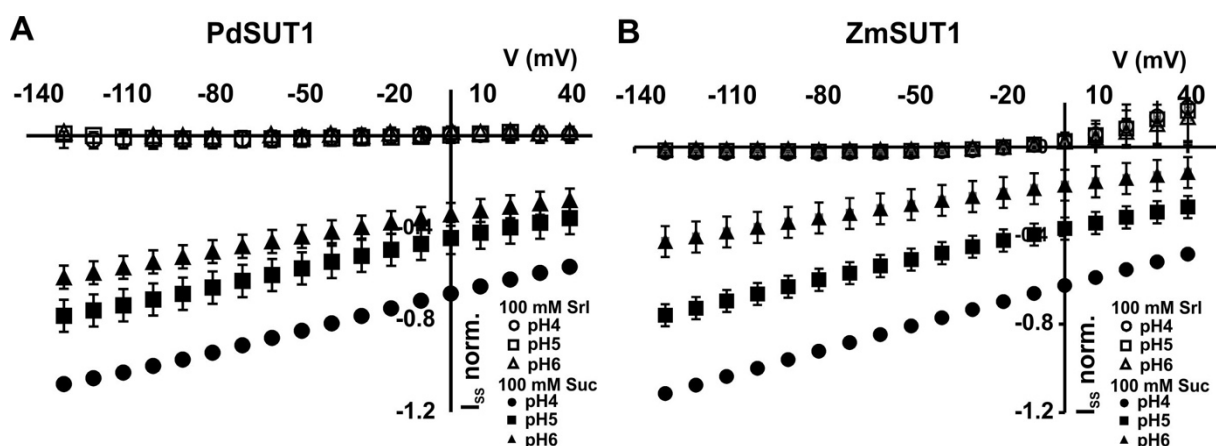


Abbildung 3-11: Sucralose stellt, unabhängig vom ext. pH-Wert, kein geeignetes Substrat für PdSUT1 und ZmSUT1 dar.

Gleichgewichtsströme von PdSUT1- bzw. ZmSUT1-exprimierender Oozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Protonenkonzentrationen (pH 4-6) sowie sättigender SUC- bzw. Srl-Konzentration (100 mM) im Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV. Die I_{ss} wurden auf die Ströme in

Anwesenheit von 100 mM Saccharose bei einem Membranpotenzial von -100 mV und einem pH-Wert von 4 normiert und gegen die Spannung aufgetragen (n=5; \pm SD).

Anhand der Stromspannungskennlinie in Abbildung 3-11 wird deutlich, dass, in Anwesenheit von 100 mM Sucralose bei keinem getesteten pH-Wert (pH 4, 5 und 6) makroskopische Protonenströme von PdSUT1-exprimierenden Oozyten hervorgerufen wurden. Im Vergleich dazu stiegen die Saccharose-induzierten Ströme mit steigender Protonenkonzentration und Hyperpolarisierung des Membranpotenzials an (Abbildung 3-11).

Hohe Konzentrationen des künstlich hergestellten Süßstoffs Srl inhibieren somit die Saccharose-induzierte Stromantwort von PdSUT1 unabhängig von der externen Protonenkonzentration. Wie bereits erwähnt, konnte für das Transportprotein ZmSUT1 aus *Zea mays* gezeigt werden, dass Sucralose einen inhibierenden Effekt auf den Saccharosetransport hervorruft (Reinders et al. 2006; Derrer et al. 2013). Bei der vergleichenden elektrophysiologischen Untersuchung von ZmSUT1 wird deutlich, dass, wie bereits von Derrer et al. gezeigt werden konnte, Sucralose kein geeignetes Substrat für den Saccharosetransporter aus Mais darstellt, da in Anwesenheit von Sucralose bei allen getesteten pH-Werten keine makroskopischen Protonenströme bei ZmSUT1-exprimierender Oozyten vernommen werden konnten (Abbildung 3-11).

Da für PdSUT1 gezeigt werden konnte, dass bei gleichzeitiger Zugabe von Saccharose und Sucralose gleicher Konzentrationen die Transporter-vermittelnde Stromantwort unterbunden wird, soll nun im Folgenden geklärt werden, ob Sucralose in der Lage ist, Saccharose-induzierte Protonenströme zu inhibieren.

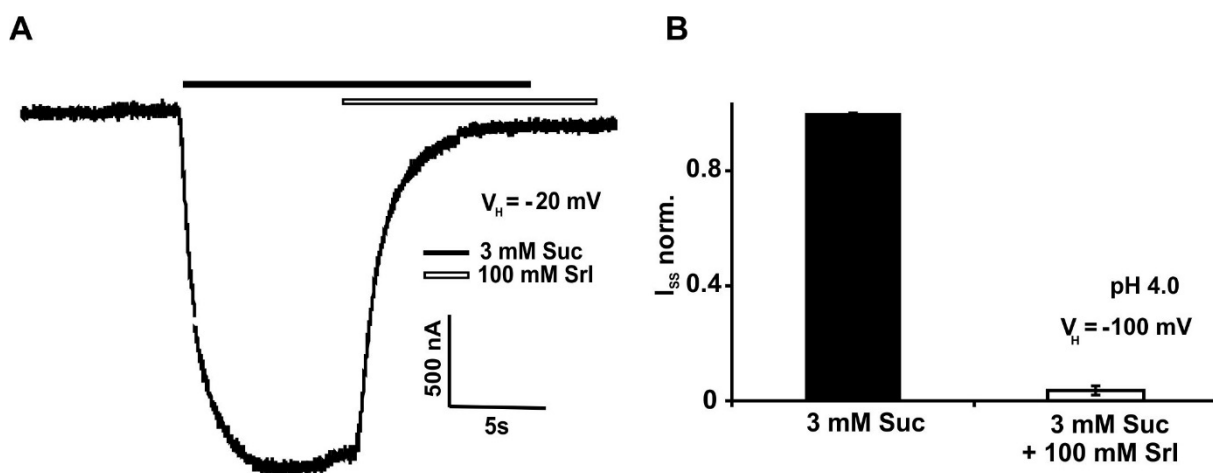


Abbildung 3-12: Sucralose inhibiert die Saccharose-induzierten Protonenströme von PdSUT1.

(A) Stromantwort einer repräsentativen Zelle bei einer Haltespannung von -20 mV und einem pH-Wert von 4. (B) Die dargestellten I_{ss} wurden auf die Stromantworten bei Zugabe von 3 mM SUC pH 4 und einer Haltespannung von -100 mV normiert. Die Saccharose-induzierten Ströme wurden durch die zusätzliche Applikation von 100 mM Sucralose inhibiert (n=5; \pm SD).

Die Originalströme einer repräsentativen PdSUT1-exprimierten Oozyte zeigen deutlich, dass die Zugabe von 3 mM SUC pH 4 bei einem Haltepotenzial von -20 mV einen Protoneneinstrom in die Oozyte hervorruft. Durch die zusätzliche Zugabe von 100 mM Sucralose wurden diese Saccharose-induzierten Protonenströme vollständig unterdrückt (Abbildung 3-12 A). Anhand von weiteren statistischen Analysen bei einer Membranspannung von -100 mV konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von 100 mM Sucralose bei pH 4 ausreicht, um eine bereits bestehende Saccharose-induzierte Stromantwort vollständig zu inhibieren (Abbildung 3-12 B).

Diese inhibitorische Wirkung des künstlichen Süßstoffs soll nun durch Zugabe unterschiedlicher Sucralosekonzentrationen in Anwesenheit einer konstanten Saccharosekonzentration genauer analysiert werden. Dafür wurden Gleichgewichtsströme mithilfe von Einzelspannungspuls-Messungen in Anwesenheit unterschiedlicher Sucralosekonzentrationen bei konstant gehaltener SUC-Konzentration von 3 mM und einem pH-Wert von 4 gemessen (Abbildung 3-13 A). Um die prozentuale Inhibierung der Transportströme von PdSUT1 durch Sucralose zu ermitteln, wurden die I_{ss} der einzelnen Zellen auf die jeweils über eine Michaelis-Menten-Gleichung berechnete maximale Inhibierung (100 %) bei einem Haltepotenzial von -100 mV normiert (Abbildung 3-13 B).

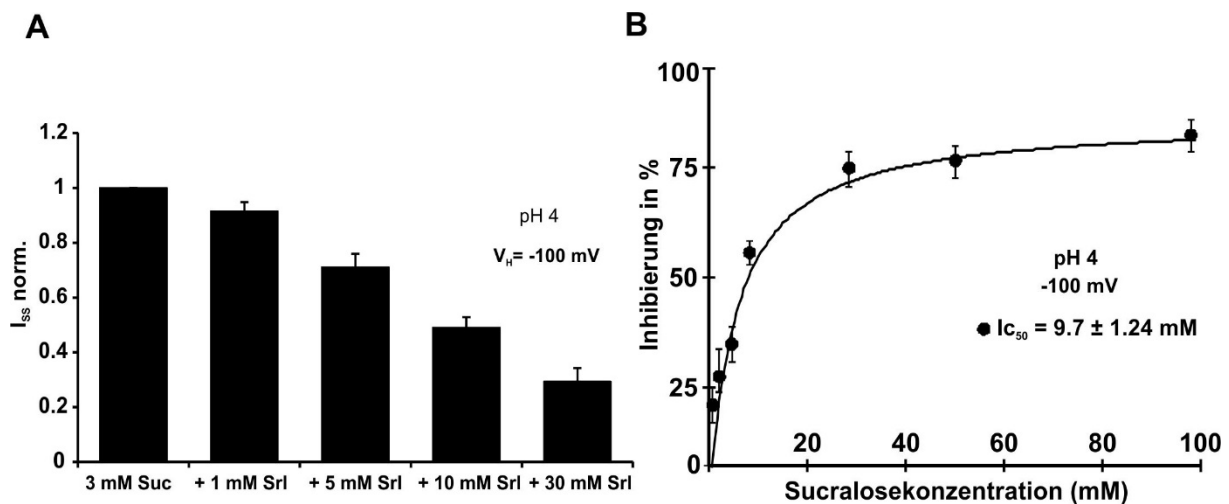


Abbildung 3-13: Konzentrationsabhängige Inhibierung der Saccharose-induzierten Ströme von PdSUT1 durch Sucralose.

(A) Die I_{ss} wurden auf die Stromantworten in Anwesenheit von 3mM SUC bei -100 mV normiert. (B) Die Inhibierung (in %) der Saccharose-induzierten Ströme wurden gegen die Sucralose-Konzentration bei einem Membranpotenzial von -100 mV und einem pH-Wert von 4.0 aufgetragen. Die konstant gehaltene Saccharosekonzentration betrug 3 mM im externen Medium. Die sich daraus ergebende Kinetik konnte mithilfe der Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden. Die Gleichgewichtsströme der einzelnen Zellen wurden auf die jeweils mit einer Michaelis-Menten-Gleichung berechnete, maximale Inhibierung (= 100% Inhibierung) bei einer Haltespannung von -100 mV normiert (n=5; \pm SD).

Anhand der normierten Gleichgewichtsströme in Abbildung 3-13 A wird deutlich, dass in konstanter Anwesenheit von 3 mM Saccharose die Saccharose-induzierten Ströme mit zunehmender Sucralosekonzentration immer stärker reprimiert werden. Die höchsten Transportströme konnten demnach in Abwesenheit des zusätzlich applizierten Substrats Sucralose detektiert werden. Sobald jedoch Sucralose in die SUC-Perfusionslösung addiert wird, nehmen die SUC-induzierten Ströme mit Erhöhung der Konzentration von Sucralose zu. Die geringsten Transportströme von PdSUT1 wurden somit bei der Zugabe von 3 mM SUC + 30 mM Srl (Sucralose) detektiert (Abbildung 3-13 A).

Bei Betrachtung der prozentualen Inhibierung der Gleichgewichtsströme von PdSUT1 als Funktion der Sucralosekonzentration weist der Verlauf auf eine Sättigungskurve hin (Abbildung 3-13 B) und ermöglicht somit eine Beschreibung anhand der Michaelis-Menten-Gleichung. Bei einer Haltespannung von -100 mV und einem pH-Wert von 4 konnte in Anwesenheit von 3 mM Saccharose eine halbmaximale Hemmung (IC_{50} -Wert) von 9.7 mM Sucralose berechnet werden. Das bedeutet folglich, dass in Anwesenheit von 3 mM Saccharose eine 3-fach höhere Konzentration an Sucralose im externen Medium nötig ist, um eine halbmaximale Inhibition von makroskopischen Protonenströmen PdSUT1-exprimierender Oozyten erreichen zu können.

Um nun aufklären zu können, ob es sich bei dieser Inhibierung durch Sucralose um eine kompetitive oder allosterische Hemmung handelt, wurden PdSUT1-vermittelte Transportströme bei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen zwischen 1 und 50 mM in Ab- und Anwesenheit von 10 mM Sucralose bei pH 4 aufgezeichnet. Die erhaltenen Gleichgewichtsströme wurden als Funktion der Saccharosekonzentration dargestellt. Die daraus resultierenden Sättigungskurven konnten anschließend mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben und die K_m -Werte in An- und Abwesenheit von 10 mM Sucralose bei einer Spannung von -100 mV bestimmt werden (Abbildung 3-14).

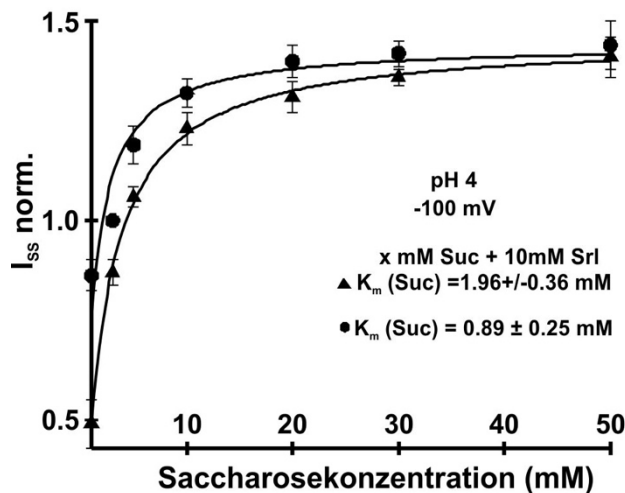


Abbildung 3-14: Kompetitive Inhibition der SUC-induzierten Ströme von PdSUT1 durch Sucralose

Die ermittelten Gleichgewichtsströme in Anwesenheit von 10 mM Sucralose (dargestellt als Dreieck) bzw. in Abwesenheit von Sucralose (dargestellt als Kreis) wurden gegen die extrazelluläre Saccharosekonzentration bei einem Membranpotenzial von -100 mV und einem pH-Wert von 4 aufgetragen. Die I_{ss} wurden auf die Ströme bei -100 mV in Anwesenheit von 3 mM Saccharose in Abwesenheit von Sucralose normiert und mithilfe der Michaelis-Menten-Funktion gefittet ($n=6$, \pm SD).

Aus dem Fit mit der Michaelis-Menten-Gleichung konnten folgende K_m -Werte für PdSUT1 ermittelt werden: In Abwesenheit von Sucralose konnte bei pH 4 und einer Membranspannung von -100 mV ein K_m -Wert für Saccharose von 0.89 mM ermittelt werden. Sobald jedoch der K_m -Wert in Anwesenheit von 10 mM Sucralose in der extrazellulären Lösung bestimmt wurde, erhöhte sich der K_m -Wert auf 1.96 mM, während der maximale Strom dabei konstant blieb (Abbildung 3-14).

Anhand der Erkenntnisse, dass die Anwesenheit von Sucralose zu einer geringeren Affinität von PdSUT1 gegenüber Saccharose führt, die maximale Stromantwort jedoch gleichbleibt, spricht dafür, dass es sich bei dem Süßstoff Sucralose tatsächlich um einen kompetitiven Inhibitor des Saccharosetransports von PdSUT1 handelt, wie es bereits für ShSUT1 und für ZmSUT1 gezeigt werden konnte (Reinders et al. 2006; Derrer et al. 2013).

3.1.11 Der Einfluss von Hitze auf die Transporteigenschaften von PdSUT1

Die zuvor detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung des Saccharosetransporters PdSUT1 gibt zum einen Aufschluss über die Transporteigenschaften des Transportproteins der Dattelpalme und zum anderen dient diese als Grundlage zur Aufschlüsselung der Thermotoleranz sowie der Thermodynamik dieser hitzebeständigen Wüstenpflanze. Im Folgenden soll nun anhand von biophysikalischen Techniken des SUC-Transporters PdSUT1 aufgeklärt werden, wie die Dattelpalme den Zuckertransport unter den extremen klimatischen Bedingungen in der Wüste aufrechterhält.

Da Temperaturveränderungen die Membranfluidität stark beeinflussen, und da die Membranfluidität direkten Einfluss auf Transportprozesse ausübt, soll nun herausgefunden werden, ob membranständige Transportproteine der Dattelpalme eine spezielle Hitzetoleranz aufweisen. Um diese Frage beantworten zu können, soll nun im Folgenden elektrophysiologisch der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Transportaktivität des pflanzlichen Saccharostransporters PdSUT1 mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik analysiert werden. Da die Modellpflanze *Zea mays*, im Vergleich zur Dattelpalme, in der gemäßigten Klimazone verbreitet ist, wird der Zuckertransporter ZmSUT1 als Referenz herangezogen.

Um elektrophysiologische Messungen bei definierten Temperaturen durchführen zu können, wurden ein Peltier-Element und entsprechende Temperatursensoren im Badmedium eingesetzt, welche die exakte Temperatur messen und durch einen Temperaturregler die Temperatur auf die gewünschte Höhe im Bad einregeln. Mithilfe der Temperaturregulation konnten somit Ströme bei definierten Temperaturen mittels der TEVC-Technik aufgezeichnet werden. Um zu prüfen, ob die Transportaktivität des pflanzlichen Saccharostransporters PdSUT1 durch Temperaturveränderungen beeinflusst wird, wurden I_{ss} bei einer Haltespannung von -20 mV bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 4°C und 40°C in Anwesenheit von 100 mM SUC pH 4 aufgezeichnet (Abbildung 3-15).

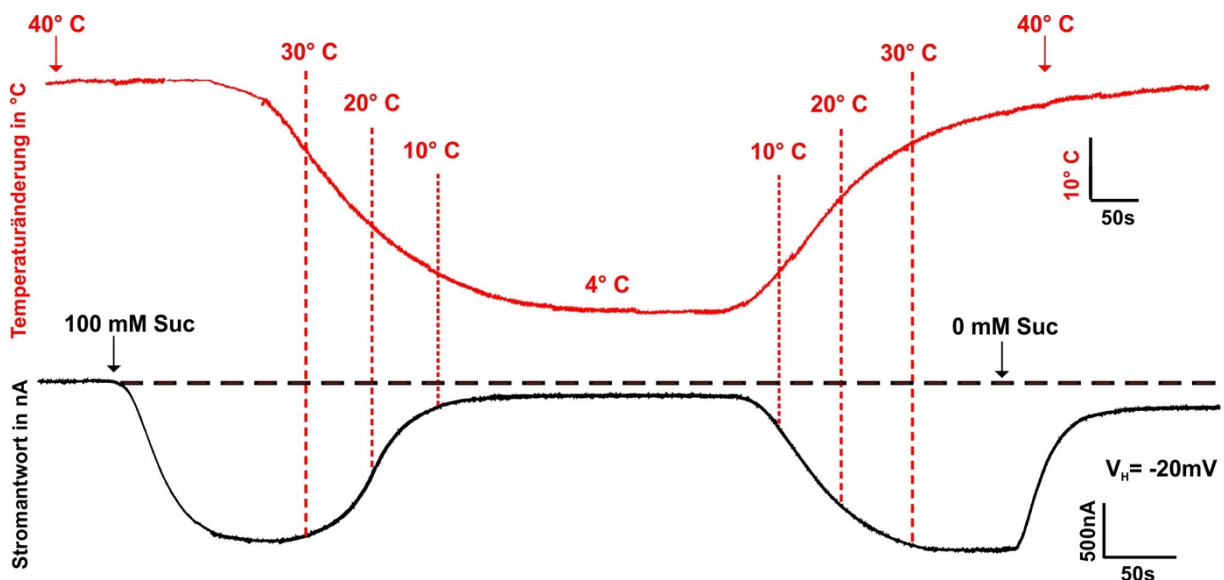


Abbildung 3-15: Eine Temperaturveränderung beeinflusst die SUC-induzierten Ströme von PdSUT1

Parallele Aufzeichnung der I_{ss} (schwarze Linie) und der Temperaturänderung im Bereich zwischen 4°C und 40°C (rote Linie) in Anwesenheit von 100 mM SUC (Zugabe und Wegnahme durch Pfeile markiert) bei pH 4 und einem Haltepotenzial von -20 mV.

Bei einer anfänglichen Temperatur von 40°C vermittelte PdSUT1 in Anwesenheit von 100 mM Saccharose den Einstrom von Protonen in die Oozyte, der in diesem repräsentativen Beispiel als negativer Strom von ca. 1090 nA messbar war. Diese Saccharose-induzierten Protonenströme fanden bei 40 °C ihr Maximum, da eine Temperaturerniedrigung gleichzeitig zu einer verringerten Stromantwort führte. Bei der niedrigsten Temperatur von 4°C konnten nahezu keine PdSUT1-vermittelten Ströme detektiert werden. Sobald jedoch die Temperatur erneut kontinuierlich auf 40°C erhöht wurde, konnte eine simultane Erhöhung der Transportaktivität beobachtet werden (Abbildung 3-15).

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Temperaturerniedrigung als auch eine Temperaturerhöhung die Transportaktivität von PdSUT1 beeinflusst und bei hohen Temperaturen (ab etwa 30°C) ihr Maximum erreicht. Im Gegensatz dazu konnten ab einer Temperatur von unter 10°C nahezu keine Saccharose-induzierten Ströme mehr ermittelt werden.

Da Carrier, im Gegensatz zu z.B. Ionenkanälen, eine starke Konformationsänderung bei Transportvorgängen durchleben, sind diese im Allgemeinen stärker temperatursensitiv als Kanalproteine (Hille 2001). Aufgrund dieser Konformationsänderungen weisen Transportproteine wie Carrier (Transporter) eine stark temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitsrate auf, was sich in Q_{10} -Werten von ≥ 2 widerspiegelt. Im Vergleich dazu ist der Transport über Kanäle relativ temperaturunabhängig, so dass sie einen geringeren Q_{10} -Wert von 1.2 bis 1.5 aufweisen (Hille 2001).

Um einen tieferen Einblick über die Temperaturabhängigkeit von PdSUT1 sowie vom Vergleichsmodelltransporter ZmSUT1 zu erhalten, wurden PdSUT1/ZmSUT1 exprimierende Oozyten mit 100 mM SUC bei pH 4 perfundiert und die Temperatur über einem Bereich von 15 bis 25 °C bzw. 25 bis 35 °C variiert. In Abbildung 3-16 sind die aufgezeichneten Gleichgewichtsströme bei -130 mV und den entsprechend angelegten Temperaturen von 15, 25 und 35 °C zu erkennen.

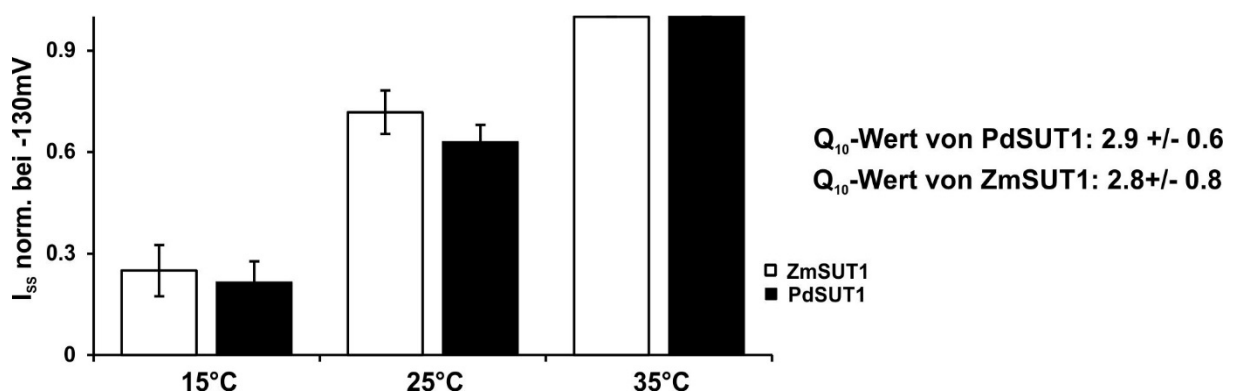


Abbildung 3-16: Temperaturabhängigkeit von PdSUT1 und ZmSUT1

Bei einem Membranpotenzial von -130 mV und einem pH-Wert von 4 wurden SUC-induzierte Ströme bei 15, 25 und 35 °C aufgezeichnet. Die I_{ss} wurden je auf die Stromantworten bei -130 mV in Anwesenheit von 100 mM SUC pH 4 normiert. Die angegebenen Q_{10} -Werte wurden bei einem Temperatursprung zwischen 15 und 25 °C angegeben ($n=6 \pm SD$).

In Abbildung 3-16 sind die normierten Gleichgewichtsströme von PdSUT1 und ZmSUT1 dargestellt. In beiden Fällen resultierten die Analysen in einem Q_{10} -Wert von über 2 im Temperaturbereich zwischen 15-25 °C. Das bestätigt, dass der Transportmechanismus von ZmSUT1 und PdSUT1 dem eines Transporters/Carriers entspricht.

3.1.12 Die Temperatur beeinflusst die Substrataffinität von PdSUT1

Wie oben bereits gezeigt werden konnte, sind die pflanzlichen Saccharosetransporter PdSUT1 und ZmSUT1 stark temperatursensitiv. Um herauszufinden, ob sich eine Temperaturveränderung auch auf die Affinität zum Substrat auswirkt, wurde die Transportaktivität und damit die Höhe der Saccharose-induzierten Transportströme (I_{ss}) in Anwesenheit unterschiedlicher SUC-Konzentrationen (pH 5.6) bei 3 verschiedenen Temperaturen (15, 25 und 35°C) ermittelt und der K_m -Wert errechnet.

Die daraus resultierenden Gleichgewichtsströme bei -130mV wurden auf 100 mM Suc normiert. Anhand der daraus resultierenden Sättigungskurven konnten unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung die K_m -Werte beider Transporter bei den jeweiligen Temperaturen bestimmt werden (vgl. 2.7.1).

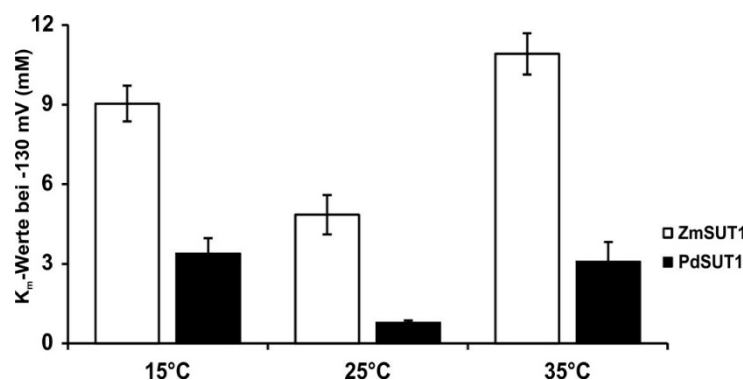


Abbildung 3-17: Bestimmung der K_m -Werte von PdSUT1 und ZmSUT1 bei unterschiedlichen Temperaturen

Dargestellt sind die K_m -Werte von PdSUT1 und ZmSUT1 bei einer Membranspannung von -130 mV bei 15, 25 und 35°C. ($n=6 \pm SD$).

Die in Abbildung 3-17 gezeigten K_m -Werte von PdSUT1 sowie ZmSUT1 bei einer Membranspannung von -130 mV zeigen deutlich, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Substrataffinität hat. Beide Saccharosetransporter weisen bei 25°C die höchste Affinität zu ihrem Substrat auf. PdSUT1 zeigt jedoch bei einer Temperatur von 25°C eine viel stärkere Affinität für Saccharose als ZmSUT1, da der K_m -Wert von ZmSUT1 (K_m -Wert: 4.8 +/- 0.7 mM) etwa 4-fach höher ist als der von PdSUT1 (K_m -Wert: 0.8 +/- 0.08 mM). Diese im einstelligen

millimolaren Bereich liegenden K_m -Werte deuten auf einen moderat affinen Saccharosetransport über PdSUT1 bzw. ZmSUT1 hin.

Bei höheren (35°C) bzw. niedrigeren (15°C) Temperaturen ist bei beiden Transportern eine Erniedrigung der Affinität gegenüber ihrem Substrat zu erkennen. Zudem konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den ermittelten K_m -Werten von PdSUT1 die K_m -Werte von ZmSUT1 bei den unterschiedlichen Temperaturen insgesamt deutlich höher sind (Abbildung 3-17).

3.1.13 Isopren beeinflusst den Saccharosetransport bei niedrigen SUC-Konzentrationen

Der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien) wird von vielen höheren Pflanzen, abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen, produziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Pflanzen Isopren emittieren und dieser Prozess stark temperatur- und lichtabhängig ist (Sanadze 1966; Sanadze and Kalandadze 1966; Sanadze and Kursanov 1966; Sanadze 1969). Interessanterweise produziert die Dattelpalme unter Hitze- und Trockenstress besonders viel Isopren. In einem Großversuch in den Klimakammern des Helmholtz Zentrums in München konnte gezeigt werden, dass Dattelpalmen unter klimatischen Bedingungen, die einen Sommer auf der arabischen Halbinsel simulieren, bis zu $50 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ emittieren (unveröffentlichte Daten des Deutsch-Saudischen-Forschungskonsortiums unter Leitung von Rainer Hedrich und Khaled Al-Rasheid).

Obwohl bis heute noch nicht genau geklärt werden konnte, weshalb höhere Pflanzen Isopren emittieren, existieren jedoch einige Publikationen, in denen z.B. gezeigt werden konnte, dass durch die Emission von Isopren die Photosynthesemembran gegenüber zu hohen Temperaturen schützt bzw. stabilisiert und somit zu einer höheren Thermotoleranz verhilft (Sharkey and Singaas 1995; Behnke et al. 2010). In weiteren Veröffentlichungen konnte außerdem gezeigt werden, dass Isopren die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2) reduziert und somit oxidativen Schäden vorbeugt (Velikova and Loreto 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005).

Diese antioxidativen Eigenschaften konnten anhand weiterer Untersuchungen bestätigt werden, bei denen Isopren durch Ozon sichtbare Schäden hervorruft sowie die Beeinträchtigung der Photosynthese vermindert (Loreto et al. 2001; Loreto and Velikova 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Isopren speziell unter Bedingungen (hohe Temperaturen sowie hohe Lichtintensitäten), welche eine hohe Rate der Isoprenemission verursachen, die Anreicherung von ROS unterbindet (Behnke et al. 2010). In der Publikation von Vickers et al. konnte ebenfalls bestätigt werden, dass stressinduziert weniger H_2O_2 in Isopren-emittierenden Pflanzen angereichert wird (Vickers et al. 2009).

Unter Sonneneinstrahlung sowie Temperaturen über 30°C wird Isopren vor allem von bestimmten Bäumen wie z.B. Pappeln, Fichten oder Eichen freigesetzt und kann bis zu 15% des durch Photosynthese fixierten Kohlenstoffs betreffen (Fehsenfeld et al. 1992; Guenther et al. 1993; Kesselmeier and Staudt 1999; Zimmer et al. 2000; Jud et al. 2016). Die stärksten mitteleuropäischen Isopren-emittierenden Pflanzen gibt es bei den *Fagaceae* (Buchengewächsen); mit der Gattung *Quercus* (Eichen), aber auch bei den *Salicaceae* (Weidengewächsen) mit den Gattungen *Salix* (Weiden) und *Populus* (Pappeln) (Kesselmeier and Staudt 1999). Es gibt aber auch andere Pflanzenarten wie z.B. den *Poaceae* (Süßgräser), *Hamamelidaceae* (Zaubernussgewächse) und *Myrtaceae* (Myrtengewächse), welche ebenfalls Isopren emittieren können.

Ab Temperaturen über 30°C steigt die Emission von Isopren enorm an und erreicht bei etwa 45°C ihr Maximum (Monson et al. 1992; Sharkey and Loreto 1993). Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse geht man heute davon aus, dass die Bildung von Isopren eine Art Schutzmechanismus bei erhöhten Temperaturen darstellt (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Penuelas et al. 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005).

Wie Isopren jedoch genau den Photosyntheseapparat bei erhöhten Temperaturen schützt ist noch unklar. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass sich Isopren, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften, in Biomembranen einlagert und dadurch die Membranstabilität/ -fluidität bei hohen Temperaturen positiv beeinflusst (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007).

Unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik soll nun im Folgenden geklärt werden, ob die Anwesenheit von Isopren bei hohen Temperaturen einen Einfluss auf den PdSUT1-vermittelten Transport von Saccharose hat. Durch direkten Vergleich der Transportproteine der Wüstenpflanze (*Phoenix dactylifera*) mit der aus dem gemäßigten Klima stammenden Modellpflanze (*Zea mays*) soll die Thermotoleranz sowie die Thermodynamik der hitzeresistenten Dattelpalme mithilfe des flüchtigen Kohlenwasserstoffs Isopren weiter aufgeklärt werden.

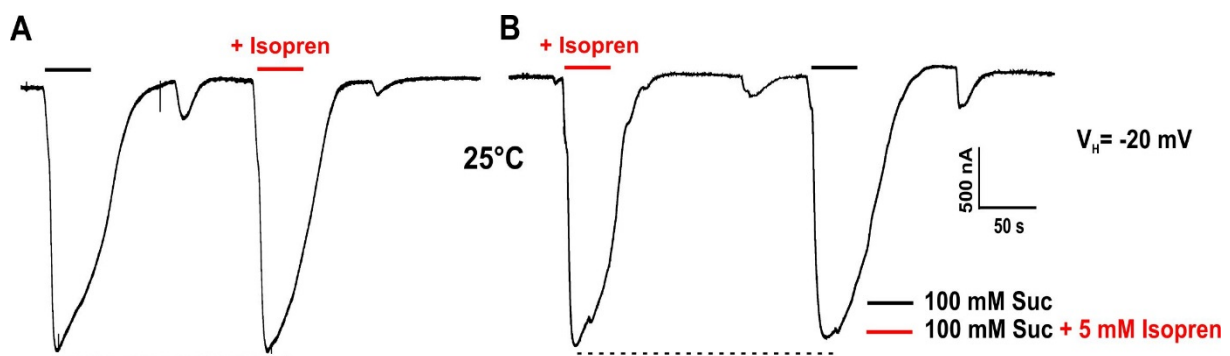


Abbildung 3-18: Isopren beeinflusst nicht den SUC-Transport von PdSUT1 bei 25°C und hohen SUC-Konzentrationen

Stromantwort bei einer Haltespannung von -20 mV auf die Zugabe sättigender SUC-Konzentration (100 mM SUC; schwarzer Strich) bei einer Temperatur von 25°C. Repräsentative Originalströme bei einem pH-Wert von 5.6 in An- und Abwesenheit von 5 mM Isopren (roter Strich).

In Abbildung 3-18 sind die PdSUT1-vermittelten Stromantworten einer repräsentativen Zelle auf die Zugabe von 100 mM Saccharose in An- und Abwesenheit von 5 mM Isopren bei einer Temperatur von 25°C und einer Haltespannung von -20 mV dargestellt. Die zusätzliche Applikation von 5 mM Isopren in der Zuckerlösung führte bei hohen SUC-Konzentrationen zu keiner Änderung der Transportaktivität von PdSUT1 (Abbildung 3-18 A und B). Dasselbe Experiment wurde mit dem Modelltransporter ZmSUT1 durchgeführt, bei dem ebenso keine Änderung der Transportströme in Anwesenheit von Isopren zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

Zur Demonstration der Isoprenwirkung auf den Saacharosetransport beider Zuckertransporter bei geringeren Isoprenkonzentrationen wurden mithilfe von Single-Puls-Messungen die Stromantworten von PdSUT1 bzw. ZmSUT1 bei unterschiedlichen Temperaturen (pH 5.6) bei einer Haltespannung von -80 mV durchgeführt (Abbildung 3-19).

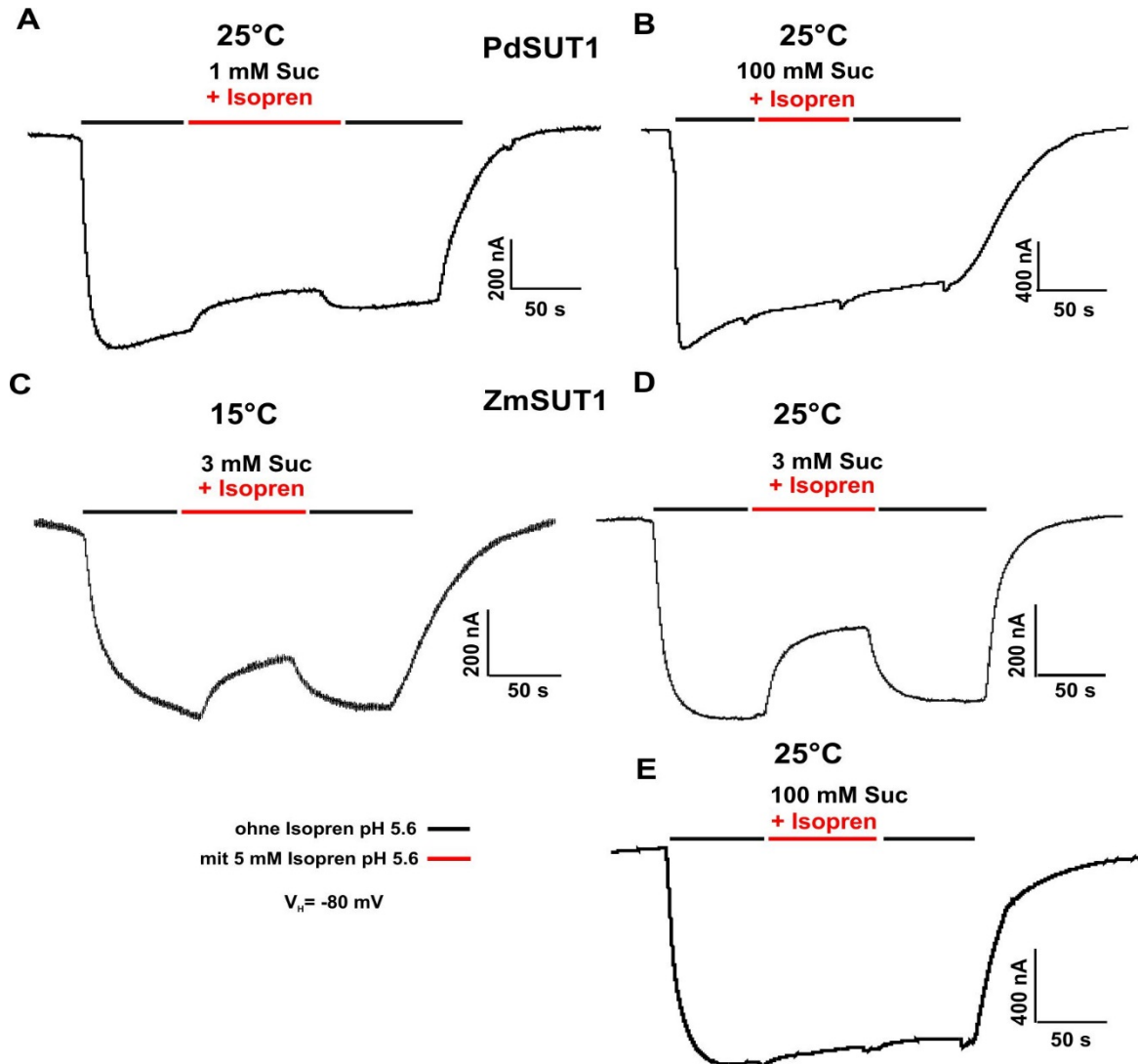


Abbildung 3-19: Isopren vermindert reversibel die Saccharose-induzierte Stromantwort von PdSUT1 und ZmSUT1 bei niedrigen SUC-Konzentrationen

Stromantwort je einer repräsentativen ZmSUT1/PdSUT1-exprimierenden Zelle bei der Applikation von niedrigen bzw. hohen SUC-Konzentrationen mit (rote Linie) bzw. ohne 5 mM Isopren (schwarze Linie) bei einer Haltespannung von -80 mV. PdSUT1/ZmSUT1-exprimierende Oozyten wurden mit einer 1 bzw. 3 mM sowie einer 100 mM SUC-Lösung pH 5.6 vermessen (n=7; ± SD).

In Abbildung 3-19 sind jeweils die Originalströme einer repräsentativen ZmSUT1 bzw. PdSUT1-exprimierenden Oozyte als Reaktion auf die Zugabe einer niedrigen bzw. hohen Saccharosekonzentration mit bzw. ohne 5 mM Isopren bei 15 sowie 25°C dargestellt. Bei einer Temperatur von 25°C sowie einer hohen SUC-Konzentration wird bei beiden SUC-Transportern, bei einer Haltespannung von -80 mV, ein Protoneneinstrom in die Oozyte hervorgerufen, welcher sich als negativer Strom äußert. Die zusätzliche Zugabe von Isopren beeinflusst die Stromantwort beider Transporter nicht (Abbildung 3-19 B und E). Im Gegensatz dazu konnte bei niedrigen SUC-Konz. (in der Nähe des K_m -Wertes) in Anwesenheit von Isopren eine verminderte Stromantwort detektiert werden, welche, sobald Isopren aus dem Perfusionssystem entfernt wurde, wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückkehrte

(Abbildung 3-19 A und D). Die zusätzliche Gabe von Isopren führte demnach, bei einer Temperatur von 25°C sowie geringen – also physiologisch-relevanten - SUC-Konz., zu einer reversiblen verringerten Transportaktivität von PdSUT1 sowie von ZmSUT1. Dieser Isopren-Effekt konnte im Falle von ZmSUT1 ebenso bei einer niedrigeren Temperatur von 15°C festgestellt werden (Abbildung 3-19 C). Zudem konnte bei dem Saccharosetransporter aus Mais beobachtet werden, dass die Zugabe von Isopren die Transportaktivität stärker beeinflusst als bei PdSUT1. D.h. PdSUT1 ist weit weniger empfindlich gegenüber Isopren als ZmSUT1.

Da postuliert wird, dass Isopren bei hohen Temperaturen (>30°C) in die Plasmamembran integriert und diese dann gegen extreme Hitze schützt (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007), soll nun im Folgenden herausgefunden werden, ob Isopren bei extremen Bedingungen, sprich bei höheren Temperaturen, die Transportaktivität von PdSUT1 bzw. ZmSUT1 verändert. Im Zuge dessen wurde die Substrataffinität beider Transportproteine in Abhängigkeit von der Temperatur sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Isopren bestimmt. Durch die Applikation unterschiedlicher SUC-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von 5 mM Isopren, konnten die Affinitäten des jeweiligen Transporters zu Saccharose bei den Temperaturen 15, 25 und 35°C bestimmt.

Zur Ableitung von PdSUT1 bzw. ZmSUT1 vermittelnden Stromantworten bei definierter Membranspannung wurden unter variierenden SUC-Konzentrationen Messungen mit Standard-Einfachspannungspulsprotokollen (IV's; vgl. 2.6.5) durchgeführt. Die daraus resultierenden Gleichgewichtsströme bei -130 mV wurden gegen die applizierten SUC-Konzentrationen aufgetragen. Anhand der daraus resultierenden Sättigungskurven konnten unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung die K_m -Werte beider Transporter in An- und Abwesenheit von 5 mM Isopren bei den jeweiligen Temperaturen bestimmt werden (Abbildung 3-20 A und B).

Zusätzlich wurde eine detaillierte Analyse der ermittelten K_m -Werte in An- und Abwesenheit von Isopren im Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV von ZmSUT1 und PdSUT1 bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt (Abbildung 3-20 B und D).

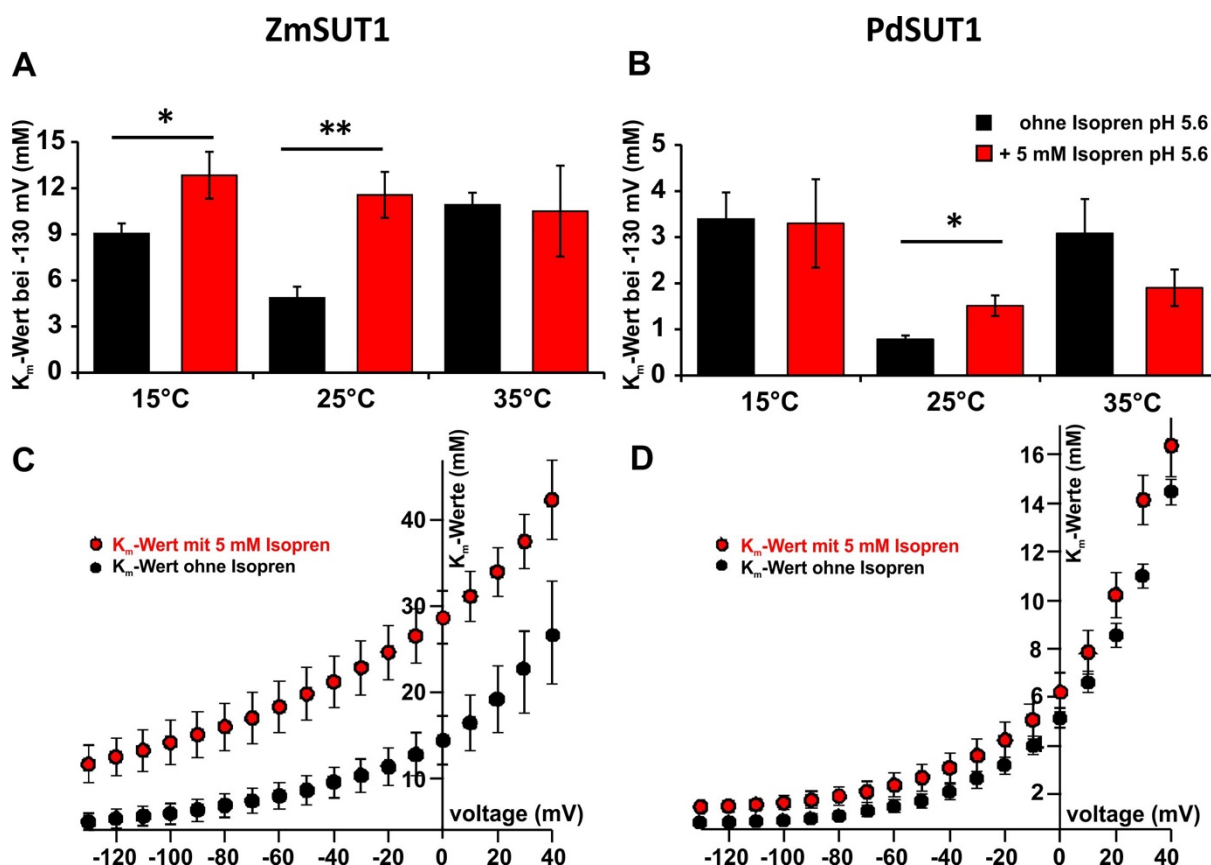


Abbildung 3-20: Bestimmung der K_m -Werte von ZmSUT1 und PdSUT1 in Abhängigkeit von Isopren

(A und B) K_m -Werte von ZmSUT1 (A) und PdSUT1 (B) bei einer Membranspannung von -130 mV bei 15, 25 und 35°C in Anwesenheit von 5 mM Isopren (rote Balken) bzw. in Abwesenheit von Isopren (schwarze Balken). (C und D) K_m -Werte von ZmSUT1 (C) und PdSUT1 (D) im Spannungsbereich zwischen +40 und -130 mV bei 25°C und einem pH-Wert von 5.6 in Anwesenheit von 5 mM Isopren (rote Punkte) bzw. in Abwesenheit von Isopren (schwarze Punkte) ($n=7 \pm SD$).

In Abbildung 3-20 A und B wird deutlich, dass beide Transporter einen signifikant erhöhten K_m -Wert bei 25°C in Anwesenheit von Isopren aufweisen. Bei beiden Saccharosetransportern verdoppelte sich der K_m -Wert sobald, Isopren in der SUC-Lösung vorhanden war. Dieser Effekt war bei ZmSUT1-exprimierenden Oozyten stärker ausgeprägt und konnte auch bei einer Temperatur von 15°C beobachtet werden (Abbildung 3-20 A).

Somit konnte gezeigt werden, dass Isopren bei gemäßigten Temperaturen von 25°C einen negativen Einfluss auf die Affinität von PdSUT1 bzw. ZmSUT1 zum Substrat hat. Im Gegensatz dazu konnte bei beiden Saccharosetransportern kein Unterschied in der Substrataffinität in Abhängigkeit von Isopren bei einer Badtemperatur von 35°C festgestellt werden. Bei Betrachtung der ermittelten K_m -Werte von PdSUT1 (Abbildung 3-20 D) als auch von ZmSUT1 (Abbildung 3-20 C) bei unterschiedlichen Spannungen in Anwesenheit von 5 mM Isopren, wird deutlich, dass die Bindungsaffinität von ZmSUT1 bei 15 und 25°C stärker

beeinflusst wird, als von PdSUT1. Die K_m -Werte beider Transportproteine nehmen sowohl mit als auch ohne Isopren mit hyperpolarisierter Membranspannung ab, so dass bei der negativsten angelegten Spannung von -130 mV die kleinsten K_m -Werte ermittelt werden konnten.

Zusammenfassend konnte der Saccharosetransporter PdSUT1 aus *Phoenix dactylifera* mithilfe des Modelltransporters ZmSUT1 hinreichend charakterisiert werden. Der Dattelpalmen-Saccharose/ H^+ -Symporter weist allgemein sehr ähnliche Transportcharakteristika zu dem SUC-Transporter aus Mais auf.

Zudem konnte gezeigt werden, dass der Saccharosetransport stark temperaturabhängig ist. Dass Isopren bei vielen Pflanzenarten unter extremen Temperaturbedingungen (ab 30°C) in die Membran eingebettet wird und somit die Pflanze vor der Hitze einwirkung schützt, schlug sich nicht auf die Performance der beiden untersuchten Saccharosetransporter nieder. Es konnte zwar in Anwesenheit von Isopren eine reversible Verminderung der Transportaktivität beobachtet werden, jedoch wurde dieser Effekt nur bei 25°C beobachtet und trat stärker beim Mais-Transporter zum Vorschein.

3.2 Die Beteiligung der S-Typ Anionenkanäle aus der Dattelpalme und der Gerste bei der Regulation der Stomabewegung

Um weitere Hinweise zu erhalten, wie die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* in der Lage ist, unter extremer Hitze und Trockenheit zu überleben, soll im Rahmen dieser Arbeit der Stress-induzierte Stomaschluss der Dattelpalme vergleichend zur Modellpflanze *Arabidopsis* und der Gerste untersucht werden. Wie die Dattelpalme gehören auch Gräser zu den monokotyledonen Pflanzen und besitzen zumeist komplexere und effizientere Stomata als Dikotyledone. Während der Schließzellmechanismus von Dikotyledonen an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bereits gut untersucht ist, ist bei den einkeimblättrigen Pflanzen weit weniger bekannt (Raissig et al. 2016; Sun et al. 2016; Chen et al. 2017).

Durch die Regulation der Stomaöffnungsweite ist die Pflanze in der Lage, die Rate des Wasserverlustes zu minimieren. Die Stomaöffnungsweite ist sowohl an die photosynthetischen Bedürfnisse als auch an den Wasserhaushalt der Pflanze angepasst. Wird Kohlenstoffdioxid für die Photosynthese benötigt, öffnen die Stomata, während sie bei zu hohem Wasserverlust schließen.

Die Evolution von Stomata nimmt somit eine essenzielle Rolle für eine erfolgreiche Anpassung der Pflanzen an das Landleben ein. Morphologisch unterscheiden sich die Schließzellen der Gräser von den meisten anderen Pflanzenarten. Während die Gräser über zwei schmale, hantelförmige Schließzellen, welche zusätzlich jeweils von einer Nebenzelle umgeben sind, verfügen, weisen die meisten anderen Pflanzenarten, wie z.B. auch der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), zwei relativ große nierenförmige Schließzellen auf (Willmer and Fricker 1996; Raissig et al. 2016; Chen et al. 2017). Die Gräser stellen eine der größten, aber auch jüngsten Familien innerhalb der Blütenpflanzen dar und sind weltweit in allen Klimazonen der Erde anzutreffen. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass Gräser schneller auf Wassermangel reagieren können als andere Pflanzen (Brownlee 2018), jedoch blieb bislang der Schließzellmechanismus der Gräser weitestgehend unerforscht.

In *Arabidopsis* wird der S-Typ Anionenkanal AtSLAC1 hoch spezifisch in den Schließzellen exprimiert und spielt beim Stomaschluss eine essenzielle Rolle (Negi et al. 2008; Saji et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Dabei spielt das Phytohormon ABA eine entscheidende Rolle, da dieses als Antwort auf Trockenheit synthetisiert wird und über eine schnelle ABA-Signaltransduktionskette die Aktivierung von S-Typ Anionenkanäle vermittelt (vgl. Kapitel 1.4). Der aktive S-Typ Anionenkanal vermittelt den Ausstrom von Chlorid- und Nitrat-Ionen aus den Schließzellen, was wiederum das Membranpotenzial stark depolarisiert und damit Depolarisations-aktivierte K^+ -Kanäle öffnet. Der gleichzeitige massive Verlust von Kalium und Anionen lässt den Turgor in den Schließzellen absinken, was schließlich zum Stomaschluss führt.

Da die Gräser als wichtige Nutzpflanze etwa dreiviertel der landwirtschaftlich genutzten Fläche einnehmen und sich als extrem anpassungsfähig erweisen, wurde im Folgendem der S-Typ Anionenkanal SLAC1 der Gerste (*Hordeum vulgare*) und der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) vergleichend zu SLAC1 aus *Arabidopsis* auf molekularer Ebene untersucht. Dies soll erste Hinweise auf die besonderen Anpassungen monokotyledoner Pflanzen geben, die im Laufe der Evolution erfolgreich extrem trockene Habitate eroberten.

3.2.1 Die phylogenetische Einordnung des S-Typ Anionenkanals PdSLAC1/HvSLAC1

Auf Basis von veröffentlichten Genom- und Transkriptominformationen der Dattelpalme (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem, Hu, and Zhang 2013) aus *Phoenix dactylifera* und der Gerste (Mayer et al. 2011) aus *Hordeum vulgare* wurden Orthologe zu anderen bereits bekannten S-Typ Anionenkanälen monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen identifiziert.

Die Gene wurden anschließend aus cDNA der Pflanze kloniert oder anhand der bekannten und verifizierten Sequenzen synthetisiert (GeneART Gene Synthesis Verfahren; Thermo Fisher Scientific®) und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Anschließend konnten diese in die entsprechenden Expressionsvektoren (vgl. 2.1.2.3) umkloniert werden. Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Kanäle, wurde die zuvor hergestellte cRNA (vgl. 2.2.1) in das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten injiziert und zur Expression für 2 Tage bei 16°C inkubiert.

Innerhalb der S-Typ Anionenkanäle gibt es nicht nur die SLAC-Kanäle, sondern auch homologe Kanäle, die SLAH-Kanäle, die teilweise andere Eigenschaften und Aufgaben besitzen.

Im Genom von *Arabidopsis* existieren neben SLAC1 noch vier weitere S-Typ Anionenkanäle, die SLAC1 Homologe SLAH1-4 (Negi et al. 2008; Chen et al. 2010). SLAH3 wird in der gesamten Pflanze exprimiert, wohingegen SLAH1 und SLAH2 ausschließlich in der Wurzel exprimiert wird. In den Schließzellen trägt SLAH3 einen Teil an den S-Typ Anionenströmen bei (Geiger et al. 2011), SLAH3 dagegen ist, in den Mesophyllzellen, alleine für die S-Typ Anionenströme verantwortlich (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011; Demir et al. 2013).

Im Falle von *Arabidopsis thaliana* z.B. weist die Gruppe der SLAH2/3-Kanäle eine Nitrat-abhängige Aktivierung auf. Bei SLAH2 konnte sogar eine strikte Nitratselektivität nachgewiesen werden, während die Gruppe der SLAH1/4-Kanäle vermutlich eine modifizierende Wirkung auf die anderen S-Typ Anionenkanäle besitzt. Wie auch bei SLAC1, ist bei SLAH2 und SLAH3 ebenfalls eine Interaktion mit einer aktivierenden Kinase für eine erfolgreiche Kanalaktivierung erforderlich (Geiger et al. 2011; Maierhofer, Lind, et al. 2014).

Die SLAC1-Kanäle lassen sich jedoch anhand einer SLAC1-spezifischen Erkennungssequenz von den beiden SLAH-Familien unterschieden (Dreyer et al. 2012).

Basierend auf Homologien der Aminosäuresequenz mit AtSLAC1 und weiteren SLAC-Proteinen konnte der Anionenkanal PdSLAC1/HvSLAC1 phylogenetisch eingruppiert werden wodurch erste Hinweise hinsichtlich der Funktion der zu untersuchenden Proteine sowie Transportcharakteristika getroffen werden können (Abbildung 3-21).

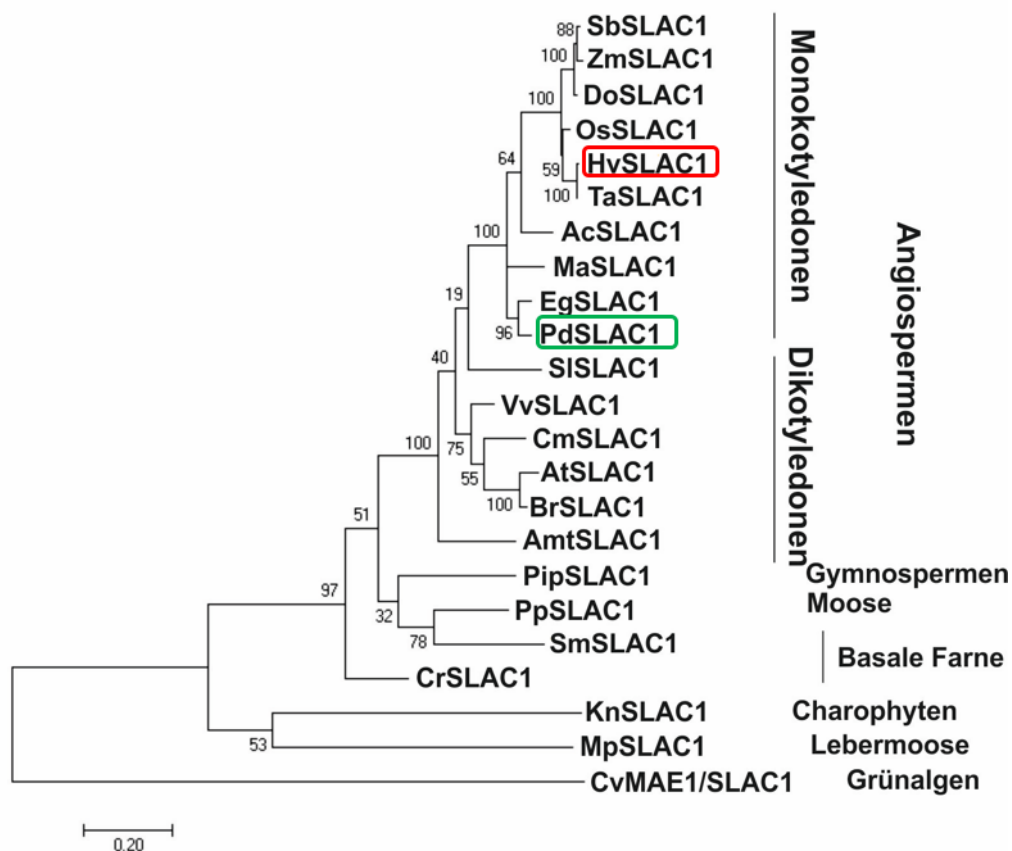


Abbildung 3-21: Phylogenetische Eingruppierung der S-Typ Anionenkanäle PdSLAC1 und HvSLAC1 aus *Phoenix dactylifera* und *Hordeum vulgare*

(A) PdSLAC1 (in grün umrandet) aus *Phoenix dactylifera* und HvSLAC1 (in rot umrandet) aus *Hordeum vulgare* konnte phylogenetisch, ebenso wie AtSLAC1 und OsSLAC1 zu der Untergruppe SLAC1 aus der Familie der SLAC/SLAH Anionenkanäle zugeordnet werden. Zur Klassifizierung wurden Mitglieder unterschiedliche Pflanzengattungen der SLAC/SLAH-Anionenkanäle aus *Sorghum bicolor* (Sb), *Zea mays* (Zm), *Dichanthelium oligosanthes* (Do), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta), *Ananas comosus* (Ac), *Musa acuminata* (Ma), *Elaeis guineensis* (Eg), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Vitis vinifera* (Vv), *Cucumis melo* (Cm), *Arabidopsis thaliana* (At), (Br), *Amborella trichopoda* (Amt), *Pinus parviflora* (Pip), *Physcomitrella patens* (Pp), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Ceratopteris richardii* (Cr), *Klebsormidium nitens* (Kn), *Marchantia polymorpha* (Mp) und *Chlorella variabilis* (Cv) herangezogen.

Abbildung 3-21 zeigt die korrekte phylogenetische Eingruppierung von PdSLAC1/HvSLAC1 im Vergleich zu einer Vielzahl von unterschiedlichen SLAC1-Sequenzen aus Samenpflanzen. Bereits zu Beginn des phylogenetischen Stammbaums spaltet sich der Anionenkanal der

einzelligen Grünalge (*Chlorella variabilis*) von der Entwicklung anderer SLAC1-Kanäle ab und bilden dadurch einen eigenen abgrenzenden Ast. Oberhalb der Grünalgen gliedern sich die Kanäle von *Klebsormidium nitens* und *Marchantia polymorpha* in den Stammbaum ein und bilden ebenfalls einen eigenständigen Ast. Im Vergleich dazu, weisen die Kanäle aus *Pinus parviflora*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii* sowie *Ceratopteris richardii* eine deutlich nähere Verwandtschaft zu den Samenpflanzen. Bei den Samenpflanzen hingegen zeigt sich eine klare Trennung zwischen SLAC1-Anionenkanäle der Monokotyledonen und Dikotyledonen. Am Ursprung der Samenpflanzen spaltet sich dabei zuerst der Kanal aus dem jüngsten gemeinsamen Vorfahren der Samenpflanzen *Amborella trichopoda* von den anderen Spermatophyten ab. Der Anionenkanal der Gerste (*Hordeum vulgare*) und der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) gliedert sich jeweils eindeutig in die Monokotyledonen ein. Der SLAC1-Kanal aus *A. thaliana* dagegen wird den Dikotyledonen zugeordnet.

3.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenkanäle PdSLAC1 und HvSLAC1

Im Jahr 2008 wurde *AtSLAC1* als das erste Gen eines S-Typ-Kanals in *Arabidopsis thaliana* entdeckt, konnte jedoch nicht im heterologen Expressionssystem funktionell untersucht werden (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Allerdings konnte bereits einige Jahre zuvor gezeigt werden, dass die S-Typ Anionenströme in Schließzellen durch Kinasen mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung auf einem Ca^{2+} -abhängigen und einem Ca^{2+} -unabhängigen Weg reguliert werden können (Schroeder and Hagiwara 1989; Schmidt et al. 1995; Li and Assmann 1996; Levchenko et al. 2005; Mori et al. 2006). So konnte schließlich im Jahre 2009 *AtSLAC1* durch die Koexpression der Proteinkinase *AtOST1* als funktioneller S-Typ Anionenkanal erstmals elektrophysiologisch in *Xenopus laevis* Oozyten charakterisiert werden (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009). Durch weitere biophysikalische Analysen konnte später letztendlich neben der Ca^{2+} -unabhängigen Regulierung über OST1 auch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von *AtSLAC1* durch die Kinasen *AtCPK3*, 6, 21 und 23 nachgewiesen werden. Die negative Regulation von SLAC1 durch die Phosphatase *AtABI1* konnte bereits für die Ca^{2+} -unabhängige Kinase OST1 sowie für die Ca^{2+} -abhängige Kinase CIPK23 gezeigt werden (Geiger et al. 2010; Brandt et al. 2012; Scherzer et al. 2012; Brandt et al. 2015).

Um den putativen SLAC1-Kanal der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* und des Grases *Hordeum vulgare* elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurden die entsprechenden cRNAs in *Xenopus laevis* Oozyten zusammen mit aktivierenden Kinasen (OST1 bzw. CPK6) coexprimiert und mittels TEVC-Technik analysiert. Parallelen bzw. Unterschiede bezüglich ihrer Transporteigenschaften wurden vergleichend zum dikotyledonen Modellkanal *AtSLAC1* untersucht.

3.2.3 PdSLAC1 und HvSLAC1 benötigen eine OST1 Kinase zur Kanalaktivierung

Wie bereits oben erwähnt, sind SLAC1 Anionenkanäle per se inaktiv in heterologen Expressionssystemen (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Nur durch eine Co-Expression mit der Kinase OST1 oder Kinasen der CPK-Familie sind makroskopische Anionenströme aufzuzeichnen. Eine Besonderheit ist bei der Aktivierung von SLAC1 durch die Kinase OST1 zu beachten: OST1 aktiviert SLAC1 nur dann reproduzierbar, wenn der Kanal und die Kinase über komplementäre YFP-Hälften miteinander verbunden sind (Geiger et al. 2009). Um PdSLAC1 schließlich funktionell zu charakterisieren, wurde wiederum das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten herangezogen. Dafür wurden Split-YFP-(BIFC)-Konstrukte des Kanals und der Kinase generiert (Ghosh, Hamilton, and Regan 2000; Horstman et al. 2014), so dass die C-terminale Hälfte des Fluorophors YFP (YFP^C) an den C-Terminus von SLAC1 fusioniert war, während sich der N-terminale Teil (YFP^N) am C-Terminus der Kinase befand (vgl. 2.5.1). Mithilfe der BIFC-Konstrukte konnte nicht nur eine elektrophysiologische Charakterisierung vorgenommen werden, sondern auch die Interaktion zwischen dem Kanal und der Kinase anhand der Fluoreszenz-Komplementation untersucht werden.

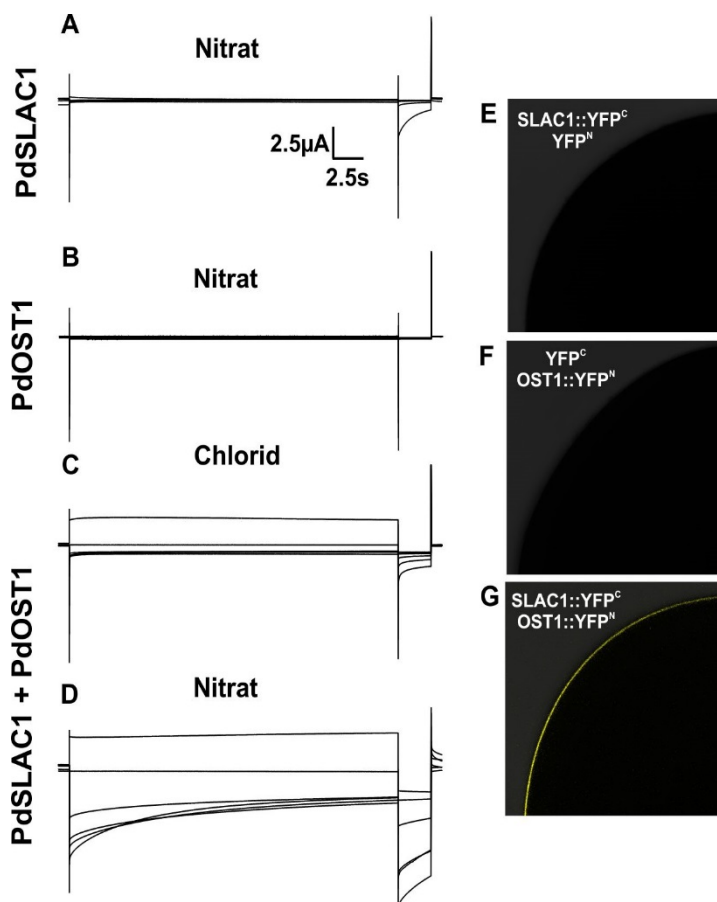


Abbildung 3-22: PdSLAC1 benötigt eine Kinase zur Aktivierung.

Dargestellt sind die Ströme über die gesamte Oozytenmembran in Anwesenheit von 10 mM Chlorid bzw. Nitrat unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls (vgl. Abb. 2.4). (A) Oozyten, die den Kanal alleine exprimierten, zeigten keine makroskopischen Anionenströme. (B) Auch die Kinase PdOST1 alleine erzeugt keine messbaren Ströme. (C und D) Die Ko-Expression von PdSLAC1 mit PdOST1 führt zu einer Kanalaktivierung in Anwesenheit von Nitrat. (E, F, G) Split-YFP (BIFC)-Analyse von PdSLAC1::YFP^C und YFP^N bzw. YFP^C und PdOST1::YFP^N sowie SLAC1::YFP^C und PdOST1::YFP^N in *Xenopus* Oozyten. Nur die Ko-Expression von SLAC1::YFP^C und PdOST1::YFP^N führt zu einer Komplementation des YFP-Signals (gelb).

Vergleichbar mit den Studien zu AtSLAC1 (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009), konnte mithilfe von elektrophysiologischen Messungen von PdSLAC1 in *Xenopus* Oozyten gezeigt werden, dass ausschließlich bei der Koexpression von PdSLAC1 und PdOST1 eine Aktivierung des Kanals vernommen werden konnte (Abbildung 3-22 C und D). Oozyten, die den Kanal oder die Kinase alleine exprimierten zeigten keine makroskopischen Anionenströme (Abbildung 3-22 A und B). Sobald die Kinase jedoch koexprimiert wurde, bewirkt die Kinase eine Aktivierung des Kanals und es lassen sich makroskopische Anionenströme über die Plasmamembran der Oozyte messen. Interessanterweise konnten in Anwesenheit von 10 mM Chlorid keine charakteristischen S-Typ Anionenströme detektiert werden (Abbildung 3-22 C). Nur in Anwesenheit von 10 mM Nitrat erschienen die für S-Typ Anionenkanäle typischen Kinetiken mit einer langsamen Deaktivierungskinetik bei hyperpolarisierenden Spannungen (Abbildung 3-22 D). Anhand der verwendeten BIFC -Methode, konnte analysiert werden, ob die Ca^{2+} -unabhängige Kinase PdOST1 ein potenzieller Interaktionspartner für PdSLAC1 darstellt. Die Expression von PdSLAC1::YFP^C und YFP^N sowie von YFP^C und PdOST1::YFP^N in *Xenopus laevis* Oozyten resultierte in keiner spezifischen YFP-Fluoreszenz (Abbildung 3-22 E und F). Die Koexpression von SLAC1::YFP^C und PdOST1::YFP^N jedoch, führte zu einer Komplementierung des YFP-Signals, so dass die Ca^{2+} -unabhängige Kinase OST1 aus *P. dactylifera* als geeigneter Interaktionspartner für den Anionenkanal PdSLAC1 betrachtet werden kann (Abbildung 3-22 G).

Auch bei der elektrophysiologischen Untersuchung von HvSLAC1 konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal ausschließlich durch Koexpression einer Ca^{2+} -abhängigen (CPK6) bzw. einer Ca^{2+} -unabhängigen (OST1) Kinase aktiviert werden kann. Oozyten, die den Kanal alleine exprimierten, konnten zudem weder in Anwesenheit von Chlorid noch in Nitrat makroskopische Anionenströme aufweisen (Abbildung 3-23).

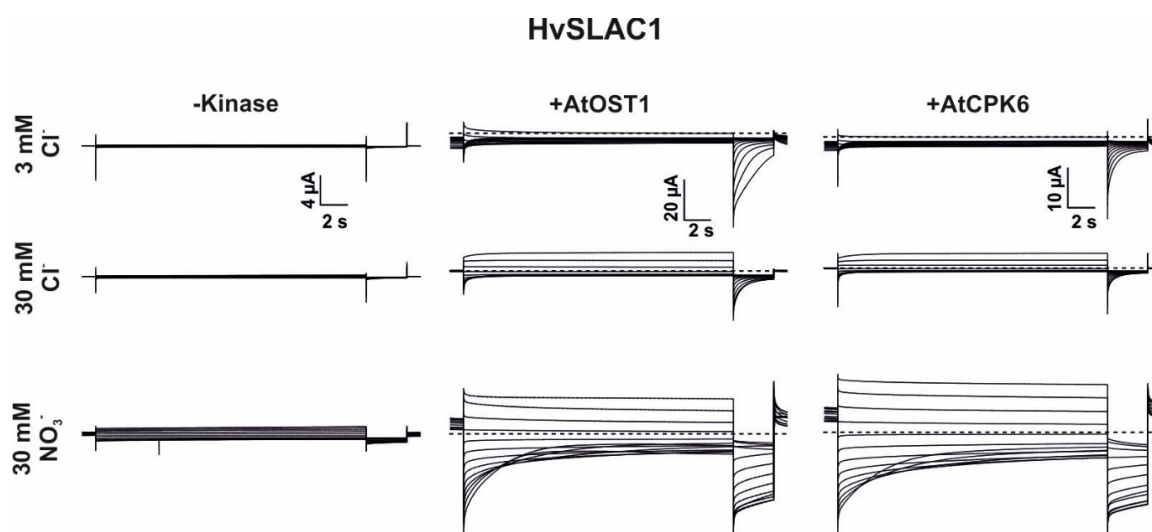


Abbildung 3-23: Der Anionenkanal HvSLAC1 benötigt für seine Aktivierung eine Kinase.

Repräsentative Ganzzellströme von HvSLAC1 und AtOST1 bzw. AtCPK6 koexprimierender Oozyten in Standardmesslösungen. Dargestellt sind die Ströme über die gesamte Oozytenmembran in Anwesenheit von 3 mM Chlorid, 30 mM Chlorid und 30 mM Nitrat unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls. Messungen mit HvSLAC1 und OST1 wurden mit den entsprechenden BiFC-Konstrukten (HvSLAC1::YFP^C und AtOST1::YFP^N) analog zu den Analysen mit PdSLAC1 durchgeführt.

In Anwesenheit von 30 mM Chlorid im Außenmedium konnten lediglich bei stark depolarisierender Membranspannung Ströme vernommen werden. Wurden die HvSLAC1-exprimierenden Oozyten jedoch mit einer Nitrat-basierten (30 mM) Lösung perfundiert, so konnte mit beiden ko-injizierten Kinasen S-Typ Anionenkanal charakteristische Anionenströme mit langsamen Deaktivierungskinetiken bei hyperpolarisierenden Spannungen aufgezeichnet werden (Abbildung 3-23).

Deshalb wurde der Anionenkanal der Gerste in den folgenden biophysikalischen Untersuchungen stets mit den Kinasen OST1 und CPK6 aus *A. thaliana* ko-exprimiert.

Dass der Anionenkanal aus *A. thaliana* auch in Nitrat-freien Medien makroskopische Anionenkanalströme in *Xenopus* Oozyten hervorruft, wenn er zusammen mit einer aktivierenden Kinase koexprimiert wird (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010), konnte bei einer vergleichenden elektrophysiologischen Untersuchung bestätigt werden (Abbildung 3-24).

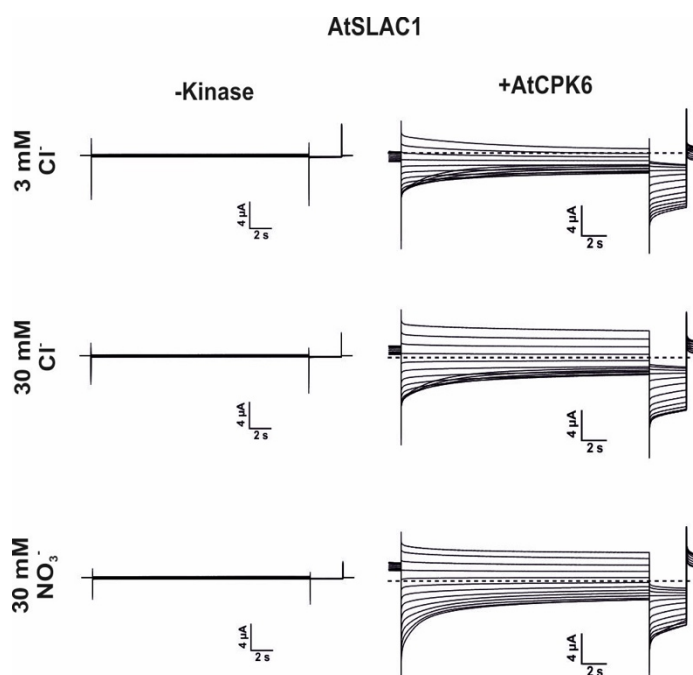
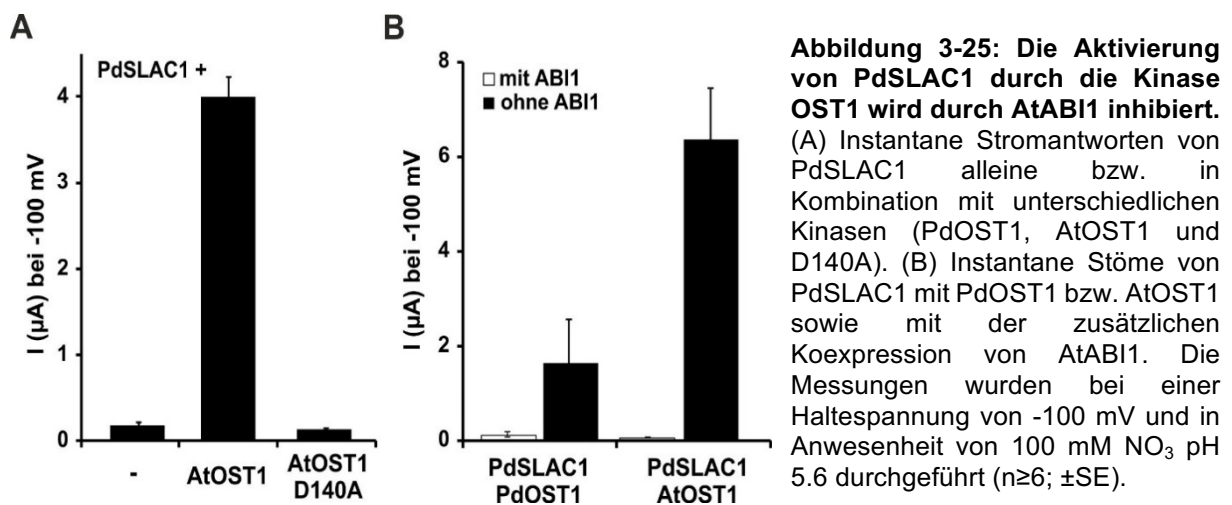


Abbildung 3-24: AtSLAC1 aktiviert unter Koexpression einer Kinase in Anwesenheit von Chlorid.

Repräsentative Ganzzellströme von AtSLAC1 exprimierten bzw. mit AtCPK6 koexprimierenden Oozyten in Standardmesslösungen. Dargestellt sind die Ströme über die gesamte Oozytenmembran in Anwesenheit von 3 mM Chlorid, 30 mM Chlorid und 30 mM Nitrat unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls.

Im Vergleich zu PdSLAC1 (Abbildung 3-22) und HvSLAC1 (Abbildung 3-23), führte die Koexpression von AtSLAC1 mit AtCPK6 bereits in Anwesenheit von Chlorid zu einer Kanalaktivierung mit charakteristischen S-Typ Anionenströmen (Abbildung 3-24).

In vergangenen Studien zu AtSLAC1 konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase ABI1 der PP2C-Familie in der Lage ist, die Aktivierung von SLAC1 sowohl durch AtCIPK23 als auch durch AtOST1 negativ zu regulieren (Geiger et al. 2010; Brandt et al. 2012; Scherzer et al. 2012; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014; Brandt et al. 2015). Aus diesem Grund wurde PdSLAC1 zusammen mit PdOST1, AtOST1 oder mit der Kinase-inaktiven Mutante von OST1 (D140A) koexprimiert, um herauszufinden, ob der Kanal aus der Dattelpalme auch über die Interaktion mit der Kinase AtOST1 aktiviert werden kann bzw. ob die Aktivierung durch die zusätzliche Expression der PP2C-Phosphatase AtABI1 aus inhibiert wird.



In Abwesenheit einer OST1 Kinase konnten keine signifikanten Anionenströme von PdSLAC1 vernommen werden (Abbildung 3-25). Auch die Koexpression der Kinase-inaktiven OST1 Mutante D140A resultierte in keiner nennenswerten Stromantwort (Abbildung 3-25 A). Dies weist darauf hin, dass eine Phosphorylierung von PdSLAC1 durch OST1 essenziell für die Aktivierung des Anionenkanals ist (Geiger et al. 2009). Oozyten, die PdSLAC1 mit AtOST1 oder PdOST1 koexprimierten, zeigten in Anwesenheit von 100 mM NO₃ deutliche Anionenströme. Obwohl die Kinase aus *Phoenix dactylifera* (PdOST1) als auch die aus *Arabidopsis thaliana* (AtOST1) in der Lage sind den Anionenkanal PdSLAC1 zu aktivieren, waren die Stromamplituden von PdSLAC1/PdOST1 Pärchen deutlich geringer (etwa -1,8 μA) als bei einer Koexpression von PdSLAC1 mit AtOST1 (etwa 6 μA) (Abbildung 3-25 B). Zur Überprüfung, ob auch der Dattelpalmen Anionenkanal unter der negativen Kontrolle von PP2C-Phosphatasen steht (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009), wurde PdSLAC1/ mit PdOST1 bzw. AtOST1 als auch ABI1 in Oozyten koexprimiert. Die Aktivität von SLAC1 wurde in der Anwesenheit dieser regulatorischen Komponenten mit der TEVC-Technik untersucht. Die zusätzliche Koexpression von AtABI1 verursachte eine nahezu vollständige Inhibierung der

PdSLAC1/OST1-vermittelten Anionenströme (Abbildung 3-25 B), ähnlich wie es bereits für AtSLAC1 gezeigt wurde (Geiger et al. 2009).

Mithilfe der erstellten BIFC-Konstrukte konnte auch die Interaktion zwischen HvSLAC1 und der verwendeten Kinase anhand der Fluoreszenz-Komplementation, sowie die funktionelle Aktivierung des Kanals der Gerste in Anwesenheit der unterschiedlichen regulatorischen Komponenten analysiert werden (Abbildung 3-26 A und B).

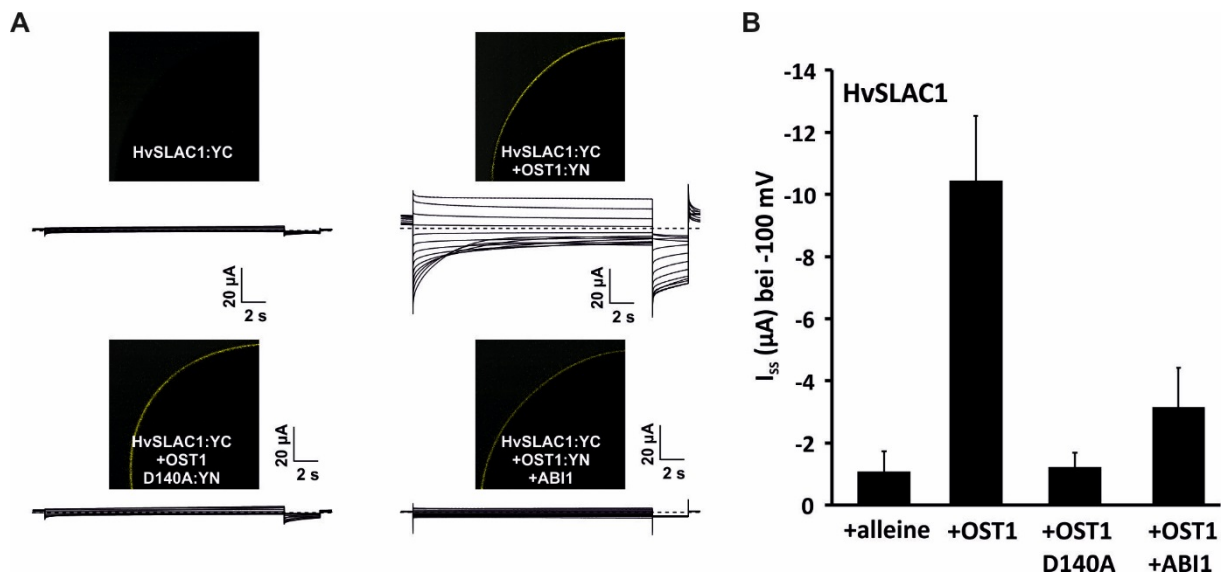


Abbildung 3-26: Die Aktivierung von HvSLAC1 durch die Kinase OST1 wird durch ABI1 inhibiert (A) Ganzzell-Stromableitungen von HvSLAC1 alleine bzw. in Kombination unterschiedlicher Kinasen (AtOST1 WT, AtOST1 D140A) in Anwesenheit von 30 mM Nitrat unter Verwendung folgender Split-YFP Konstrukte: HvSLAC1::YFP^C, HvSLAC1::YFP^C und AtOST1 WT::YFP^N bzw. AtOST1 D140A::YFP^N. Zusätzlich wurde auch die Koexpression von HvSLAC1::YFP^C und AtOST1 WT::YFP^N in Gegenwart von AtABI1 hin untersucht. Die physikalische Interaktion des Kanals mit AtOST1 WT bzw. AtOST1 D140A konnte anhand des YFP Fluoreszenzsignals bestätigt werden (gelb). (B) Gleichgewichtsströme von HvSLAC1 mit AtOST1 WT bzw. AtOST1 D140A sowie mit der zusätzlichen Koexpression von AtABI1 wurden in Oozyten gemessen. Die Messungen wurden bei einer Haltespannung von -100 mV und in Anwesenheit von 30 mM NO₃ pH 5.6 durchgeführt (n≥4; ±SD).

Anhand der verwendeten BIFC-Methode konnte gezeigt werden, dass OST1 ein potenzieller Interaktionspartner für HvSLAC1 darstellt. Die alleinige Expression von HvSLAC1::YFP^C führte zu keiner spezifischen YFP-Fluoreszenz. Jedoch konnte durch die zusätzliche Koexpression von HvSLAC1::YFP^C und AtOST1 WT::YFP^N/ AtOST1 D140A::YFP^N in *Xenopus* Oozyten eine erfolgreiche Komplementierung des YFP-Signals erreicht werden. Bei Betrachtung der Ganzzellströme der unterschiedlichen YFP-Koexpressionen in Anwesenheit von 30 mM Nitrat wird deutlich, dass nur die Koexpression von AtOST1 WT zu einer charakteristischen S-Typ Anionenstromantwort führte (Abbildung 3-26 A). Durch die weiteren vergleichenden Koexpressionsanalysen von HvSLAC1 mit AtOST1 WT oder der Kinase-inaktiven Mutante von OST1 (D140A) konnte gezeigt werden, dass der Kanal aus der Gerste über die Interaktion mit

der Kinase AtOST1 WT aber nicht durch AtOST1 D140A aktiviert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der Interaktion zwischen HvSLAC1 und OST1 auch eine Phosphorylierung für die Aktivierung des Anionenkanals nötig ist. Zudem wurde die Aktivierung von HvSLAC1 durch OST1 bei einer zusätzlichen Expression der PP2C-Phosphatase ABI1 nahezu vollständig inhibiert (Abbildung 3-26 B), wie bereits für PdSLAC1 demonstriert wurde (Abbildung 3-25).

3.2.4 Die Nitrat-abhängige Aktivierung von PdSLAC1/HvSLAC1

Für den Anionenkanal aus *A. thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Kanal auch in Nitrat-freien Medien makroskopische Anionenkanalströme in *Xenopus* Oozyten hervorruft, wenn er zusammen mit einer aktivierenden Kinase koexprimiert wird (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010) (Abbildung 3-24).

Im Gegensatz zu AtSLAC1 demonstrierten meine elektrophysiologischen Messungen im Fall von PdSLAC1 und HvSLAC1 jedoch, dass diese Anionenkanäle extrazelluläres Nitrat als Ligand für deren Aktivierung benötigen (Abbildung 3-22 A, Abbildung 3-23).

Ein ähnliches Verhalten konnte bereits für den SLAC1-Homologon Anionenkanal SLAH3 aus Arabidopsis gezeigt werden (Geiger et al. 2011).

Um den Einfluss von Nitrat im Detail zu analysieren, wurden zunächst Messungen mit PdSLAC1 und PdOST1 koexprimierenden Oozyten in unterschiedlichen Anionen-Zusammensetzungen durchgeführt.

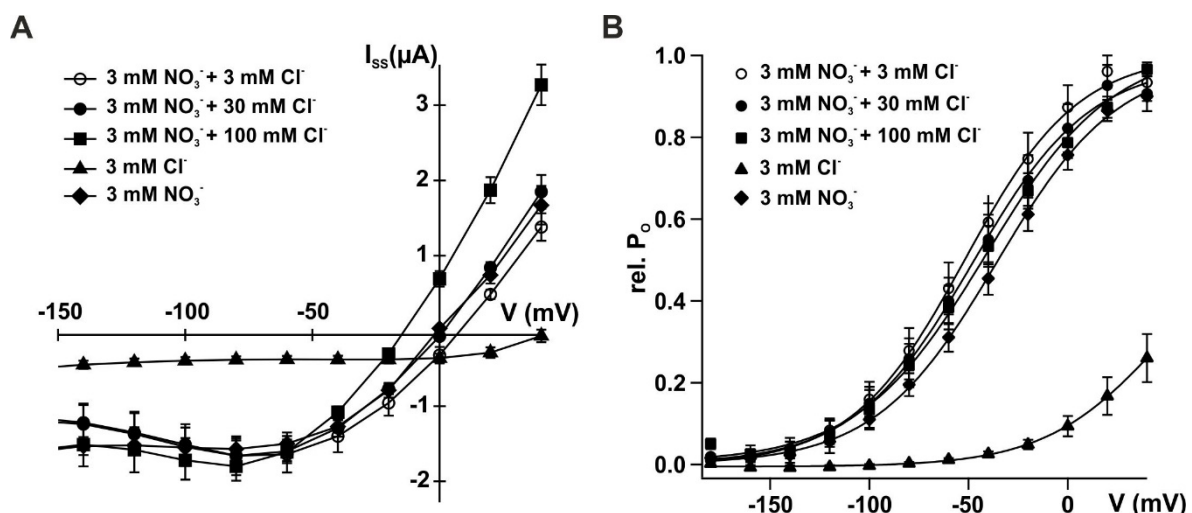


Abbildung 3-27: Chlorid-/Nitrat- und Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsströme und der relativen Offenwahrscheinlichkeit von PdSLAC1

(A) Die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von Oozyten, welche PdSLAC1 mit OST1 koexprimierten, wurden in variierenden Messlösungen (siehe Legende in den Graphen) aufgezeichnet und gegen die Spannung aufgetragen. (B) Die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) des durch OST1 aktivierten Anionenkanals PdSLAC1 wurde unter den gleichen Lösungsbedingungen bestimmt, unter denen die

Experimente in (A) durchgeführt wurden. Die rel. P_o wurde aus den instantanen Folgepulsströmen (I_{tail}) bei -120 mV abgelesen (vgl. Abbildung 2-4) und konnte mithilfe einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden ($n \geq 5$; $\pm SE$).

Anhand der Stromspannungskennlinie von PdSLAC1 und PdOST1 (Abbildung 3-27 A) wird deutlich, dass die Stromantworten in Anwesenheit von 3 mM Chlorid im externen Medium kaum wahrnehmbar waren. Im Gegensatz dazu resultierten Messungen in Anwesenheit von 3 mM Nitrat in typischen SLAC1-vermittelten S-Typ Anionenströmen. Die Anwesenheit von 3 mM NO_3^- mit zusätzlich aufsteigender Chlorid-Konzentration (3, 30 und 100 mM Cl^-) im externen Medium verschob das Umkehrpotenzial (U_{rev}) zu negativeren Spannungen, im Vergleich zu Messungen in Lösungen, welche entweder nur 3 mM Cl^- , oder 3 mM NO_3^- enthielten. Die Analyse der rel. Offenwahrscheinlichkeit (P_o) von PdSLAC1 verdeutlicht, dass das spannungsabhängige Öffnen des Kanals lediglich durch die Gabe von Nitrat, aber nicht durch eine Steigerung der Chloridkonzentration im Badmedium beeinflusst ist. Nur Nitrat vermag die Spannungsabhängigkeit von PdSLAC1 in den physiologischen (stark hyperpolarisierten) Spannungsbereich von pflanzlichen Zellen zu verschieben und so den Kanal zu aktivieren (Abbildung 3-27 B).

Obwohl nur in Anwesenheit von Nitrat makroskopische Anionenströme zu verzeichnen sind, spricht die Verschiebung des U_{rev} zu negativeren Spannungen mit ansteigender Chloridkonzentration in Anwesenheit von 3 mM Nitrat für eine Chloridpermeabilität von PdSLAC1 (Abbildung 3-27 A). Nitrat ist also neben einem permeierenden Anion auch ein Ligand, der den Kanal aktiviert, so dass auch Chlorid permeieren kann. Im Gegensatz dazu ist AtSLAC1 bereits in Abwesenheit von Chlorid und Nitrat aktiv. Seine Offenwahrscheinlichkeit wird nur leicht durch die Zugabe von Chlorid oder Nitrat zu negativen Membranpotenzialen verschoben (Geiger et al. 2009; Geiger et al. 2010). Um den Einfluss von Nitrat auf PdSLAC1 im Detail zu verstehen, wurde in den folgenden Experimenten die rel. P_o in Abhängigkeit von der externen Nitratkonzentration bestimmt.

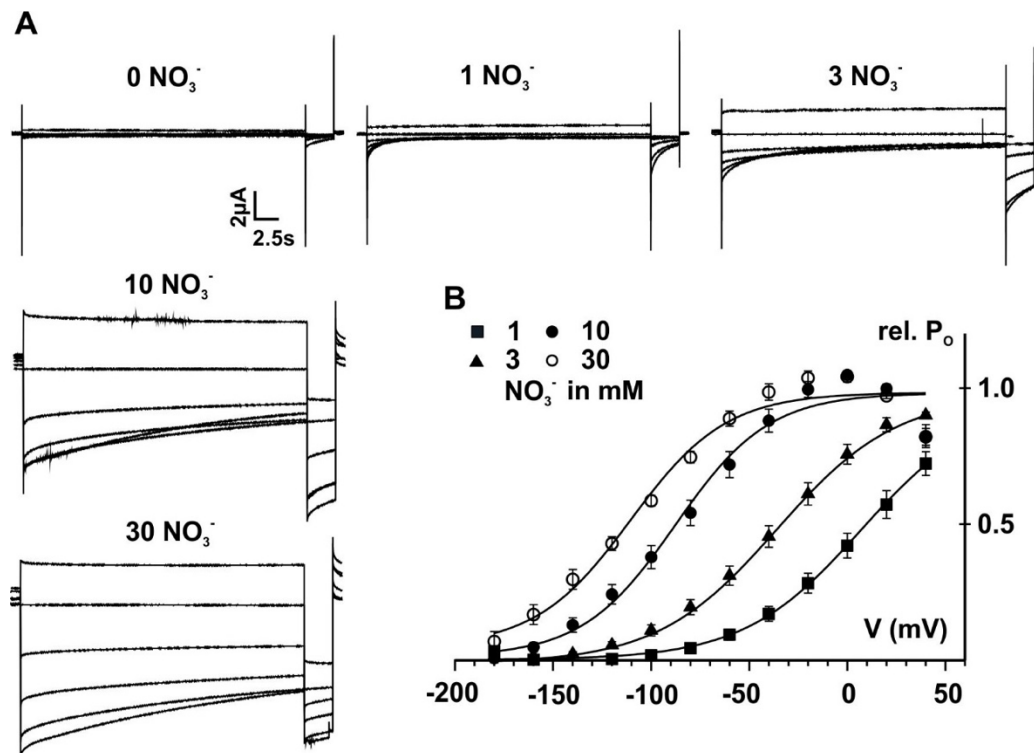


Abbildung 3-28: Eine Nitraterhöhung verstärkt die Kanalaktivität von PdSLAC1 durch die Verschiebung seiner Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Membranspannungen

(A) Ganzzellströme von PdSLAC1 und PdOST1 koexprimierenden Oozyten in Standardmesslösungen mit unterschiedlichen externen Nitratkonzentrationen (1, 3, 10 und 30 mM NO₃⁻) unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls (vgl. Abbildung 2-4) sowie einem Haltepotenzial von 0 mV. (B) Die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P₀) des durch PdOST1 aktivierten Anionenkanals PdSLAC1 wurde unter den gleichen Lösungsbedingungen bestimmt, unter denen die Experimente in (A) durchgeführt wurden. Die rel. P₀ wurde aus den instantanen Folgepulsströmen (I_{tail}) bei -120 mV abgelesen (vgl. Abbildung 2-4) und konnte mithilfe einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden (n≥9; ±SE).

Ganzzellstromableitungen verdeutlichen, dass mit ansteigender Nitratkonzentration und zunehmender negativer Membranspannung eine Aktivierung der SLAC1-vermittelten Anionenströme zu verzeichnen war. Eine Erhöhung der externen Nitratkonzentration resultierte in einem deutlichen Anionenefflux bei hyperpolarisierenden Membranspannungen (Abbildung 3-28 A).

Diese Beobachtung konnte anhand der Bestimmung der rel. P₀ von PdSLAC1 bestätigt werden (Abbildung 3-28 B): Mit ansteigender Nitratkonzentration im Perfusionsmedium verschob sich der rel. P₀ zu immer negativeren Membranspannungen (Tabelle 3-2).

	1 mM NO ₃	3 mM NO ₃	10 mM NO ₃	30 mM NO ₃
V _{1/2}	10.9 ±6.7 mV	-36.1 ±5.9 mV	-89.1 ±5.0 mV	-116 ±4.6 mV

Tabelle 3-2: Bestimmung der halbmaximalen relativen Offenwahrscheinlichkeit (V_{1/2}) bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen

Auflistung der V_{1/2}-Werte, welche über die Bestimmung der rel. P₀ aus Abbildung 3-28 B bei unterschiedlichen externen Nitratkonzentrationen (1, 3, 10, 30 mM) gewonnen werden konnten.

Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass der Kanal eine Nitrat-abhängige Spannungsabhängigkeit aufweist, wodurch Nitrat nicht nur den Kanal aktiviert, sondern dessen Aktivität konzentrationsabhängig auch weiter verstärken kann. Somit dient Nitrat als aktivierender Ligand für die Kanalaktivität von PdSLAC1 und sorgt für eine verstärkte Leitfähigkeit nicht nur für Nitrat selbst, sondern auch für Chlorid.

Wie PdSLAC1, vermittelte auch HvSLAC1 makroskopische Anionenströme nur in Anwesenheit von Nitrat (Abbildung 3-22 A, Abbildung 3-23).

Um nun den Einfluss von Nitrat auf den Anionenkanal HvSLAC1 zu quantifizieren, wurde auch der Kanal aus der Gerste unter Koexpression mit der Ca^{2+} -abhängigen Kinase AtCPK6 in Anwesenheit unterschiedlicher Nitrat bzw. Chloridkonzentration detailliert analysiert.

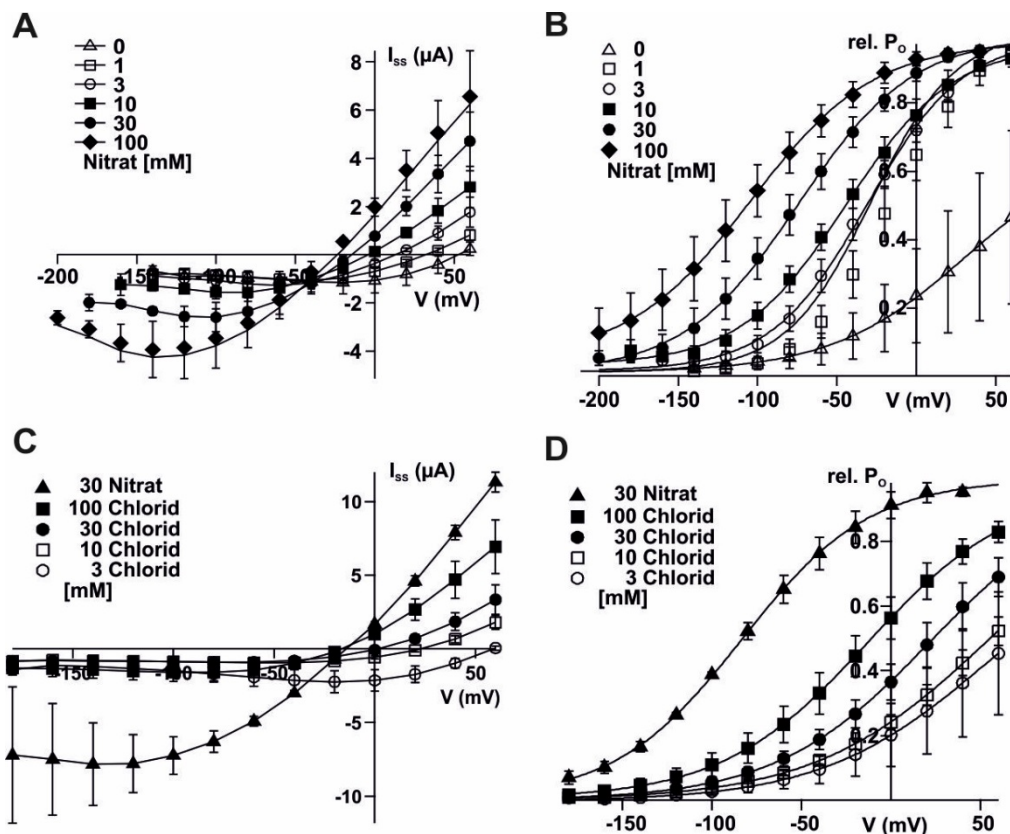


Abbildung 3-29: Nitrat-/Chlorid- und Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsströme und der relativen Offenwahrscheinlichkeit von HvSLAC1

(A und C) Die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von Oozyten, welche HvSLAC1 mit CPK6 koexprimierten, wurden in definierten externen Nitrat-/Chloridkonzentrationen (siehe Legende in der Abbildung) unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls (vgl. Abbildung 2-4) aufgezeichnet und gegen die Membranspannung aufgetragen. (B und D) Die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) des Anionenkanals HvSLAC1 wurde unter den gleichen Lösungsbedingungen bestimmt, unter denen die Experimente in A bzw. C durchgeführt wurden. Die rel. P_o wurde aus den instantanen Folgepulsströmen (I_{tail}) bei -120 mV abgelesen (vgl. Abbildung 2-4) und konnte mithilfe einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden ($n \geq 4$; $\pm SD$).

Anhand der Stromspannungskennlinie von HvSLAC1 und AtCPK6 (Abbildung 3-29 A) wird deutlich, dass mit ansteigender externer Nitratkonzentration sowie zunehmend negativerer Membranspannung eine zunehmende Aktivierung der HvSLAC1-vermittelten Anionenströme erreicht werden konnte. Eine stetige Erhöhung der Nitratlösung resultierte somit, im Fall von HvSLAC1, ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der Anionenausströme, welche mit hyperpolarisierter Spannung zunahm (Abbildung 3-29 A). Zudem konnte durch die aufsteigende Nitratkonzentration bei Oozyten, welche HvSLAC1 mit CPK6 koexprimierten, eine Verschiebung des Umkehrpotenzials (U_{rev}) zu negativeren Spannungen beobachtet werden (Abbildung 3-29 A).

Diese Beobachtung konnte anhand der Bestimmung der rel. P_o von HvSLAC1 in Abhängigkeit von der Membranspannung mit ansteigendem Nitratgehalt bestätigt werden (Abbildung 3-29 B). Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass der Kanal eine Nitrat-abhängige Spannungsabhängigkeit aufweist, wodurch Nitrat nicht nur den Kanal aktiviert und permeiert, sondern dessen Aktivität auch weiter konzentrationsabhängig verstärken kann.

Um schließlich auch den Einfluss von Chlorid auf die Kanalaktivität von HvSLAC1 zu überprüfen, wurden die Experimente in Anwesenheit unterschiedlicher Chloridkonzentrationen durchgeführt und die rel. P_o von HvSLAC1 bestimmt (Abbildung 3-29 C und D). Die in Abbildung 3-29 C dargestellte Stromspannungskennlinie von HvSLAC1 zeigt, dass unabhängig von der externen Chloridkonzentration im physiologischen Membranpotenzialbereich (bei negativeren Spannungen von -100 mV) keine nennenswerten Anionenausströme zu verzeichnen waren. Anhand des direkten Vergleichs der rel. P_o von HvSLAC1 (Abbildung 3-29 B und D) in Abhängigkeit der beiden Anionen wird deutlich, dass die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bereits bei einer Membranspannung von etwa -20 mV erreicht wird und dass diese durch die Chloridkonzentration nicht maßgeblich beeinflusst wird (Abbildung 3-29 D). Im Gegensatz dazu konnte mit steigender Nitratkonzentration eine Verschiebung der rel. Offenwahrscheinlichkeit zu stärker hyperpolarisierenden Membranspannung verzeichnet werden. In Anwesenheit von 100 mM Nitrat wurde beispielsweise die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit von HvSLAC1-koexprimierten Oozyten auf eine Membranspannung von -120 mV verschoben (Abbildung 3-29 B).

Um den Einfluss von Nitrat von HvSLAC1 weiter im Detail zu analysieren, wurden zusätzlich elektrophysiologische Messungen mit HvSLAC1 und AtCPK6 koexprimierender Oozyten durchgeführt, wobei die Anionenströme in Anwesenheit unterschiedlicher Nitrat-/Chlorid-Konzentrationsverhältnisse aufgezeichnet, sowie die daraus resultierende rel. Offenheitswahrscheinlichkeit bestimmt wurde (Abbildung 3-30 A und B).

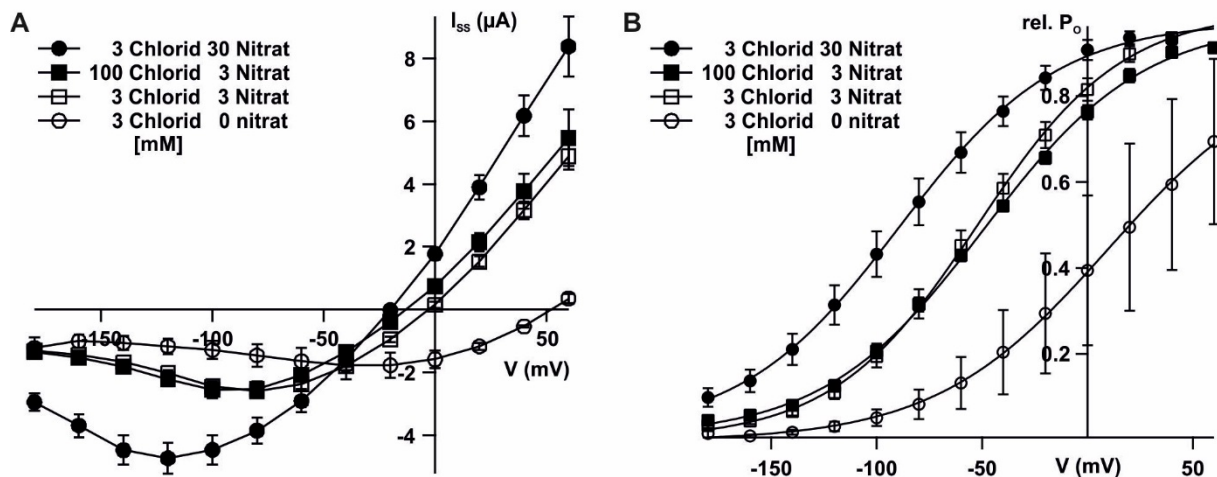


Abbildung 3-30: Der Einfluss von externem Chlorid auf die Gleichgewichtsströme und die relative Offenwahrscheinlichkeit von HvSLAC1

(A) Die Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von Oozyten, welche SLAC1 mit OST1 koexprimierten, wurden in variierenden Messlösungen aufgezeichnet und gegen die Spannung aufgetragen ($n \geq 4$; $\pm SD$). (B) Die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) des durch CPK6 aktivierten Anionenkanals HvSLAC1 wurde unter den gleichen Lösungsbedingungen bestimmt, unter denen die Experimente in A durchgeführt wurden. Der rel. P_o wurde aus den instantanen Folgepulsströmen (I_{tail}) bei -120 mV abgelesen (vgl. Abbildung 2-4) und konnte mithilfe einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden ($n \geq 4$; $\pm SD$).

Bei Betrachtung der Gleichgewichtsströme von HvSLAC1 und CPK6 koexprimierender Oozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Nitrat-/Chlorid-Verhältnisse konnte gezeigt werden, dass die Stromantworten in Anwesenheit von 3 mM Chlorid im externen Medium sehr gering waren und das Umkehrpotenzial bereits bei einer Membranspannung von $+50$ mV erreicht wurde. Sobald die Oozyten jedoch zusätzlich mit 3 mM Nitrat und 3 mM Chloridlösung perfundiert wurden, so wurde eine signifikante Verstärkung der Gleichgewichtsströme festgestellt. Zusätzlich konnte durch die gleichzeitige Applikation von 3 mM Nitrat eine Verschiebung des Umkehrpotenzials von $+50$ mV auf 0 mV detektiert werden (Abbildung 3-30 A). Bei einer weiteren Erhöhung der Chloridkonzentration auf 100 mM, bei gleichbleibender Nitratkonzentration (3 mM), konnte zwar eine weitere Verschiebung des Umkehrpotenzials zu negativeren Spannungen beobachtet werden, jedoch war weder eine weitere Zunahme der Anionenausströme noch eine Veränderung der rel. P_o zu verzeichnen (Abbildung 3-30 A und B).

Die Ergebnisse, die über den Anionenkanal HvSLAC1 gewonnen werden konnten, weisen, wie auch im Fall von PdSLAC1 aus der Dattelpalme, darauf hin, dass der Gerstenkanal für Chlorid permeabel ist, jedoch eine Voraktivierung des Kanals durch Nitrat benötigt.

3.2.5 Nitratabhängigkeit, ein Charakteristikum von monokotyledonen SLAC1 Anionenkanälen?

Das Phänomen der Nitrat-abhängigen Aktivierung ist bereits von den SLAC1 Homologen SLAH2 und 3 in *A. thaliana* bekannt (Maierhofer, Lind, et al. 2014). Dass auch SLAC1-Typ Anionenkanäle der Dattelpalme und der Gerste den Liganden Nitrat zur Aktivierung benötigen, ist dagegen neu. Bisherige Studien an SLAC1-Typ Kanälen aus Grünalgen, Lykophyten, Moose und Farne zeigten keine Hinweise auf eine Nitrat-abhängige Aktivierung (McAdam and Brodribb 2014; Lind et al. 2015). Deshalb drängt sich die Frage auf, ob diese Nitratabhängigkeit von SLAC1 Kanälen während der Entwicklung der monokotyledonen Pflanzen wie der Dattelpalme und der Gerste aufgekommen ist. Zur Klärung dieser Frage habe ich weitere dikotyledone und monokotyledone SLAC1-Typ Anionenkanäle kloniert und auf ihre Nitratabhängigkeit getestet (Abbildung 3-31). Die dikotyledonen Anionenkanäle der Nachtschattengewächse (SISLAC1 aus der Tomate, NtSLAC1 aus dem Tabak) und der Kreuzblütler (AtSLAC1 aus Arabidopsis) wurden dabei den monokotyledonen Vertretern aus Gerste, Reis und Dattelpalme gegenübergestellt. Die relative Leitfähigkeit (chord conductance) wurde bei einer Spannung von -120 mV ermittelt, wobei die Leitfähigkeit für Nitrat auf 1 gesetzt wurde.

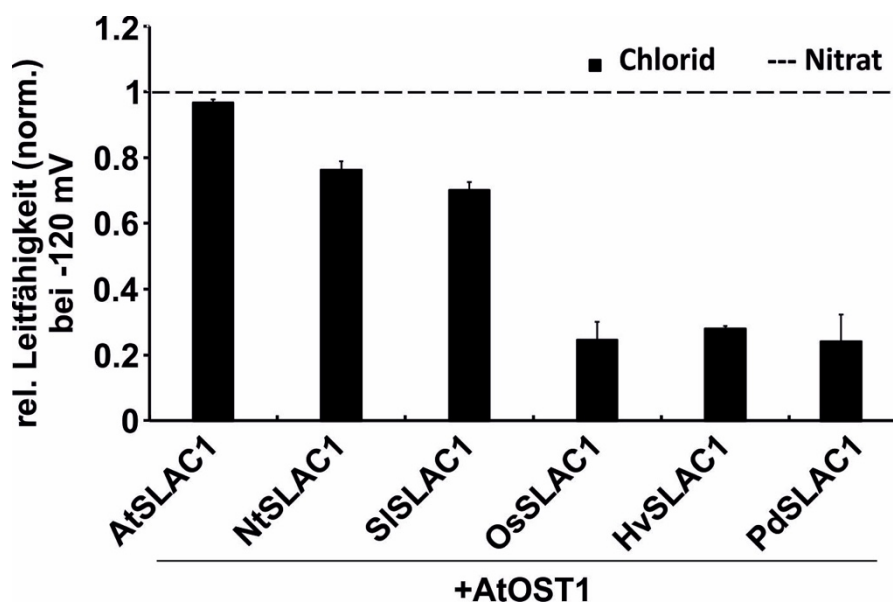


Abbildung 3-31: Vergleichende Analysen der rel. Leitfähigkeit unterschiedlicher Pflanzenarten in Chlorid-/Nitrat-Lösung

Die relative Leitfähigkeit (chord conductance) von Oozyten, welche SLAC1s unterschiedlicher Pflanzenspezies (At: *A. thaliana*; Nt: *N. tabacum*; Sl: *S. lycopersicum*; Os: *O. sativa* sowie Hv: *H. vulgare*, Pd: *P. dactylifera*) mit AtOST1 koexprimierten, wurde in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bzw. Nitrat vermessen und bei einer Spannung von -120 mV verglichen. Die ermittelte Leitfähigkeit in Anwesenheit von Nitrat wurde hier auf den Wert 1 festgelegt (gestrichelte Linie) ($n \geq 4$; $\pm SD$). Die Messung wurde von Herrn Dr. Tobias Maierhofer durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Interessanterweise, war die chord conductance für dikotyle SLAC1 Vertreter erheblich höher als für die monokotyledonen Vertreter, was darauf hindeutet, dass es sich bei der Nitrataktivierung tatsächlich um eine Monokotyledonen-spezifische elektrische Eigenschaft handelt (Abbildung 3-31).

3.2.6 Monokotyledone SLAC1s verfügen über ein spezielles IA-Motiv in TMD3

Vergleichende Struktur-Funktionsuntersuchungen an AtSLAC1 und AtSLAH2 weisen auf eine spezielle Aminosäure in der Transmembrandomäne 3 hin (S228 in SLAH2 bzw. V273 in SLAC1), die einen starken Einfluss auf das Öffnungsverhalten und die Selektivität von SLAC/SLAH-Anionenkanäle hat (Chen et al. 2010; Maierhofer, Lind, et al. 2014). Sequenzvergleiche der transmembranen Domäne 3 (TMD3) von SLAC1-Orthologen Anionenkanälen unterschiedlicher mono- und dikotyledoner Pflanzenarten (Abbildung 3-32) zeigen, dass alle Monokotyledonen ein Isoleucin und ein Alanin (IA-Motiv) in der Mitte der TMD3 tragen, während die Dikotyledonen ein Valin-Valin Pärchen (VV-Motiv) aufweisen (roter Kasten). Mit Ausnahme der beiden zur Analyse herangezogenen Nachtschattengewächse der zweikeimblättrigen Pflanzen, welche ein IV-Motiv an besagter Position tragen (Abbildung 3-32).

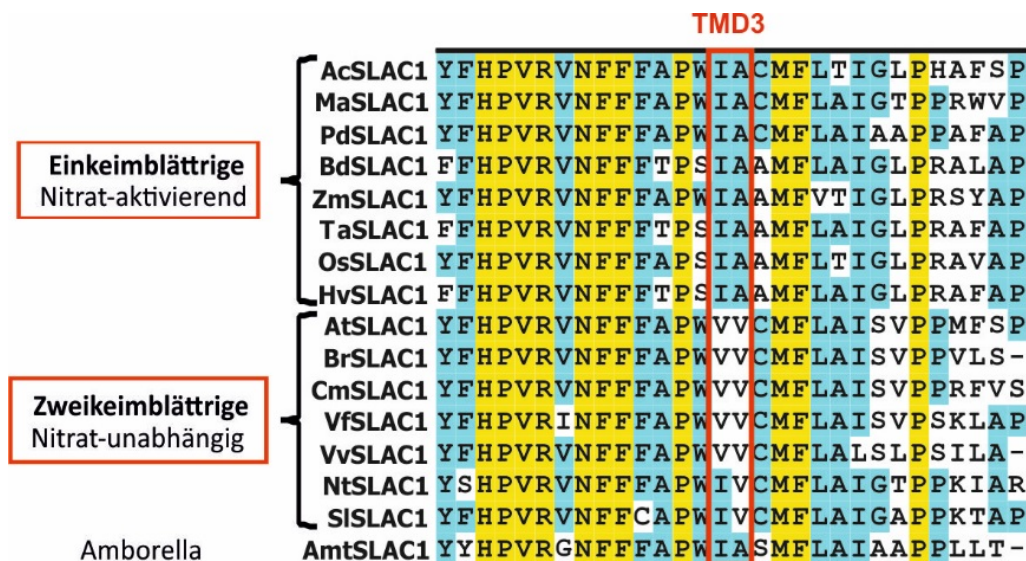


Abbildung 3-32: AS-Sequenzvergleiche von SLAC1s verschiedener ein- und zweikeimblättrigen Pflanzenarten

Vergleichende AS-Sequenzanalyse der Transmembrandomäne 3 unterschiedlicher ein- und zweikeimblättriger S-Typ Anionenkanäle. Der prägnanteste Unterschied innerhalb der TMD3 wurde rot umrandet. Während AtSLAC1 an Position 272 und 273 wie auch die meisten anderen dikotyletonen SLAC1 Anionenkanäle ein VV-Pärchen trägt, weisen alle Monokotyledonen ein IA-Motiv an der zugehörigen Stelle auf. Amborella ist eine der ersten Blütenpflanzen, die evolutionär vor der Aufspaltung in ein- und zweikeimblättrige Pflanzen steht. Amborella trägt eine IA-Signatur wie die Monokotyledonen. *A. comosus* (Ac), *M. acuminata* (Ma), *P. dactylifera* (Pd), *B. distachyon* (Bd), *Z. mays* (Zm), *T. aestivum* (Ta), *O. sativa* (Os), *H. vulgare* (Hv), *A. thaliana* (At), *B. rapa* (Br), *C. melo* (Cm), *V. faba* (Vf), *V. vinifera* (Vv), *N. tabacum* (Nt), *S. lycopersicum* (Sl), *A. trichopoda* (Amt).

Aufgrund dessen, dass sich die Monokotyledonen anhand der AS-Sequenz der TMD3 deutlich von den Dikotyledonen unterscheiden ließen, liegt die Vermutung nahe, dass dieses spezielle IA-Motiv, welches bei allen untersuchten Monokotyledonen auftrat, eventuell für die Eigenschaft der Nitratsensitivität verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wurde zum einen eine Doppelmutante von AtSLAC1, welche an Position 272/273 statt eines dikotspezifischen VV-Motivs ein monokotspezifisches IA-Motiv trägt, erstellt. Zum anderen wurden Doppelmutanten von HvSLAC1 und PdSLAC1 erstellt, welche statt ihres IA-Motivs, ein VV-Pärchen an der zugehörigen Position tragen (Abbildung 3-32). Anschließend wurde die rel. Leitfähigkeit der entsprechenden Mutanten sowie der dazugehörigen Wildtypen in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bzw. Nitrat bei einer Spannung von -120 mV bestimmt (Abbildung 3-33).

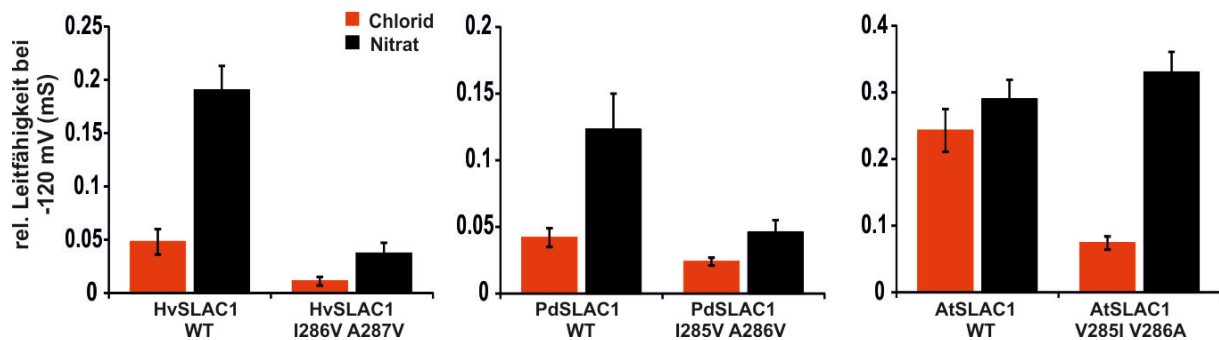


Abbildung 3-33: Ermittlung der rel. Leitfähigkeit aus vergleichenden Mutagenesestudien von AtSLAC1 gegenüber HvSLAC1 und PdSLAC1

Darstellung der rel. Leitfähigkeit (chord conductance) von Oozyten, welche SLAC1s unterschiedlicher Pflanzenspezies (At: *A. thaliana*; Pd: *P. dactylifera* sowie Hv: *H. vulgare*) mit AtCPK6 koexprimierten, wurden in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bzw. Nitrat vermessen und bei einer Spannung von -120 mV verglichen ($n \geq 8$; \pm SD).

In Abbildung 3-33 ist die rel. Leitfähigkeit (chord conductance) von Oozyten bei einer Membranspannung von -120 mV dargestellt, die die entsprechenden SLAC1 WTs bzw. Doppelmutanten mit AtCPK6 koexprimierten. Bei dem Vergleich der Wildtyp SLAC1 Kanäle ist erneut deutlich zu erkennen, dass AtSLAC1 (WT) Nitrat-unabhängig aktiv ist, während PdSLAC1 und HvSLAC1 lediglich Nitrat-induzierte Anionenströme vermitteln. Interessanterweise wies die Mutante AtSLAC1 V272I V273A, die mit dem Monokotyledonen-spezifischen IA-Motiv ausgestattet war, auch eine Nitrat-abhängige Aktivierung auf. Das IA-Motiv in TMD3 ist also ausreichend, um den Nitrat-unabhängigen AtSLAC1 WT Kanal in einen Nitrat-abhängigen Kanal zu verwandeln. Dagegen konnte bei den beiden Mutanten der Monokotyledonen SLAC1 Kanäle (HvSLAC1 I286V A287V und PdSLAC1 I285V A286V) kein Verlust der Nitrat-induzierten Ströme im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abbildung 3-

33). Vielmehr muss man bei diesen Mutanten von unfunktionellen oder nur schwach funktionellen SLAC1 Mutanten ausgehen (Abbildung 3-33).

Somit konnte bestätigt werden, dass das monokotspezifische IA-Motiv, welches bei allen untersuchten Monokotyledonen auftrat, ausreichend ist, um einen Nitrat-insensitiven Kanal wie AtSLAC1 in einen Nitrat-aktivierten Kanal zu verwandeln. Wie allerdings die Nitrat-insensitivität von AtSLAC1 auf die monokotyledonen Anionenkanäle übertragen werden kann, bleibt aufgrund der Infunktionalität der entsprechenden Doppelmutanten von PdSLAC1 und HvSLAC1 noch zu klären.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, verfolgte mein Kollege Morten Egevan Jörgensen einen phylogenetischen Ansatz. Er führte eine evolutionäre Kopplungsanalyse mit allen verfügbaren SLAC1 Sequenzen unter Verwendung des online Analysetools „evold“ durch (<http://evfold.org/evfold-web/evfold.do>). Dieses Tool identifiziert Aminosäurereste, die mit der VV- bzw. der IA-Signatur coevolvierten. Die 50 Aminosäuren mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Coevolution mit der fraglichen Signatur wurden im SLAC1 Model in (Abbildung 3-34).

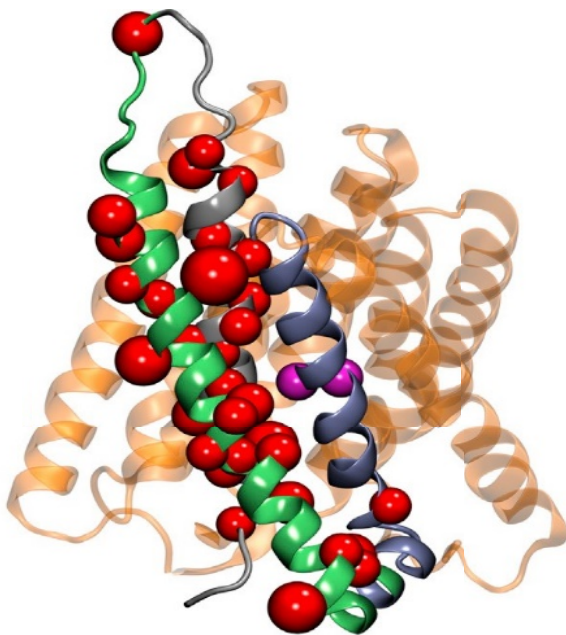


Abbildung 3-34: evolutionäre Kopplungsanalyse

Dargestellt sind die 50 AS-Reste (rot) mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Coevolution zu AtSLAC1 V272 und V273 (violett), welche alle in den Transmembranen (TMD) 1-3 lokalisiert sind. Transmembrane 1 (hellgrau), Transmembrane 2 (grün), Transmembrane 3 (dunkelgrau), restliche Transmembrane (hellorange). Die evolutionäre Kopplungsanalyse erfolgte unter Verwendung des online Analysetools „evold“ (<http://evfold.org/evfold-web/evfold.do>).

Interessanterweise sind diese 50 Aminosäurereste alle in den TMDs 1-3 lokalisiert. Dieses Ergebnis der evolutionären Kopplungsanalyse deutet darauf hin, dass möglicherweise neben dem VV-Motiv in TMD3 weitere Aminosäurereste in den TMDs 1-3 notwendig sind, um einen Nitrat-aktivierten monokotyledonen SLAC1 Anionenkanal in einen Nitrat-unabhängigen dikotyledonen SLAC1 zu verwandeln. Deshalb habe ich im Folgenden Chimären aus PdSLAC1/HvSLAC1 auf der einen Seite und AtSLAC1 auf der anderen Seite hergestellt. Dazu wurden entweder nur die Transmembrane 1 und 2 oder die Transmembrane 1, 2 und 3

zwischen AtSLAC1 und HvSLAC1 bzw. PdSLAC1 getauscht. Die erstellten Chimären wurden demnach folgendermaßen benannt: AtSLAC1 (HvTMD1-2) bzw. AtSLAC1 (PdTMD1-2), bei dieser Chimäre wurde bei AtSLAC1 die Transmembrane 1 und 2 aus HvSLAC1 bzw. aus PdSLAC1 inseriert; AtSLAC1 (HvTMD1-3) bzw. AtSLAC1 (PdTMD1-3), bei dieser Chimäre hingegen wurde bei AtSLAC1 die Transmembrane 1, 2 und 3 aus HvSLAC1 bzw. aus PdSLAC1 eingefügt. Zusätzlich wurden auf dieselbe Weise Chimären mit HvSLAC1 bzw. PdSLAC1 erzeugt, bei denen die TMD1-2 sowie TMD1-3 aus AtSLAC1 eingefügt wurden (Abbildung 3-35, Abbildung 3-36).



Abbildung 3-35: Schematische Darstellung der SLAC1-Kanalstrukturen von den verwendeten Chimären

Vereinfachte Strukturdarstellung der SLAC1 WTs aus *A. thaliana*, *P. dactylifera*, *H. vulgare* (AtSLAC1 in hellgrau, PdSLAC1 in grün und HvSLAC1 in orange hervorgehoben) sowie der daraus erstellten Chimären, bei welchen entweder TMD 1-2 oder TMD 1-3 zwischen AtSLAC1 und HvSLAC1 bzw. PdSLAC1 getauscht wurden und umgekehrt.

Anschließend wurde die rel. Leitfähigkeit der entsprechenden Chimären sowie der dazugehörigen Wildtypen, unter Koexpression von AtCPK6, in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bzw. Nitrat bei einer Spannung von -120 mV bestimmt (Abbildung 3-36).

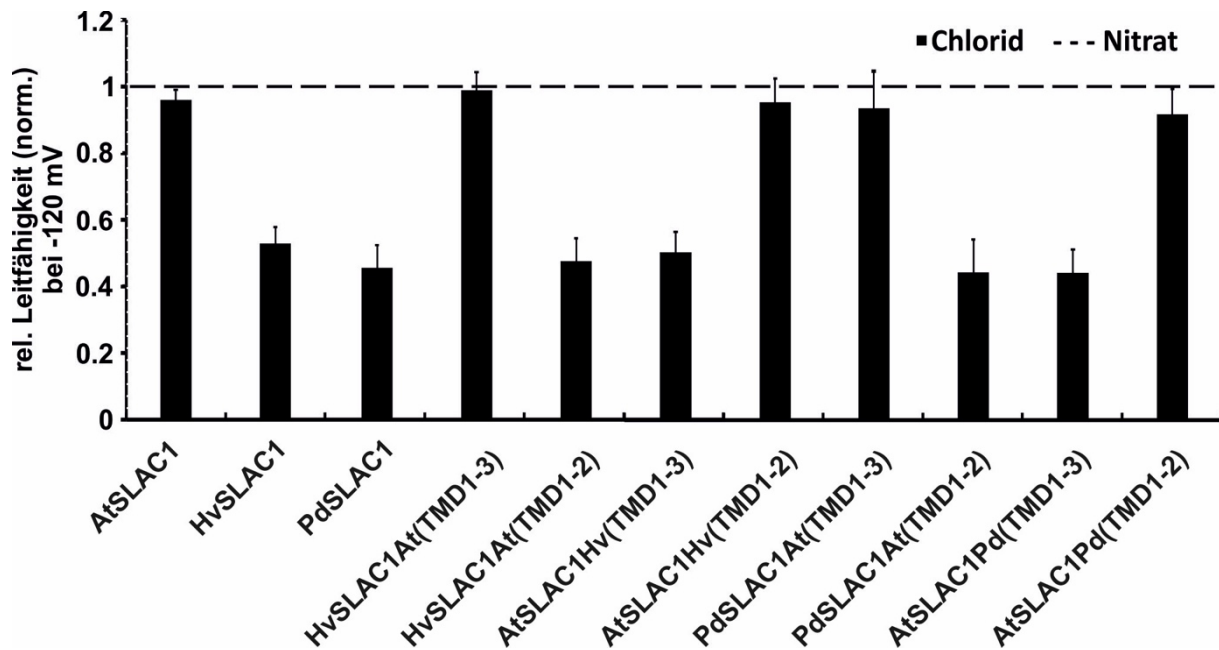


Abbildung 3-36: Vergleichende Analyse der rel. Leitfähigkeit von AtSLAC1, HvSLAC1, PdSLAC1 und deren Chimären

Darstellung der rel. Leitfähigkeit (chord conductance) von Oozyten, welche AtSLAC1, HvSLAC1, PdSLAC1 sowie von den entsprechenden Chimären, welche mit AtCPK6 koexprimierten, wurden in Anwesenheit von 100 mM Chlorid bzw. Nitrat vermessen und bei einer Spannung von -120 mV verglichen. Die ermittelte Leitfähigkeit in Anwesenheit von Nitrat wurde hier auf den Wert 1 festgelegt ($n \geq 6$; \pm SD).

Bei dem Vergleich der Wildtyp SLAC1 Kanäle mit den dazugehörigen Chimären, bei welchen lediglich TMD1-2 ausgetauscht wurden, konnte kein wesentlicher Unterschied in der rel. Leitfähigkeit verzeichnet werden. Wurden hingegen TMD1-3 ausgetauscht, so konnte die Nitratabhängigkeit von HvSLAC1/PdLAC1 WT auf AtSLAC1 übertragen werden, während HvSLAC1 bzw. PdSLAC1 seine Nitratabhängigkeit verlor, sobald der Kanal mit den TMD 1-3 aus Arabidopsis ausgestattet wurden.

Um die Vermutung weiter zu bestärken, dass neben dem VV-Motiv in TMD3 evtl. weitere Aminosäurereste in den TMDs 1-3 notwendig sind, um einen Nitrat-aktivierten monokotyledonen SLAC1 Anionenkanal in einen Nitrat-unabhängigen dikotyledonen SLAC1 zu verwandeln, wurden im Folgenden zusätzlich die rel. Offenwahrscheinlichkeit der Wildtypen und der Chimären, bei denen die TMD 1-3 ausgetauscht wurden, bestimmt (Abbildung 3-37).

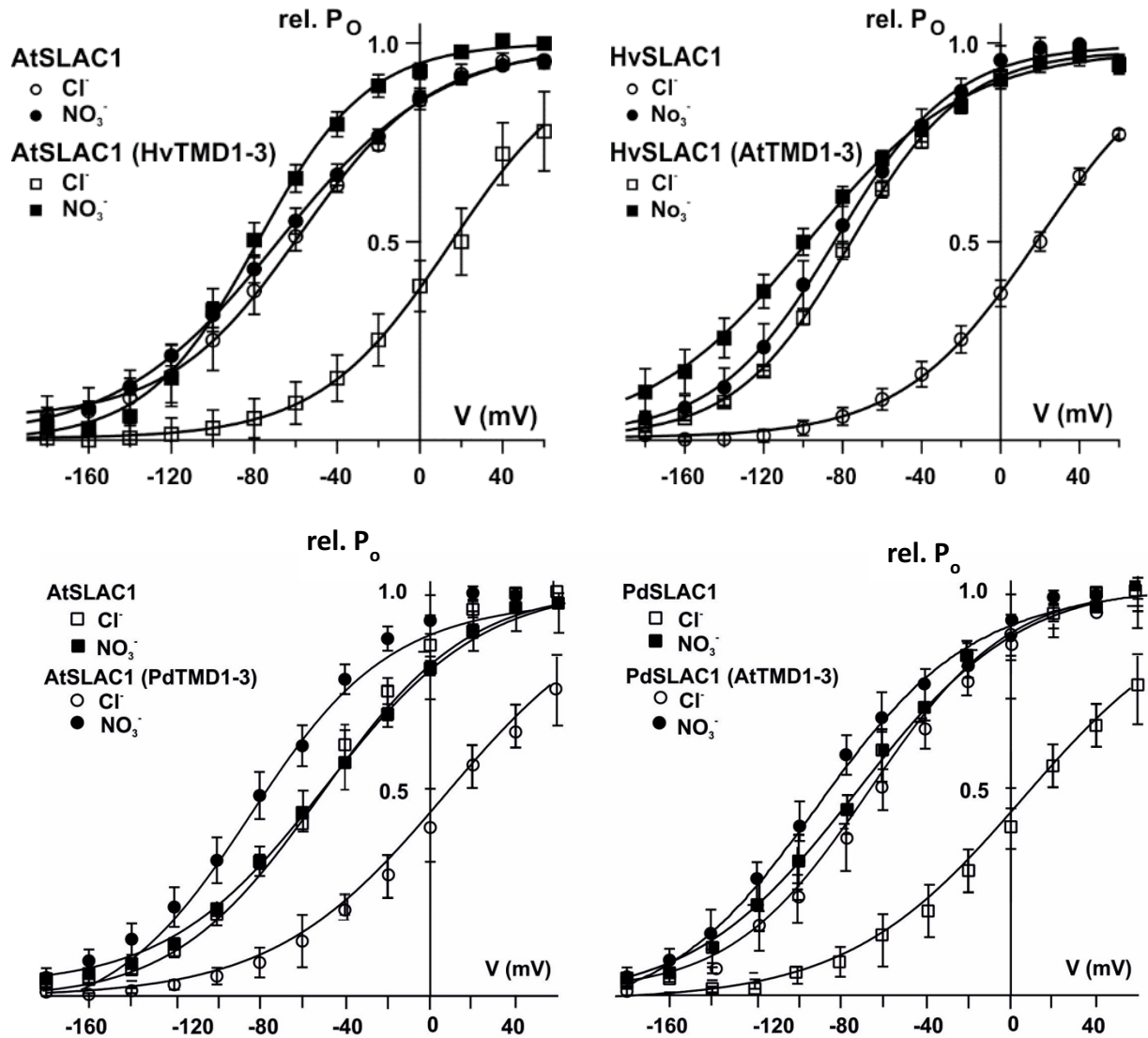


Abbildung 3-37: Vergleich der rel. Offenwahrscheinlichkeit der SLAC1 WTs sowie deren Chimären

Darstellung der rel. Offenwahrscheinlichkeit von Oozyten, welche die SLAC1 WTs bzw. die entsprechenden Chimären mit CPK6 koexprimierten, wurden in 30 mM externem Nitrat bzw. Chlorid unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls (vgl. Abbildung 2-4) aufgezeichnet. Die rel. P_o wurde aus den instantanen Folgepulsströmen (I_{tail}) bei -120 mV abgelesen (vgl. Abbildung 2-4) und konnte mithilfe einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden ($n \geq 6$; $\pm SD$).

Bei dem Vergleich der rel. Offenwahrscheinlichkeit zwischen AtSLAC1 WT und den Chimären At (HvTMD1-3) und At (PdTMD1-3) wird deutlich, dass die Aktivierung der untersuchten Chimären, wie bei den entsprechenden monokotyledonen SLAC1 Wildtypkanälen, auf einer Nitrat-abhängigen Verschiebung der rel. P_o in Richtung hyperpolarisierter Membranspannung beruht. Vergleicht man dagegen beide monokotyledonen SLAC1-Kanäle aus *P. dactylifera* und *H. vulgare* mit den jeweiligen Chimären Hv (AtTMD1-3) und Pd (AtTMD1-3), zeigte sich, dass diese bereits in Abwesenheit von externem Nitrat geöffnet sind (Abbildung 3-37). Somit konnte die Vermutung weiter untermauert werden, dass das IA-Motiv auf der TMD3 der

monokotyledonen Anionenkanäle benötigt wird (Abbildung 3-33) um einen Nitrat-unabhängigen dikotyledonen SLAC1 Kanal aus *A. thaliana* in einen Nitrat-aktivierenden monokotyledonen SLAC1 Kanal aus *P. dactylifera* und *H. vulgare* zu konvertieren. Im Gegensatz dazu benötigen die S-Typ Anionenkanäle der Monokotyledonen zum einen das VV-Motiv auf der TMD3 der Dikots und zum anderen benötigen diese zusätzliche AS-Reste, welche auf der TMD1 und 2 lokalisiert sind, um die SLAC1s aus *P. dactylifera* und *H. vulgare* in einen Nitrat-insensitiven Anionenkanal zu konvertieren (Abbildung 3-37).

4 Diskussion

In höheren Pflanzen spielen Protonen-gekoppelte Saccharosetransporter sowohl bei dem Transport von Zelle zu Zelle als auch bei dem Langstreckentransport eine essenzielle Rolle. Dabei stellen die Mesophyllzellen vollentwickelter Blätter den zentralen Ort der Photosynthese dar. Dieses autotrophe Gewebe (source) nutzt die überschüssigen Kohlenstoff-Assimilate welche sie produzieren, indem sie andere heterotrophe Gewebe wie z.B. Wurzeln oder Früchte (sink) damit versorgen. Dabei transportiert das Langstreckentransportsystem, das Phloem, die Photoassimilate durch den gesamten Pflanzenkörper. Der zwischen source- und sink-Geweben herrschende hydrostatische Druckunterschied wird von osmotisch aktiven Substanzen generiert und treibt somit den Massenstrom in diesem Gefäßsystem an. Der nicht reduzierende Zucker Saccharose stellt in den meisten höheren Pflanzen die Haupttransportform der photosynthetisch hergestellten Kohlenstoffverbindungen im Phloem dar. Der Protonen-gekoppelte Saccharosetransporter ermöglicht somit im Zytosol des Phloems eine Akkumulation von SUC von bis zu 1M an, sprich es liegt eine 1000-fach höhere Konzentration im Vergleich zum Apoplasten vor (Lohaus, Burba, and Heldt 1994; Lohaus and Moellers 2000; Kang et al. 2007; Pescod, Quick, and Douglas 2007).

Diese Nanomaschinen, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, nutzen dafür das hyperpolarisierte Membranpotenzial sowie den transmembranen Protonengradienten zur Anreicherung von Saccharose innerhalb des Phloems (Riesmeier, Hirner, and Frommer 1993; Riesmeier, Willmitzer, and Frommer 1994; Sauer and Stolz 1994; Stadler et al. 1995; Boorer et al. 1996; Kuhn et al. 1997; Burkle et al. 1998; Aoki et al. 2003; Carpaneto et al. 2005; Sauer 2007; Geiger 2011).

Im Rahmen meiner Arbeit standen elektrophysiologische Untersuchungen der Transporteigenschaften des Saccharose/H⁺-Symporters PdSUT1 aus *Phoenix dactylifera* im Fokus, welche durch die Entschlüsselung der Struktur und Funktion des Proteins, zur Aufklärung der Thermotoleranz der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* beitragen. Für die Charakterisierung von PdSUT1 wurde der bereits hinreichend analysierte SUC-Transporter ZmSUT1 aus *Zea mays* als Modelltransporter herangezogen, um schließlich Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede dieser beiden Saccharosetransporter herauszuarbeiten. Mithilfe der TEVC-Methode konnten beide plasmamembranständigen SUC/H⁺-Symporter bei definierten Temperaturen analysiert werden, um herauszufinden, was der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera*, im Vergleich zu Mais, ermöglicht, unter diesen extremen klimatischen Bedingungen überleben zu können.

Um weitere Hinweise zu erhalten, wie die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* in der Lage ist, unter extremen Stressbedingungen zu überleben, wurde zusätzlich der S-Typ Anionenkanal PdSLAC1 untersucht, um weitere Indizien zu erhalten, die es der Pflanze ermöglicht, den

transpirierenden Wasserverlust unter diesen extremen klimatischen Bedingungen zu limitieren. Zudem wurden der Anionenkanal HvSLAC1 der Gerste (*Hordeum vulgare*) sowie AtSLAC1 aus Arabidopsis - zwei Pflanzenarten der gemäßigten Klimazone - hinsichtlich ihrer funktionellen Beteiligung am ABA-abhängigen Stomaschluss vergleichend untersucht. S-Typ (slow)-Anionenkanäle vermitteln in Schließzellen im Allgemeinen den Efflux von Chlorid und Nitrat, welcher letztendlich zum Schließen der Stomata, z.B. als Antwort auf Trockenstress, führt. Dabei spielt das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) eine zentrale Rolle, da es als Antwort auf Trockenheit synthetisiert wird und schließlich über eine schnelle ABA-Signaltransduktionskette die Aktivierung von S-typ Anionenkanälen vermittelt.

4.1 PdSUT1 repräsentiert einen typischen Vertreter der Typ-II B Familie

Anhand der erfolgreichen Identifizierung des Saccharosetransporters aus *Phoenix dactylifera* als Ortholog zu dem SUC-Transporter aus *Zea mays* konnten im Rahmen dieser Arbeit anhand von biophysikalischen Analysen einige Parallelen sowie Diskrepanzen herauskristallisiert werden. Für diese Studie war der bereits hinreichend charakterisierte H⁺/SUC-Symporter ZmSUT1 bestens geeignet, da dieser im heterologen Expressionssystem von Oozyten ungewöhnlich hohe Transportströme von bis zu 4 µA generiert, während die Stromantworten anderer pflanzlicher SUC-Transporter im nA-Bereich liegen (Boorer et al. 1996; Chandran, Reinders, and Ward 2003; Reinders et al. 2006; Sun et al. 2010). Für vergleichende elektrophysiologische Analysen wurden dazu insgesamt vier orthologe SUC-Transporter der Dattelpalme erfolgreich identifiziert und kloniert.

Auf Basis von veröffentlichten Genom- und Transkriptominformationen (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem, Hu, and Zhang 2013) aus *Phoenix dactylifera* wurden Orthologe zu bereits bekannten Zuckertransportern monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen identifiziert. Aufgrund von Sequenzvergleichen konnten diese identifizierten Transportproteine schließlich phylogenetisch in die jeweiligen 3 existierenden Untergruppen (Typ-I, Typ-IIA und -IIB sowie Typ-III) der pflanzlichen Saccharosetransporter-Familie eingruppiert werden (Aoki et al. 2003). PdSUT1 konnte phylogenetisch zu dem monokotyledonen-spezifischen Typ-II B Transportern zugeordnet werden und weist eine starke Homologie zum Modelltransporter ZmSUT1, welcher ebenfalls aus dieser Unterfamilie stammt, auf. PdSUT3a und 3b konnten, basierend auf Sequenzvergleichen, dem Typ-II A Saccharosetransportern zugeteilt werden.

Typ-II A-SUTs scheinen, aufgrund ihres verlängerten zentralen Loops, eine Ahnenform der Typ-II B-SUTs zu sein. Man geht davon aus, dass das Genom aller Angiospermen mindestens ein Gen der II A Untergruppe besitzt. Mithilfe von Verlustmutanten *atsuc2* und *zmsut1* konnte gezeigt werden, dass der Verlust des wichtigsten Typ-II B-Transporters in der Phloembeladung nicht vom Typ-II A der pflanzlichen Saccharosetransporter kompensiert werden kann (Gottwald

et al. 2000; Slewinski, Meeley, and Braun 2009). Die Vertreter der Typ-II Transporter wie z.B. ZmSUT1 und OsSUT1 sind, ebenso wie Mitglieder des Typ-I, in den Plasmamembranen des SE/CC-Komplexes lokalisiert. Sie weisen, im Gegensatz zu den Typ-I Transportern, höhere K_m -Werte für SUC auf (von 2 bis 8 mM) und gehören damit zu den niederaffinen (low affinity) Transportern (Aoki et al. 2003; Carpaneto et al. 2005; Reinders et al. 2006). PdSUT4 dagegen konnte der Untergruppe des Typ-III pflanzlicher SUC-Transporter zugeordnet werden. Bislang wurden Vertreter der Typ-III SUC-Transporter, sowohl von Mono- als auch von Dikotyledonen, ausschließlich im Tonoplasten nachgewiesen (Endler et al. 2006; Eom et al. 2011).

Diese phylogenetischen Eingruppierungen konnten über Funktionsstudien im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten bestätigt werden. Bislang konnte noch kein Vertreter der Typ-IIA-SUTs hinsichtlich seiner Funktion in Oozyten erfolgreich charakterisiert werden. Die Expression von PdSUT3a und 3b in Oozyten, bestätigte, dass auch diese beiden Transportproteine in diesem heterologen Expressionssystem infunktionell sind, da mithilfe der TEVC-Technik keine Saccharose-induzierte Stromantwort vernommen werden konnte. Auch im Falle von PdSUT4 konnte keine Transportaktivität mittels der TEVC-Technik festgestellt werden, da es sich bei diesem Transportprotein, wie es bereits für einige anderen Vertreter dieses Typs gezeigt werden konnte, um einen H^+ -gekoppelten Symporter handelt, welcher Saccharose zusammen mit Protonen aus der Vakuole in das Zytoplasma transportiert (Weise et al. 2000; Reinders et al. 2008; Schulz et al. 2011) (Abbildung 3-1). Vakuoläre Membranproteine werden in Oozyten nicht in die Plasmamembran eingebaut und sind deshalb nicht für elektrophysiologische Studien zugänglich.

PdSUT1 dagegen gehört den monokotspezifischen Typ-IIB Transportern an und weist, wie bereits oben erwähnt, einen hohen Verwandtschaftsgrad mit höchster Sequenzidentität zu dem Zuckertransporter ZmSUT1 aus Mais auf (Tabelle 3-1) (Abbildung 3-1). Anhand von elektrophysiologischen Analysen in Oozyten konnte gezeigt werden, dass PdSUT1 funktionell ist und eine Expression in der Membran von *Xenopus laevis* Oozyten mit Saccharose-induzierten Protonenströmen im μA -Bereich aufweist (Abbildung 3-5). Somit konnte PdSUT1 aus *Phoenix dactylifera*, neben dem bereits bekanntem Saccharosetransporter ZmSUT1 aus Mais, als ein neuer Saccharose/Protonen Symporter gefunden werden, welcher ebenso wie ZmSUT1 durch sehr hohe Transportströme charakterisiert ist (Carpaneto et al. 2005; Wippel et al. 2010). Im Gegensatz zu ZmSUT1 und PdSUT1 vermitteln die meisten bislang bekannten Saccharosetransporter lediglich Protonenströme im nA-Bereich (Boorer et al. 1996; Zhou et al. 1997; Chandran, Reinders, and Ward 2003). Diese hohen Transportströme machen PdSUT1 zu einem idealen Modelltransporter für elektrophysiologische und Struktur-Funktions-Charakterisierungen in *Xenopus* Oozyten. Aufgrund der phylogenetischen Einordnung der PdSUTs stellt vor allem der in Oozyten funktionelle Saccharosetransporter PdSUT1 einen

potenziellen Kandidaten für die Entschlüsselung des Assimilattransportes von *Phoenix dactylifera* dar. Um dies zu ermöglichen, ist eine Lokalisation in den entsprechenden Geweben von großer Relevanz.

Es konnte bereits anhand einiger vorrausgegangener Expressionsstudien verschiedener Pflanzenarten gezeigt werden, dass viele der Saccharosetransporter wie z.B. die aus Arabidopsis, Mais, Weizen und Trauben in unterschiedlichsten Pflanzengeweben, sowohl in source- als auch in sink-Geweben, vertreten sind (Meyer et al. 2004; Slewinski, Meeley, and Braun 2009; Afoufa-Bastien et al. 2010; Mukherjee et al. 2015).

Anhand der Expressionsanalysen der identifizierten PdSUTs in unterschiedlichen Pflanzengeweben konnte gezeigt werden, dass auch die identifizierten Zuckertransporter der Dattelpalme sowohl in sink- als auch in source-Geweben lokalisiert sind (Abbildung 3-2). Somit ist davon auszugehen, dass diese Transportproteine unterschiedliche Funktionen bei dem Assimilattransport einnehmen, da SUC-Transportern/SUC Carriern (SUTs/SUCs) sowie Transportern der SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) eine essenzielle Rolle bei der Phloembe- und entladung zugeschrieben wird (Kuhn and Grof 2010; Chen et al. 2012). Somit übernehmen die Saccharosetransporter wichtige regulatorische Funktionen bei der pflanzlichen Entwicklung und Wachstum, insbesondere in dem vaskulären Geweben (Aoki et al. 2004; Hackel et al. 2006; Baker, Leach, and Braun 2012; Chen et al. 2012).

Im Vergleich zu den anderen SUC-Transportern der Dattelpalme konnte bei PdSUT3a sogar gezeigt werden, dass dessen Expression in dunkel adaptieren Blättern deutlich herabgesetzt ist, im Vergleich zu im Licht adaptierten Blättern. Alle anderen analysierten SUC-Transporter zeigten dagegen keinen Unterschied im Expressionsverhalten in Licht bzw. in Dunkelheit. Dieses tageszeitabhängige Expressionsverhalten in den source-Blättern konnte bereits bei anderen Zuckertransportern aus der Kartoffel und Tomate (Kuhn et al. 1997) sowie beim Modelltransporter ZmSUT1 aus Mais (Aoki et al. 1999) beobachtet werden.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass für die apoplastisch beladende Pflanze *Zea mays* der niederaffine plasmamembranständige SUC/H⁺-Symporter ZmSUT1 maßgeblich an der Aufnahme der extrazellulären Saccharose in das Phloem beteiligt ist (Carpaneto et al. 2005), wurden die Transporteigenschaften des Saccharosetransporters PdSUT1 der Dattelpalme anhand biophysikalischer Technik analysiert, um die Funktion dieses Transportproteins aufdecken zu können. Aufgrund des nahen Verwandtschaftsgrades von PdSUT1 zu ZmSUT1 war es möglich, den elektrophysiologisch hinreichend analysierten Zuckertransporter aus Mais als Vergleichsmodell heranzuziehen und somit Parallelen bzw. Unterschiede zu PdSUT1 hinsichtlich der Funktion der Transportproteine und im Speziellen hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit des Zuckertransports aufzudecken.

4.2 PdSUT1 ist ein Saccharose/Protonen Symporter

In der Plasmamembran des SE/CC-Komplexes sind verschiedene Saccharose-, Peptid-, Polyol- und Aminosäuretransporter lokalisiert, welche unter Verwendung der protonenmotorischen Kraft in der Lage sind, ihr entsprechendes Substrat im Symport mit Protonen in den SE/CC-Komplex zu transportieren (Li and Bush 1990; Boorer, Loo, and Wright 1994; Jamai, Chollet, and Delrot 1994; Frommer et al. 1995; Rentsch et al. 1995; Chen and Bush 1997; Carpaneto et al. 2005; Sauer 2007). Bislang veröffentlichte funktionelle Expressionsstudien mono- und dikotyledoner SUC-Transporter in Oozyten zeigten lediglich SUC-induzierte Transportströme im nA-Bereiche auf, was eine zuverlässige biophysikalische Charakterisierung der Transporter erschwert (Chandran, Reinders, and Ward 2003; Reinders et al. 2006; Reinders et al. 2008; Sun et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte nun neben dem H⁺/Saccharosetransporter ZmSUT1 aus Mais, auch PdSUT1 aus *Phoenix dactylifera*, eine funktionelle Expression in der Plasmamembran von Oozyten mit vergleichsweise sehr hohen SUC-induzierten Transportströmen nachgewiesen werden (Carpaneto et al. 2005; Carpaneto et al. 2010) (Abbildung 3-5). Ähnlich wie bei anderen bislang untersuchten Zuckertransporter wie ZmSUT1, ShSUT1 oder OsSUT1, konnte mithilfe von biophysikalischen Techniken zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Transportaktivität gezeigt werden, dass auch PdSUT1 in einem breiten Spannungsbereich aktiv ist und die Transportströme mit hyperpolarisierender Spannung linear ansteigen (Abbildung 3-6, Abbildung 3-7 A).

Bei der Untersuchung der Substrataffinität von PdSUT1 stellte sich heraus, dass das Transportprotein PdSUT1 zu den niederaffinen Saccharosetransportern zu zählen ist, da sich der K_m-Wert bei einem pH-Wert von 4 und einem Membranpotenzial von -130 mV bei 1.39 mM befindet (Abbildung 3-7 B).

Wie bereits von Carpaneto et al. 2005 gezeigt wurde, nahm die Affinität des Transporters ZmSUT1 zu Saccharose mit der Hyperpolarisation der Membran zu (Carpaneto et al. 2005). Die Spannungsabhängigkeit der Saccharoseaffinität von PdSUT1 zeigte ein ähnliches Verhalten (Abbildung 3-7 B). Die halbmaximale Transportaktivität von PdSUT1 lag im millimolaren Konzentrationsbereich, was PdSUT1 wie auch ZmSUT1 als einen niederaffinen Saccharosetransporter klassifiziert.

Die Akkumulation von Saccharose von bis zu 1000-fach wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch die Membranspannung und dem Protonengradienten energetisiert, was nur durch eine enge Kopplung des Protonen- und Zuckertransports zu erklären ist.

Der Apoplast stellt die entscheidende Schnittstelle zwischen dem Austritt der Photoassimilate aus dem source-Gewebe und dem Eintritt in das Phloem der Pflanze dar. Im Apoplasten liegt ein pH-Wert im Bereich zwischen 5.0 und 6.0 vor (Tetlow and Farrar 1993; Kosegarten,

Hoffmann, and Mengel 1999), während im Phloem ein pH-Wert von etwa 7.5 vorliegt (Hafke et al. 2005). Dieser vorliegende Protonengradient sowie ein hyperpolarisiertes Membranpotenzial wird von plasmamembranständigen H⁺-ATPasen unter Verbrauch von ATP energetisiert (Dewitt, Harper, and Sussman 1991; Bouche-Pillon et al. 1994). Die in der Plasmamembran des SE/CC-Komplexes vorliegenden SUC-Transporter nutzen diese protonenmotorische Kraft, um ihr Substrat im Symport mit Protonen in den SE/CC-Komplex des Phloems zu transportieren (Li and Bush 1990; Boorer, Loo, and Wright 1994; Jamai, Chollet, and Delrot 1994; Frommer et al. 1995; Rentsch et al. 1995; Chen and Bush 1997; Carpaneto et al. 2005; Sauer 2007). Bei der apoplastischen Entladung muss der Zucker zunächst in den extrazellulären Raum gelangen, um schließlich von dort das sink-Gewebe zu erreichen. Je nach Art des heterotrophen Gewebes verfügen die Pflanzen über zwei unterschiedliche Strategien, um Saccharose aus dem Apoplasten in das sink-Gewebe aufzunehmen (Weber et al. 1997). Eine Möglichkeit der apoplastischen Phloementladung stellt die enzymatische Spaltung von SUC dar, welche über Zellwand-gebundene Invertasen erfolgt. Die daraus resultierenden Monosaccharide Glukose und Fruktose werden anschließend über Hexosetransporter zu dem Ort des Verbrauchs (sink) transportiert (Buttner and Sauer 2000). Durch die enzymatische Spaltung wird gewährleistet, dass die apoplastische Saccharosekonzentration stets niedrig und der Gradient zwischen Apoplast und SE/CC-Komplex erhalten bleibt (Sturm and Tang 1999; Weber and Roitsch 2000; Roitsch et al. 2003; Roitsch and Gonzalez 2004). Die andere Möglichkeit der Phloementladung besteht in der Aufnahme des Transportzuckers durch sink-spezifische SUC-Transporter (Riesmeier, Willmitzer, and Frommer 1994; Truernit and Sauer 1995; Kuhn et al. 1997; Weber et al. 1997; Bick et al. 1998; Shakya and Sturm 1998; Lemoine et al. 1999; Stadler et al. 1999). Es konnte bereits anhand von Lokalisationsstudien gezeigt werden, dass dieselben Saccharosetransporter in source- und sink-Geweben exprimiert werden, so dass spekuliert wird, dass diese Transporter sowohl bei der Be- als auch bei der Entladung des Phloems involviert sein könnten. Carpaneto et al. konnte für den Modelltransporter ZmSUT1 eine reversible Transportrichtung nachweisen, die sich lediglich nach der protonenmotorischen Kraft und dem Saccharosegradienten richtet. So kann der gleiche Transporter, der im source-Gewebe für die Beladung von Saccharose verantwortlich ist, im sink-Gewebe Saccharose in den Apoplasten entlassen (Kuhn et al. 1997; Viola et al. 2001; Kuhn et al. 2003; Carpaneto et al. 2005). Da auch der Zuckertransporter PdSUT1 der Dattelpalme einen hohen Verwandtschaftsgrad zu ZmSUT1 aus Mais aufweist und die Expressionsanalysen zeigen, dass der Saccharosetransporter sowohl in den source- als auch in den sink-Geweben exprimiert ist (Abbildung 3-2), liegt die Vermutung nahe, dass auch dieser Transporter sowohl bei der SUC-Akkumulation im source, als auch bei der SUC-Entladung in den sink-Organen

involviert sein könnte. Eine wichtige Triebkraft für den sekundär aktiven SUC/H⁺-Symport stellt der Gradient der Protonen über die Plasmamembran dar. Das konnte auch im Falle von PdSUT1 bewiesen werden, da bei PdSUT1-exprimierenden Oozyten eine Steigerung der extrazellulären H⁺-Konzentration in einer Erhöhung der Einwärtsströme resultierte. Aufgrund der extrazellulären Ansäuerung kommt es zu einer Erhöhung der Triebkraft für den SUC/H⁺-Transport in Oozyten und resultiert folglich in einer Erhöhung der Einwärtsströme (Abbildung 3-8). Unter Verwendung der TEVC-Technik kann somit PdSUT1 als ein neu entdeckter monokotyledoner SUC/H⁺-Symporter beschrieben werden, dessen Transportaktivität zum einen vom pH-Wert abhängig ist (Abbildung 3-8 A) und zum anderen von der Membranspannung (Abbildung 3-8 B).

Diese Transporteigenschaften deuten somit daraufhin, dass der PdSUT1-vermittelte Saccharosetransport über die protonenmotorische Kraft energetisiert wird, so dass ein einwärtsgerichteter Protonengradient sowie negativere Membranpotenziale den Transport von SUC begünstigen und somit die Akkumulation von Saccharose im Phloem ermöglichen.

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit von ZmSUT1-exprimierten Oozyten konnte unter denselben Bedingungen ein sehr ähnliches Transportverhalten festgestellt werden (Abbildung 3-9). Die SUC/H⁺-Symporter ZmSUT1 und PdSUT1 weisen somit beide eine eindeutige pH-Abhängigkeit bei ihrem Transportverhalten auf, bei der ihr pH-Transportoptimum im sauren Bereich liegt. Wie bereits erwähnt, liegt der physiologische pH-Wert des Apoplasten in etwa zwischen pH 5 und 6 (Tetlow and Farrar 1993; Kosegarten, Hoffmann, and Mengel 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Stressfaktoren wie z.B. Wassermangel oder Änderungen der Lichtintensität und CO₂-Konzentration Schwankungen des apoplastischen pH-Wertes hervorrufen können. Solche Schwankungen im apoplastischen pH-Wert werden u. a. als mögliche Signale für die Aktivierung von Kanalproteinen, bei Trockenstress oder bei der Ausschüttung von ABA in den Apoplasten beschrieben (Hartung, Radin, and Hendrix 1988; Blatt 1992; Wilkinson and Davies 1997; Wilkinson 1999; Felle et al. 2005; Wilkinson and Davies 2008). Aufgrund der Tatsache, dass beide Transportproteine über ein breites pH-Spektrum verfügen, sind sie in der Lage, selbst bei stressinduzierten pH-Wert-Schwankungen im Apoplasten, erfolgreich SUC im Symport mit Protonen aus dem source-Gewebe in das Phloem zu transportieren. Diese flexible Transporteigenschaft ist gerade für die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* aufgrund der bestehenden abiotischen Stressfaktoren von großem Vorteil.

4.3 PdSUT1 ist ein hochselektiver SUC-Transporter

Basierend auf vorangegangene Studien geht man heute davon aus, dass die Fähigkeit Saccharose (SUC) zu synthetisieren auf die Cyano- und Proteobakterien zurückgeht, die seit

mehr als 3,5 Milliarden Jahren die Gewässer der Erde besiedeln (Lunn 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese Organismen SUC für die Stabilisierung des osmotischen Drucks nutzen, den Zucker aber auch als Kohlenhydratspeicher verwenden. Bis heute besteht die Grundlage ihrer phototrophen Überlebensstrategie darin organisches Material aus dem CO₂ der Luft zu synthetisieren. Neben CO₂ benötigen die Pflanzen für den Assimilationsprozess anorganischen Mineralien, Lichtenergie sowie eine ausreichende Versorgung mit Wasser, um einen effektiven Austausch von Absorptions- und Assimilationsprodukten gewährleisten zu können. Die Photoassimilate werden dabei entweder direkt metabolisiert oder in Form von Transportzuckern für die Versorgung unterschiedlicher sink-Organen wie z.B. Wurzeln, Früchten oder Blüten bereitgestellt. Da diese sink-Organen selbst nicht photosynthetisch aktiv sind, sind sie auf den erfolgreichen Import von Kohlenstoffverbindungen angewiesen, so dass eine selektive und effiziente Aufnahme sowie eine reibungsfreie Weiterleitung der Kohlenstoffverbindungen über das Phloem von zentraler Bedeutung sind. Die ersten Untersuchungen der Substratspezifität an bereits klonierten pflanzlichen SUC-Transportern wurden meist mithilfe von Aufnahmeexperimenten in Hefe durchgeführt (Hitz, Card, and Ripp 1986).

Die Untersuchung unter Spannungsklemmbedingungen begann jedoch erst einige Jahre später. Mittlerweile wurden einige mono- und dikotyledone SUC-Transporter in dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten unter konstanten Spannungsklemmbedingungen detailliert analysiert (Chandran, Reinders, and Ward 2003; Sivitz, Reinders, and Ward 2005; Reinders et al. 2006; Sivitz et al. 2007; Sun et al. 2010). Basierend auf Sequenzhomologien konnten somit die pflanzlichen Saccharosetransporter mittels phylogenetischer Analysen in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 1-11). Die Mitglieder dieser Eingruppierung wiesen dabei interessanterweise nicht nur eine ähnliche Sequenzabfolge auf, sondern zeigten darüber hinaus auch eine Gemeinsamkeit hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der SUC-Transporter PdSUT1 dem Typ II der SUC-Transporter zugeordnet werden. Ebenso wie z.B. HvSUT1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) (Sivitz, Reinders, and Ward 2005) und ShSUT1 aus Zuckerrohr (*Saccharum hybrid*) (Reinders et al. 2006), wies auch PdSUT1 eine enge Substratspezifität auf, die sich nur mit Transportaktivitäten bei SUC, Maltose, Raffinose und dem s-Glykosid Salicin äußerte. PdSUT1 kann aufgrund seines Profils somit eindeutig den Vertretern des Typs II der Monokotylen zugeordnet werden (Abbildung 3-10).

Wie auch bei ZmSUT1, welcher ebenfalls dieser Gruppe angehört, wird das primäre Substrat SUC mit höchster Aktivität transportiert, gefolgt von einer deutlichen Aktivität bei Maltose und einer geringeren Aktivität bei Salicin und Raffinose. Monosaccharide wie z.B. Glukose, Galaktose oder Fruktose, aber auch die getesteten Disaccharide Laktose und Sucralose

dienen dagegen nicht als geeignetes Substrat für PdSUT1. Interessanterweise wies PdSUT1 auch bei dem Dreifachzucker Raffinose eine gewisse Transportaktivität auf. Raffinose gehört zu der Familie der Oligosaccharide (RFOs) und wird meist mit der symplastischen Phloembeladung in Verbindung gebracht. Für Pflanzen, die in der Lage sind, neben SUC auch Raffinose und Stachyose zu transportieren, wurde als Strategie dieser Phloembeladung das Polymer-Fallen-Modell (polymer trap) entwickelt (Turgeon and Beebe 1991; Turgeon 1996, 2000). Da PdSUT1, im Vergleich zu ZmSUT1, in der Lage ist, Raffinose zu transportieren, gilt es, in Zukunft detaillierte Analysen hinsichtlich des Transportmechanismus bzgl. von Raffinose und Stachyose im Vergleich zu dem primären Substrat SUC herauszuarbeiten. Aufgrund der umliegenden Standortfaktoren der Dattelpalme könnten die RFOs evtl. eine raffinierte Anpassung darstellen, da diesen Oligosacchariden neben dem Transport von Kohlenstoffverbindungen auch eine Kompatibilität bei abiotische Stressfaktoren wie Hitze oder Trockenheit zugeschrieben werden (Bachmann, Matile, and Keller 1994; Haritatos, Keller, and Turgeon 1996; Taji et al. 2002; Peters and Keller 2009). Für *Arabidopsis thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass SUC den primären Transportzucker repräsentiert, jedoch auch das Trisaccharid Raffinose transportiert wird (Haritatos, Ayre, and Turgeon 2000). Bei Kürbisgewächsen (*Cucurbitaceae*) stellen dagegen Raffinose und Stachyose (Raffinose-Familie-Oligosaccharide, RFO's) die wichtigsten Transportzucker dar (Kandler and Hopf 1982; Keller and Pharr 1996; Sauer 2007). Die elektrophysiologischen Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität ermöglichen jedoch die eindeutige Eingruppierung von PdSUT1 zu dem Typ II der monokotyledonen SUC-Transporter, da der Zuckertransporter der Dattelpalme eine eingeschränkte Substratspezifität aufweist, wie andere Mitglieder dieser Transporter-Unterfamilie (Abbildung 1-11, Abbildung 3-10, Abbildung 3-11).

4.4 Sucralose konkurriert mit SUC um die Bindestelle von PdSUT1

Im Falle von ShSUT1 und ZmSUT1 konnte nicht nur gezeigt werden, dass Sucralose nicht zu den von ShSUT1 bzw. ZmSUT1 transportierten Substraten gehört, es wurde darüber hinaus sogar ein inhibierender Effekt von Sucralose auf die SUC-Transporter beschrieben (Reinders et al. 2006; Derrer et al. 2013).

Diese Entdeckung führte im Rahmen dieser Arbeit zu der Frage, ob es sich bei dem Süßstoff Sucralose, im Falle von PdSUT1, ebenso um einen spezifischen Inhibitor bei dem Transport von SUC handelt, da spezifische Inhibitoren häufig als Werkzeug zur detaillierten Analyse von Transportmechanismen herangezogen werden. Dazu wurde der Einfluss von Sucralose auf den Saccharosetransport des Typ II-SUTs PdSUT1 unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Sucralose die SUC-induzierten Protonenströme von PdSUT1 inhibieren (Abbildung 3-12). Bei näherer Betrachtung der

konzentrationsabhängigen Inhibierung der Transportströme, konnte eine Inhibierung der SUC-Transportaktivität von PdSUT1 mit einem IC_{50} -Wert für Sucralose von 9,7 mM ermittelt werden (Abbildung 3-13). Somit bestätigen diese Daten, neben dem typischen Profil der Substratspezifität (Abbildung 3-10) die Einteilung von PdSUT1 in die Gruppe der Typ-II SUTs. Darüber hinaus gelang es sogar, Sucralose als kompetitiven Inhibitor des Saccharosetransports durch PdSUT1 zu identifizieren (Abbildung 3-14).

Reinders et al. konnte zeigen, dass der alleinige Austausch von nur 5 Aminosäuren ausreicht, um einen hochspezifischen Typ II-Saccharosetransporter in einen weniger spezifischen Typ I-ähnlichen Saccharosetransporter umzuwandeln (Reinders et al. 2012).

Da nur Typ I-SUTs fähig sind, das fluoreszierende s-Glykosid Esculin zu transportieren, konnte die Anzahl der für die Substratspezifität verantwortlichen Aminosäuren mithilfe von FACS (fluorescence activated cell sorting) auf fünf Aminosäuren reduziert werden. Zwei dieser Aminosäuren, die diese Schlüsselpositionen einnehmen und die Substratspezifität von Typ II Saccharosetransportern bestimmen, sind in der extrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne I und II lokalisiert. Die Position dieser beiden AS befindet sich jedoch nicht in der Nähe der putativen Substratbindestelle, welche sich in der Mitte der N-terminalen Transmembrandomäne befindet. Basierend auf diesen Erkenntnissen gehen die Autoren davon aus, dass die nachgewiesene Undurchlässigkeit der Typ II-Carrier für Sucralose und Esculin nicht durch Unterschiede bei der Substratbindung zu betrachten sind, sondern die Erklärung besteht darin, dass Sucralose und Esculin zwar gebunden, aber nicht auf die andere Seite der Membran transloziert werden. Diese Schlussfolgerungen bestätigen, dass Sucralose für Typ II-Transporter wie PdSUT1 als kompetitiver Inhibitor wirken, d.h. das Substrat bindet, wird aber nicht transportiert. Derrer et al. konnte bereits ein Jahr später die Hypothese von Reinders et al. mittels Spannungsklemm-Fluorometrie in Kombination mit elektrophysiologischen Untersuchungen des inhibitorischen Effekts von Sucralose zeigen, dass Typ I permeable Zucker die Konformationsänderungen von Typ-II Zuckertransportern blockieren. Die Bindung dieser inhibitorischen Zucker an die Bindestelle von Typ-II Transportern findet zwar statt, es findet aber kein Transport statt (Derrer et al. 2013). Die Identifikation von Sucralose als kompetitiven Inhibitor für PdSUT1, repräsentiert demnach ein wichtiges Werkzeug für weiterführende Studien, um ein tieferes Verständnis für den Mechanismus der Anreicherung von Saccharose in *Phoenix dactylifera* zu erlangen.

Eine Möglichkeit, um die Substratbindestelle zu identifizieren, wäre die Verwendung des fluoreszierenden s-Glykosid Esculin. Zu Beginn meiner Doktorarbeit konnte ich anhand des Modelltransporters ZmSUT1 zeigen, dass Esculin, ebenso wie Sucralose nicht über den Typ II Saccharosetransporter transportiert werden kann und ebenso als kompetitiver Inhibitor fungiert (Abbildung 4-1).

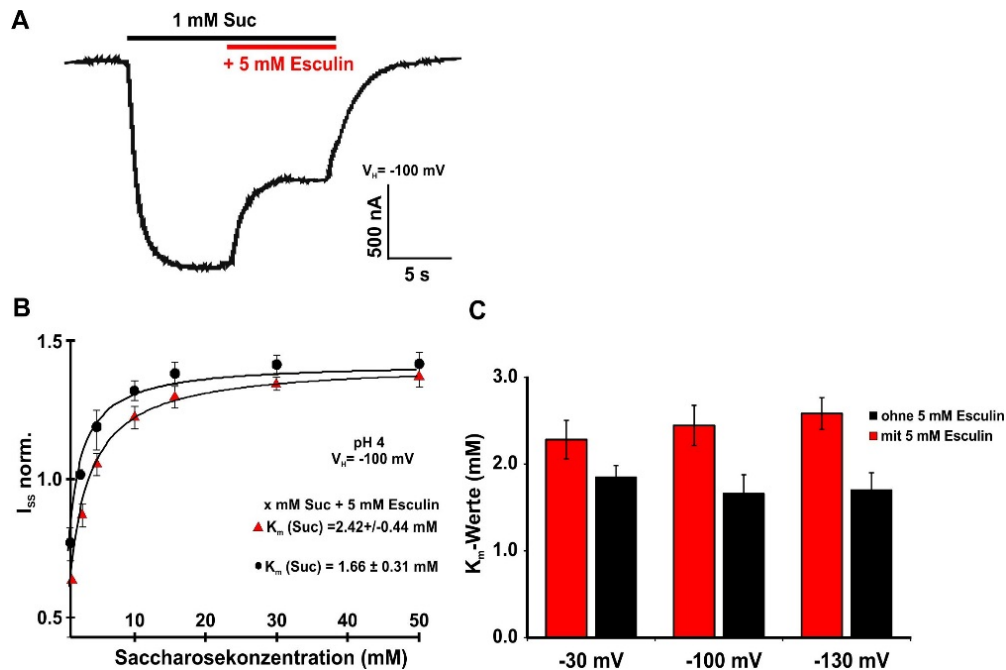


Abbildung 4-1: Kompetitive Inhibition der SUC-induzierten Ströme von ZmSUT1 durch Esculin
 (A) Stromantwort einer repräsentativen Zelle bei -20 mV und pH 4. Die Applikation von 1 mM SUC alleine, führte zu einer negativen Stromantwort, welche durch die zusätzliche Applikation von Esculin (5 mM) zu 46% reprimiert wurde. (B) Die ermittelten I_{ss} in Anwesenheit von 5 mM Esculin (dargestellt als rotes Dreieck) bzw. in Abwesenheit von Esculin (dargestellt als schwarzer Kreis) wurden gegen die extrazell. SUC-Konzentration bei -100 mV und pH 4 aufgetragen. Die I_{ss} wurden auf die Ströme bei -100 mV in Anwesenheit von 3 mM Saccharose normiert und mithilfe der Michaelis-Menten-Funktion beschrieben. (C) Die errechneten K_m -Werte wurden gegen die jeweiligen Spannungen bei -30, -100 und -130 mV als Balkendiagramm aufgetragen ($n=5$, \pm SD).

Diese Beobachtungen untermauern somit die vorangegangenen Untersuchungen von Derrer et al., die bereits Sucralose als kompetitiven Inhibitor für ZmSUT1 aufdecken konnte (Derrer et al. 2013). Zudem konnte nun im Rahmen dieser Doktorarbeit ein weiterer kompetitiver Inhibitor des ZmSUT1 Enzyms, ermittelt werden.

Zieht man das Modell der kompetitiven Inhibition des ZmSUT1 Transporters durch Sucralose von Derrer et al. in Betracht, so kann man davon ausgehen, dass auch im Fall der kompetitiven Inhibition durch Esculin vermutlich der Transporter in der extrazellulären Konformation blockiert wird. Esculin konkurriert also mit Saccharose um die Substratbindestelle und kann dort auch gebunden werden, jedoch findet keine Translokation von Esculin statt, da der Transporter nach der Bindung in seiner Konformation blockiert ist und somit keine

Konformationsänderung und folglich keine Substrattranslokation durchführen kann (Derrer et al. 2013).

Derrer et al. konnte bereits mithilfe der Spannungsklemm-Fluorometrie (voltage-clamp-fluorometry - VCF), welche hervorragend für die Erforschung des Reaktionszyklus von Membranproteinen geeignet ist (Mannuzzu, Moronne, and Isacoff 1996; Loo et al. 1998; Geibel et al. 2003), zeigen, dass sobald der Fluoreszenzfarbstoff an die extrazelluläre Schleife I zwischen TMD I und TMD II (ZmSUT1 Y61C oder T72C) gebunden war, eine besonders ausgeprägte Fluoreszenzänderung detektiert werden konnte (Derrer et al. 2013). In dieser Schleife befinden sich zwei der von Reinders et al. identifizierten AS-Reste, welche bei der Substratspezifität von Typ II Transportern mitverantwortlich sein sollen (Reinders et al. 2012). Diese Daten sprechen somit dafür, dass die extrazelluläre Schleife von ZmSUT1 direkt an der Translokation von Saccharose beteiligt ist.

Die elektrophysiologische Charakterisierung von PdSUT1 sowie die bisherigen Informationen zu dem Modelltransporter ZmSUT1 liefern weitere wichtige Hinweise um die Substratbindung sowie den Transportzyklus dieser beiden SUC/H⁺-Symporter, ZmSUT1 und PdSUT1, weiter aufdecken zu können.

4.5 Die Temperatur beeinflusst die Transportaktivität und –affinität des SUC-Transports

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte elektrophysiologische Charakterisierung des Saccharosetransporters PdSUT1 gibt zum einen Aufschluss über die Transporteigenschaften des Transportproteins der Dattelpalme und zum anderen dient diese als Grundlage zur Aufschlüsselung der Thermotoleranz dieser hitzebeständigen Wüstenpflanze. Denn auch, wenn diese Kulturpflanze in der Lage ist, unter extremen klimatischen Bedingungen zu überleben, stellen abiotische Stressfaktoren wie z.B. Trockenheit, hoher Salzgehalt und Hitze in Zeiten des Klimawandels auch für diese Pflanze eine Gefahr dar. Temperaturveränderungen beeinflussen zum einen die Konformationsänderungen der Transporter und zum anderen die Fluidität der Membran. Beide Faktoren beeinflussen unmittelbar die Transportaktivität von Membranproteinen. Mithilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen unter kontrollierten Temperaturbedingungen konnte herausgefunden werden, dass die Transportaktivität von membranständigen Transportproteinen wie PdSUT1 und ZmSUT1 stark von der Temperatur beeinflusst wird. So konnte gezeigt werden, dass die SUC-induzierten Protonenströme von PdSUT1 sowohl bei einer Temperaturerhöhung als auch bei einer Erniedrigung der Temperatur beeinflusst wird (Abbildung 3-15). Durch die Erhöhung der Temperatur wird gleichzeitig auch die Fluidität der Membran erhöht, welche direkten Einfluss auf den Transportprozess membranständiger

Proteine hat. Während dieses Prozesses durchleben Carrier, wie PdSUT1, eine ausgeprägte Konformationsänderung, wodurch der Transportmechanismus stark von der Temperatur abhängig ist. Carrier weisen aus diesen genannten Gründen eine stärkere Temperaturabhängigkeit auf als Kanalproteine, die sich während ihres Transportzyklus nur wenig bewegen. Q_{10} -Werte von ≥ 2 sind deshalb bei sekundär aktiven Transportern die Regel. Im Vergleich dazu ist der Ionentransport über Kanäle relativ temperaturunabhängig, so dass sie einen geringeren Q_{10} -Wert von 1.2 bis 1.5 aufweisen (Hille 2001).

Mithilfe der elektrophysiologischen Untersuchung von PdSUT1/ZmSUT1-exprimierender Oozyten konnte gezeigt werden, dass bei beiden Transportproteinen ein Temperaturanstieg in einer deutlichen Erhöhung der SUC-induzierten Protonenströme (Abbildung 4-2) und damit auch in Q_{10} -Werten von über 2 resultierte (Abbildung 3-16).

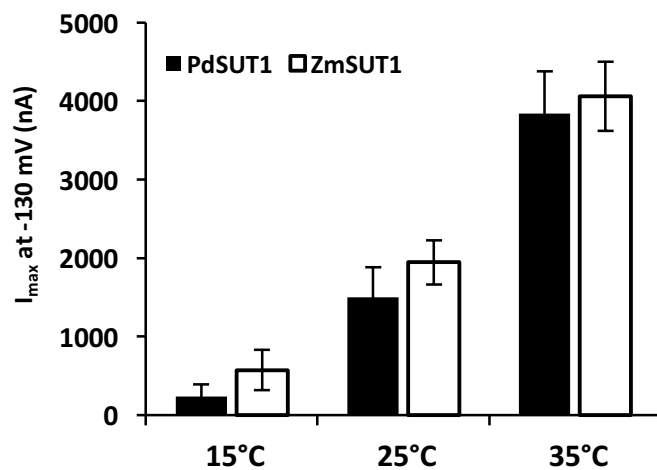


Abbildung 4-2: Temperaturabhängige Transportaktivität von ZmSUT1/PdSUT1

Bei einem Membranpotenzial von -130 mV und einem pH-Wert von 4 wurden die maximalen SUC-induzierte Ströme von PdSUT1 (schwarze Balken) und ZmSUT1 (weiße Balken) bei 15, 25 und 35 °C aufgezeichnet. Mit der Erhöhung der Temperatur stiegen auch die I_{ss} beider Transporter deutlich an ($n=6 \pm SD$).

Interessanterweise zeigten TEVC-Messungen an PdSUT1-exprimierender Oozyten bei Temperaturen unter 10°C keine Saccharose-induzierten Protonenströme und bei Temperaturen oberhalb von 30°C konnte keine weitere Erhöhung der SUC-induzierten Protonenströme festgestellt werden (Abbildung 3-15).

Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass verschiedene SUT-Typen bei abiotischen Stressantworten involviert sind (Sivitz et al. 2007; Frost et al. 2012; Gong et al. 2015; Jia et al. 2015). Basierend auf der Erkenntnis, dass abiotische Stressfaktoren einen signifikanten Einfluss auf den Assimilattransport aufweisen, konnte zudem gezeigt werden, dass Trockenstress (Hummel et al. 2010; Durand et al. 2016), Salzstress (Hasegawa et al. 2000) sowie Hitzestress (Berry and Bjorkman 1980) zu Veränderungen bei der Kohlenhydratverteilung führen. Darüber hinaus konnte erst kürzlich von Xu et al. die Thematik des Einflusses von abiotischen Stressfaktoren auf die transkriptionelle Regulation der SUTs in source-Blättern v.a. bei Zuckertransportern, welche bei der apoplastischen Phloembeladung beteiligt sind, weiter ausgeführt werden. So konnte gezeigt werden, dass monokotyledone und

dikotyledone apoplastische Phloembelader transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Mechanismen einsetzen, um den Export von Zuckern aus den source-Blättern zu regulieren (Xu et al. 2018).

Da der Transportprozess selbst durch die Temperatur beeinflusst wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit auch herausgefunden werden, dass die Temperatur nicht nur die Aktivität des Transporters, sondern auch die Affinität des Transporters beeinflusst (Abbildung 3-17).

Sowohl PdSUT1 als auch ZmSUT1 weisen bei 25°C die höchste Affinität gegenüber Saccharose auf. Geringere (15°C) bzw. höhere Temperaturen (35°C) führten dabei, bei beiden untersuchten Transportproteinen, zu einer niedrigeren Affinität gegenüber SUC (Abbildung 3-17).

Die Affinität gegenüber SUC während des Transportprozesses steigt somit im Vergleich zur Transportaktivität nicht mit steigender Temperatur an, sondern zeigt ein Optimum bei 25°C (Abbildung 3-17, Abbildung 4-2).

Unter Betrachtung der unterschiedlich vorgegebenen Temperaturen wird trotz allem deutlich, dass der Zuckertransporter der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* PdSUT1 insgesamt eine etwa 3-fach höhere Affinität gegenüber SUC aufweist als ZmSUT1 aus Mais (Abbildung 3-17). Die Dattelpalme scheint somit aufgrund ihrer umgebenden und extremen Standortfaktoren auch bei niedrigeren und sehr hohen Temperaturen in der Lage zu sein, effektiv SUC zu binden, so dass größere Temperaturschwankungen nur einen geringen Einfluss auf den Assimilattransport einnehmen.

4.6 Die Isoprenemission erfolgt verstärkt bei extrem hohen Temperaturen

Wüstenpflanzen sind extremen Umwelteinflüssen ausgeliefert, die in Zeiten des Klimawandels noch extremer ausfallen werden. Man geht auch davon aus, dass sich die Wüsten weiter ausbreiten werden. Um das Überleben dieser Extremophilen unter den Wüstenbedingungen zu verstehen, gilt es, mehr über diese thermotoleranten Pflanzen auf molekularer Ebene herauszufinden und in Zukunft ihre Überlebensstrategien auf Nutzpflanzen zu übertragen. Bereits vor vielen Jahren wurde festgestellt, dass von vielen höheren Pflanzen der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien) produziert wird und dieser Prozess stark temperatur- und lichtabhängig ist (Sanadze 1966; Sanadze and Kalandadze 1966; Sanadze and Kursanov 1966; Sanadze 1969; Sanadze 2004). Wie Isopren auf molekularer Ebene der Pflanze hilft bei heißen Temperaturen zu bestehen, ist allerdings noch nicht geklärt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Isopren einen Einfluss auf die Transportaktivität des membranständigen Zuckertransporters PdSUT1, in Abhängigkeit von der Temperatur, hat. Pflanzliches Isopren entsteht durch die *Isopren-Synthase* unter Abspaltung von

Pyrophosphat aus Dimethylallylpyrophosphat. In den Zeiten des Klimawandels spielen flüchtige organische Verbindungen wie Isopren eine wichtige Rolle in der Troposphäre, da sie als Reaktionspartner der verschiedenen hochreaktiven Sauerstoffverbindungen die Oxidationskapazität der Troposphäre und somit die Abbauraten anderer klimarelevanter Spurengase wie z.B. Methan beeinflussen können (Taraborrelli et al. 2012). Zudem spielt der flüchtige Kohlenwasserstoff eine Rolle bei der Bildung von Photosmog, da sie gemeinsam mit anthropogen emittierten Stickoxiden zu lokal hohen, gesundheitsschädlichen troposphärischen Ozonkonzentrationen und Photooxidantien führen können. Isopren wird somit zu den klimarelevanten Spurengasen gezählt, so dass die Emission dieses Gases aufgrund des Klimawandels in ein weltweites Interesse gerückt ist. Es bedarf somit noch weitere Aufschlüsselung „wie und warum“ höhere Pflanzen, wie z.B. die Dattelpalme *Phoenix dactylifera*, Isopren emittieren. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Emission des Isoprens die Photosynthesemembran höherer Pflanzen bei extrem heißen Temperaturen schützt bzw. stabilisiert (Sharkey and Singaas 1995). Im Zuge dessen konnte bewiesen werden, dass ab einer Temperatur über 30°C die Isoprenemission signifikant ansteigt und ihr Maximum bei etwa 45°C erreicht (Monson et al. 1992; Sharkey and Loreto 1993). Basierend auf diesen Publikationen geht man davon aus, dass die Bildung von Isopren eine Art Schutzmechanismus bei erhöhten Temperaturen darstellt (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Penuelas et al. 2005; Velikova and Loreto 2005; Velikova, Pinelli, and Loreto 2005). Jedoch bleibt bis heute die Frage offen, wie dieser flüchtige Kohlenwasserstoff den Photosyntheseapparat bei erhöhten Temperaturen schützt. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften wird Isopren in die Membran der Chloroplasten eingelagert und beeinflusst die Membranstabilität bei hohen Temperaturen (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007). Nach aktuellem Stand geht man davon aus, dass die Synthese von chloroplastidären Isoprenoiden, zu denen z.B. auch Isoprene zählen, hauptsächlich über den MEP- (2-C-Methylerythritol-4-Phosphat) Stoffwechselweg (Rohmer 2008) erfolgt, welcher bereits 2002 komplett entschlüsselt werden konnte (Adam et al. 2002). Obwohl es den Forschern gelang den vollständigen MEP-Stoffwechselweg aufzuklären, sind in Zukunft dennoch weitere Untersuchungen nötig um die vollständige Regulation des Isoprenoidstoffwechsels unter verschiedensten Umwelteinflüssen, wie z.B. Hitze, zu klären.

Da die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* hohe Isoprenemissionen bei Hitzestress produziert, wurden in einer groß angelegten Studie am Helmholtz Zentrum in München in Kooperation mit Prof. Heinz Rennenberg (Universität Freiburg) die Isoprenemission bei unterschiedlichen klimatischen Bedingungen aufgezeichnet und miteinander verglichen. Dabei wurden die Palmenpflanzen unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen und dabei die Isoprenemission in den Sommer- und Wintermonaten jeweils mit und ohne Trockenstress dokumentiert (Abbildung 4-3).

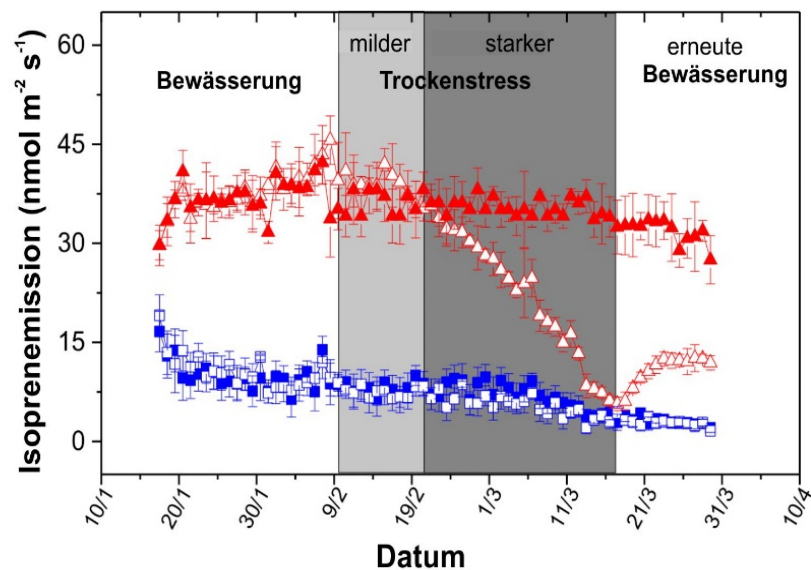


Abbildung 4-3: Isoprenemission von *Phoenix dactylifera*

Isoprenemission der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* unter sommerlichen (rote ausgefüllte Dreiecke; 40°C Mittagstemperatur) und winterlichen (blau ausgefüllte Dreiecke; 25°C Mittagstemperatur) Klimabedingungen. Zudem wurde die Isoprenemission bei den jeweiligen Bedingungen (im Sommer: weiße Dreiecke mit roter Umrandung; im Winter: weiße Dreiecke mit blauer Umrandung) zusätzlich unter versch. Trockenstressbedingungen (milder; hellgrau und starker; dunkelgrau Trockenstress) sowie vor und nach der Trockenphase (Bewässerung vor und nach dem Trockenstress; weiss) aufgezeichnet (Daten stammen aus dem Helmholtz Zentrum in München in Kooperation mit Prof. Heinz Rennenberg).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Isoprenemission der Dattelpalme zum einen unter sommerlichen klimatischen Bedingungen (= 40°C Mittagstemperatur) wesentlich verstärkt ist im Vergleich zu der ermittelten Emission im Winter (=25°C Mittagstemperatur). Zum anderen konnte auch aufgezeigt werden, dass die Isoprenemission im Sommer signifikant abfällt, sobald die Dattelpalme zusätzlich unter starkem Trockenstress gehalten wurde. Sobald die Versuchspflanze nach der Trockenphase bewässert wurde, konnte nur ein leichter Anstieg der Isoprenemission verzeichnet werden. Im Vergleich dazu wurde die Isoprenemission unter winterlichen Bedingungen durch die zusätzliche Trockenstressbelastung nicht beeinflusst (Abbildung 4-3), was darauf hindeutet, dass tatsächlich hohe Temperaturen und nicht Trockenstress für die Isoprenfreisetzung verantwortlich sind.

Auch wenn bislang der genaue Mechanismus der Isoprenwirkung bei Hitzestress noch nicht aufgeklärt werden konnte, konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass Isopren-emittierende Blätter bestimmter Pflanzen in der Lage sind, sich schnell von einem thermalen Schock zu erholen (Velikova and Loreto 2005).

4.6.1 Isopren beeinflusst die Transportaktivität von PdSUT1 nur schwach, von ZmSUT1 stark

Obwohl bislang noch nicht vollständig geklärt werden konnte, wie der flüchtige Kohlenwasserstoff den Photosyntheseapparat bei erhöhten Temperaturen schützt, existieren einige Publikationen, die Hinweise darauf geben, dass sich Isopren, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften, in die Membran der Chloroplasten einlagert und dadurch die Membranstabilität bei hohen Temperaturen beeinflusst (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007). Mittels der Molecular Dynamics (MD) Simulationstechnik und der Kernspinnresonanzspektroskopie (NMR) ist es Siwko et al. erstmals gelungen, die membranstabilisierende Wirkung von Isopren nachzuweisen. Isopren siedelt sich dabei als hydrophobes Molekül bevorzugt zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht an (Abbildung 1-7).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik geklärt werden, ob die Isoprenproduktion dazu genutzt wird, um der Pflanze zu einer höheren Temperaturtoleranz zu verhelfen. Sharkey et al. begaste Blätter der Kudzu-Bohne mit reinem Stickstoff und konnte so zeigen, dass im Licht kein Isopren gebildet wird, da kein CO₂ fixiert werden kann. Bei einer extern mit Isopren begasten Pflanze setzte der Anstieg der Photosystem-II-Fluoreszenz, welche als Maß für eine irreversible Zerstörung des Blattes gemessen wurde, erst 10°C über dem der isoprenfreien Pflanze ein. Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass Isopren in die Membran diffundiert und somit durch die Interaktion mit Membranproteinen/-lipiden zu einer höheren Thermotoleranz führt (Sharkey and Singaas 1995).

Da in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass die Temperatur einen direkten Einfluss auf die Transportaktivität und -affinität der membranständigen Transportproteine ZmSUT1 und PdSUT1 hat (Abbildung 3-17, Abbildung 4-2), sollte basierend auf diesen Erkenntnissen untersucht werden, ob der flüchtige Kohlenwasserstoff einen Einfluss auf die Transportproteine hat bzw. ob eine Akkumulation von Isopren in der Membran den Transportprozess bei extremer Hitze schützt.

Interessanterweise zeigten die TEVC-Messungen zunächst keinen Einfluss von Isopren auf den SUC-Transport beider untersuchter Transportproteine, ZmSUT1 sowie PdSUT1, in Anwesenheit von hohen SUC-Konzentrationen und einer Temperatur von 25°C (Abbildung

3-18). Da postuliert wird, dass Isopren bei hohen Temperaturen ($>30^{\circ}\text{C}$) in die Plasmamembran interkaliert und diese gegen extreme Hitze schützt (Sharkey, Chen, and Yeh 2001; Siwko et al. 2007), wurde die Substrataffinität von PdSUT1 und ZmSUT1 in An- und Abwesenheit von Isopren bei drei unterschiedlichen Temperaturen (15, 25 und 35°C) analysiert (Abbildung 3-20).

Dabei wird deutlich, dass in Anwesenheit von Isopren bei einer Temperatur von 25°C vor allem ZmSUT1 und in abgeschwächter Form auch PdSUT1 einen erhöhten K_m -Wert aufweisen. D.h. die Bindungsaffinität gegenüber SUC wird in Anwesenheit von Isopren negativ beeinflusst. Im Zuge dessen, konnte ebenso gezeigt werden, dass die Präsenz von Isopren bei allen getesteten Spannungen (+40 bis -130 mV) bei beiden Transportproteinen zu einer Abnahme hinsichtlich der Affinität gegenüber Saccharose führt (Abbildung 3-20).

Wie bereits oben erwähnt, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Isopren bei 25°C und hohen Zuckerkonzentrationen (100 mM) zu keiner Veränderung der Transportaktivität führt (Abbildung 3-18). Interessanterweise konnte im Zuge dessen jedoch beobachtet werden, dass bei niedrigen SUC-Konzentrationen die Aktivität von ZmSUT1 durch Isopren vermindert wird, während der Effekt auf die Transportströme von PdSUT1 nur gering war. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass der Effekt von Isopren reversibel ist (Abbildung 3-19).

Der Einfluss von Isopren konnte bei ZmSUT1 ebenso bei einer Temperatur von 15°C festgestellt werden, aber nicht bei 35°C (Abbildung 3-19 C). Die Transportströme von PdSUT1-exprimierender Oozyten waren weder bei 15 noch bei 35°C durch Isopren beeinflusst.

Zusammenfassend ist deshalb festzustellen, dass die Transportaktivität des Saccharosetransporters aus Mais deutlich stärker durch Isopren modifiziert wurde als es bei PdSUT1 der Fall war. Dies mag darauf hindeuten, dass die Wüstenpflanze Isopren unempfindliche Saccharosetransporter exprimiert, die Saccharose auch bei hohen Temperaturen und der damit verbundenen starken Isoprenfreisetzung transportieren kann. Zukünftige Studien müssen nun klären, ob der flüchtige Kohlenwasserstoff Isopren direkten Einfluss auf die membranständigen Transportproteine nimmt oder ob Isopren in die Membran integriert wird (Siwko et al. 2007) und somit den Saccharosetransport indirekt beeinflusst. Unabhängig vom Wirkmechanismus des flüchtigen Kohlenwasserstoffs bleibt dennoch festzuhalten, dass PdSUT1 unempfindlicher gegenüber Isoprenbegasung reagiert als sein Ortholog aus dem Mais.

4.7 SLAC1 und OST1 aus der Dattelpalme und der Gerste weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu ihren Orthologen aus Arabidopsis auf

Da die Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* extremen Stressbedingungen wie Hitze und Trockenheit ausgesetzt ist, stellt sich die Frage, wie diese robuste Pflanze in der Lage ist, bei diesen extremen Klimabedingungen den Wasserverlust über ihre Stomata zu limitieren und dennoch ausreichend CO₂ für die Photosynthese aufzunehmen.

Über die Stomata geben die Pflanzen kontrolliert Wasserdampf an die Atmosphäre ab und regulieren dadurch ihren Wasserhaushalt. Durch diese Transpiration gelingt es dem sessilen Organismus sich abzukühlen. Dabei spielt die Stomaöffnungsweite eine wichtige Rolle, da sie die Menge an einströmendem CO₂ reguliert.

Die Regulation der Stomata ist sowohl an die photosynthetischen Bedürfnisse als auch an den Wasserhaushalt der Pflanze angepasst. Wird Kohlenstoffdioxid für die Photosynthese benötigt, öffnen die Stomata, während sie bei zu hohem Wasserverlust schließen.

Neben dieser extremophilen Wüstenpflanze wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zwei Pflanzenarten aus der gemäßigten Klimazone, Gerste und Arabidopsis, untersucht. Das Getreide der Gerste stellt ebenfalls eine der wichtigsten Kulturpflanzen der Erde dar und erweist sich ebenso wie die Dattelpalme als extrem anpassungsfähig, so dass diese monokotyledone Pflanze in gemäßigtem, subarktischen als auch in subtropischen Gebieten wächst (Harlan and Zohary 1966). Aufgrund ihrer wirtschaftlichen Relevanz sowie ihrer evolutionären Nähe zur Welternährungspflanze nimmt die Gerste, welche über ein hohes genetisches Anpassungspotenzial verfügt, eine fundamentale Rolle in der Forschung bzgl. der Züchtung zukünftig stresstoleranter Pflanzensorten ein (Pickering and Johnston 2005; Varshney 2007; Varshney, Langridge, and Graner 2007). Bisherige Untersuchungen der Stomataphysiologie konzentrierten sich nahezu ausschließlich auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Prozesse, die beim Trockenstress-induzierten Stomaschluss in monokotyledonen Pflanzen ablaufen sind bisher kaum beschrieben und verstanden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu den Vorgängen in der Modellpflanze Arabidopsis die Regulation der SLAC1-Typ Anionenkanäle aus der Dattelpalme und der Gerste im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten untersucht. Der S-Typ Anionenkanal SLAC1 ist hoch spezifisch in den Schließzellen von Arabidopsis exprimiert und spielt eine essenzielle Rolle beim ABA/Trockenstress-abhängigen Stomaschluss (Negi et al. 2008; Saji et al. 2008; Vahisalu et al. 2008).

Die ersten experimentellen Untersuchungen zu SLAC1 in *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass dieses Protein beim Stomaschluss beteiligt ist, da in SLAC1-Verlustmutanten die Regulation

der Stomaweite gestört war und die S-Typ Anionenströme in Schließzellprotoplasten, im Vergleich zum Wildtyp, massiv reduziert waren (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Die Expression von SLAC1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten resultierte jedoch in keinen makroskopischen Strömen. Da SLAC1 alleine in Oozyten infunktionell vorliegt, wurde vermutet, dass dies auf das Fehlen spezifischer regulatorischer Faktoren im heterologen Expressionssystem zurückzuführen ist. Diese Vermutung konnte durch die Koexpression von SLAC1 mit unterschiedlicher Proteinkinasen wie OST1 bestätigt werden (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Geiger et al. 2010). Mittlerweile wurden einige Kinasen wie z.B. OST1, CPK21 und CPK23 identifiziert, denen eine wesentliche Rolle im ABA-vermittelten Stomaschluss bzw. bei der Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen zugeteilt werden können (Li and Assmann 1996; Johnson et al. 2002; Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002). In Anwesenheit einer aktivierenden Kinase zeigt SLAC1 Anionenströme mit langsamen Aktivierungs- sowie Deaktivierungskinetiken, ähnlich wie S-Typ Anionenkanäle, die man aus Schließzellprotoplasten kennt (Linder and Raschke 1992; Schroeder and Keller 1992). In der Schließzelle führt die Aktivierung des S-Typ Anionenkanals SLAC1 zum Ausstrom von Anionen, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt (Schroeder and Keller 1992; Grabov et al. 1997; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009), wodurch wiederum K^+ -Auswärtskanäle aktiviert werden, so dass es neben dem Ausstrom von Anionen auch zum Ausstrom von K^+ kommt (Ache et al. 2000; Becker et al. 2003; Hossy et al. 2003). Der Efflux von Kalium und Anionen führt schließlich zum Verlust des Turgordrucks in den Schließzellen und folglich zum Stomaschluss.

Da S-Typ Anionenkanäle den Stomaschluss als Antwort auf z.B. Trockenstress vermitteln, spielt das Phytohormon ABA, welches als Antwort auf Trockenheit synthetisiert wird und über den in der Einleitung beschriebenen schnellen ABA-Signaltransduktionsweg schließlich die Aktivierung von S-Typ Anionenkanäle vermittelt, eine essenzielle Rolle, so dass im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob die Wüstenpflanze *P. dactylifera* und die Nutzpflanze *Hordeum vulgare* (Gerste) einen ähnlichen oder sogar den gleichen schnellen ABA-Signalweg nutzen, um letztendlich dem Wasserverlust unter Hitze- und Trockenstress durch den Stomaschluss entgegenzuwirken.

Um herauszufinden, ob der schnelle ABA-Signalweg in den Schließzellen von *Phoenix dactylifera* und *Hordeum vulgare* bis zur Aktivierung des jeweiligen S-Typ Anionenkanals (PdSLAC1 bzw. HvSLAC1) ähnlich wie bei AtSLAC1 reguliert wird, wurde sowohl der S-Typ Anionenkanal aus der Wüstenpflanze und der Gerste als auch die Kinase PdOST1 auf Basis von Genom- und RNAseq-Daten erfolgreich identifiziert und kloniert. Anhand des phylogenetischen Stammbaums, wird deutlich, dass PdSLAC1 und HvSLAC1 Mitglieder der

Untergruppe SLAC1 repräsentierten und einen hohen Verwandtschaftsgrad zu AtSLAC1 sowie OsSLAC1 (Sun et al. 2016; Muller et al. 2017) aufweisen (Abbildung 3-21). Zudem konnte anhand der phylogenetischen Analysen gezeigt werden, dass die Kinase PdOST1 aus der Echten Dattelpalme ein Mitglied der ABA-abhängigen SnRK2-Familie mit einem hohen Verwandtschaftsgrad zu AtOST1 darstellt (Muller et al. 2017). Aufgrund der starken Homologien der klonierten Anionenkanäle und der SnRK2-Kinasen zu den entsprechenden Genen aus *Arabidopsis thaliana*, liegt die Vermutung nahe, dass die Dattelpalme und die Gerste einen ähnlichen ABA-Signaltransduktionsweg besitzen wie *Arabidopsis*. An dieser Stelle soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass weder für die Gerste noch für die Dattelpalme entsprechende SLAC1 oder OST1 Verlustmutanten existieren. Jedoch konnte zumindest für die Gerste gezeigt werden, dass sowohl SLAC1 als OST1 in den Schließzellen differenziell exprimiert sind (Schafer et al. 2018). Zudem ist in den zugänglichen Transkriptomen beider Pflanzen nur eine Kopie des Anionenkanals der Unterfamilie SLAC1 zu finden.

4.7.1 Die Aktivierung von PdSLAC1 und HvSLAC1 erfolgt mittels Proteinkinasen

Die Stomata von *Arabidopsis* SLAC1-Verlustmutanten reagierten kaum noch auf wesentliche Stimuli wie z.B. Ca^{2+} , ABA, CO_2 , ROS, Luftfeuchtigkeit, Ozon oder Dunkelheit (Negi et al. 2008; Saji et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Zudem konnten in den Schließzellen der Mutanten keine S-Typ Anionenströme mehr detektiert werden. Interessanterweise konnte AtSLAC1 zunächst nicht funktionell in heterologen Expressionssystemen exprimiert werden. Es konnte jedoch bereits einige Jahre vor der Entdeckung der SLAC1 Mutanten gezeigt werden, dass die Aktivität der S-Typ Anionenkanäle über regulatorische Mechanismen, wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung, gesteuert werden (Schmidt et al. 1995). Im Jahre 2009 gelang es schließlich die funktionellen Eigenschaften des Proteins als Anionenkanal im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten aufzuzeigen (Geiger et al. 2009). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass für eine funktionelle Expression des Kanals AtSLAC1 in Oozyten, eine Koexpression eines regulatorischen Proteins zusätzlich zu dem Kanal erforderlich ist. SLAC1 vermittelte nur dann makroskopische Anionenströme wenn der Anionenkanal gemeinsam mit der Kinase OST1 exprimiert wurde (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009). Um schließlich die Regulation von SLAC1 aus *Phoenix dactylifera* und *Hordeum vulgare* mittels der SnRK2 Kinase zu analysieren, wurde jeweils die Kanalaktivität in An- und Abwesenheit der Kinase in *Xenopus* Oozyten mittels der TEVC-Technik bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die alleinige Expression der SLAC1 Anionenkanäle in Oozyten keine messbaren Anionenströme detektiert werden konnten (Abbildung 3-22,

Abbildung 3-23). Sobald jedoch die jeweilige Kinase OST1 zusammen mit SLAC1 koexprimiert wurde, konnten in Anwesenheit von Nitrat charakteristische S-Typ Anionenströme vernommen werden. Interessanterweise wurden in Anwesenheit von Chlorid weder mit dem Dattelpalmen- noch mit dem Gersten-Anionenkanal Anionenströme detektiert (Abbildung 3-22, Abbildung 3-23). Das unterscheidet die beiden monokotyledonen Anionenkanäle deutlich vom dikotylen SLAC1 aus *Arabidopsis*. In Anwesenheit von 10 mM Nitrat wiesen die SLAC1 Kanäle aus Gerste und Dattelpalme jedoch S-Typ Anionenkanal typische Kinetiken auf, wie z.B. eine langsame Deaktivierungskinetik bei hyperpolarisierenden Spannungen (Abbildung 3-22, Abbildung 3-23). Somit konnte bewiesen werden, dass, wie auch der ausgiebig charakterisierte S-Typ Anionenkanal AtSLAC1 aus *Arabidopsis thaliana*, nur durch die Koexpression einer aktivierenden Proteinkinase makroskopische Ströme in Oozyten hervorruft. Die erfolgreiche Aktivierung der monokotyledonen Kanäle PdSLAC1 und HvSLAC1 mit der Kinase OST1 aus *Arabidopsis* verdeutlicht, dass es sich um eine Spezies-übergreifende Konservierung des ABA-Signalwegs handelt, was die essenzielle Bedeutung des ABA-gesteuerten Stomaschlusses hervorhebt.

4.7.2 Negative Regulation der S-Typ Anionenkanäle ist Art-übergreifend konserviert

In vorangegangenen Studien zu AtSLAC1 konnte gezeigt werden, dass verschiedene Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Kinasen einer Rolle bei der Aktivierung des Anionenkanals zugesprochen werden können. Darüber hinaus gelang es Phosphatasen der PP2C-Familie, wie z.B. ABI1 und ABI2, zu identifizieren, die in Abwesenheit von ABA sowohl die SLAC1-aktivierenden Kinasen als auch SLAC1 selbst inhibieren (Geiger et al. 2010; Brandt et al. 2012; Scherzer et al. 2012; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014).

Da ABI1 und ABI2 die Reaktion der Schließzellen auf Nitrat inhibieren (Desikan et al. 2002), wurde für die weitere Entschlüsselung der Regulation von monokotyledonen SLAC1 Anionenkanälen AtABI1 mit dem SLAC1/OST1 Pärchen in Oozyten koexprimiert und die Aktivität von PdSLAC1 bzw. HvSLAC1 untersucht. Ähnlich wie bei der negativen Regulation von AtSLAC1 durch ABI1, verstummten auch die Anionenströme der monokotyledonen SLAC1 Isoformen in Anwesenheit der PP2C Phosphatase (Abbildung 3-25 B, Abbildung 3-26 B). Es kann also gefolgert werden, dass zwischen dikotyledonen und monokotyledonen Pflanzen ein hoher Grad der Konservierung des schnellen ABA-Signalwegs zur Regulation des SLAC1 Anionenkanals in den jeweiligen Schließzellen vorliegt. Die erfolgreiche Koexpression von SLAC1 aus unterschiedlichen Pflanzenspezies mit ABA-Signalkomponenten aus *Arabidopsis thaliana* in *Xenopus* Oozyten erlaubte deshalb, sowohl die Aktivierung des Kanals in einem vom Pflanzenhintergrund isolierten System zu beobachten, als auch die Spezies-übergreifende Konservierung von Signalkomplexen des

ABA-Signalwegs von Schließzellen dikotyledoner und monokotyledoner Pflanzen zu verdeutlichen.

4.7.3 Nitrat dient als Ligand für die Aktivierung von SLAC1 Anionenkanälen aus monokotyledonen Pflanzen

Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass HvSLAC1 und PdSLAC1 nur unter Koexpression einer Kinase und in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat aktiv sind (Abbildung 3-22, Abbildung 3-23).

In bisherigen Studien über SLAC1 aus *Arabidopsis* war die Phosphorylierung des Kanals durch eine Kinase in *Xenopus* Oozyten für die Aktivierung von SLAC1 ausreichend. Selbst in Abwesenheit permeierender Anionen wie Cl^- und NO_3^- im externen Medium konnten mit AtSLAC1 Anionenausströme aus der Oozyte aufgezeichnet werden (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Geiger et al. 2010). Sowohl durch die externe Zugabe von Cl^- (Geiger et al., 2009), als auch von NO_3^- (Geiger et al. 2011) verschob sich die relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. P_o) von AtSLAC1 nur schwach zu negativeren Membranpotenzialen. Das Nitrat-abhängige Schalten der monokotyledonen SLAC1 Kanäle PdSLAC1, HvSLAC1 aber auch OsSLAC1 unterscheidet sie also deutlich von Vertretern der zweikeimblättrigen SLAC1 Familie, wie z.B. NtSLAC1 aus dem Tabak, LeSLAC1 aus der Tomate oder AtSLAC1 aus der Ackerschmalwand (Schafer et al. 2018).

Jedoch konnte eine strikte Nitrat-abhängige Aktivierung bereits bei den SLAC1 Homologen AtSLAH3 und AtSLAH2 aus *Arabidopsis* beobachtet werden (Geiger et al. 2011; Maierhofer, Diekmann, et al. 2014; Maierhofer, Lind, et al. 2014). Bei AtSLAH2 konnte neben der Aktivierbarkeit durch Nitrat sogar eine strikte Nitratselektivität nachgewiesen werden. Die Gruppe der AtSLAH1/4-Kanäle besitzen vermutlich eine modifizierende Wirkung auf die anderen S-Typ Anionenkanäle, da sie selbst elektrisch still sind, aber mit SLAH3-ähnlichen Anionenkanälen interagieren (Cubero-Font et al. 2016). Wie auch bei AtSLAC1 ist bei SLAH2 und SLAH3 eine Interaktion mit einer aktivierenden Kinase für eine erfolgreiche Kanalaktivierung erforderlich (Geiger et al. 2011; Maierhofer, Lind, et al. 2014).

Bei der elektrophysiologischen Analyse der Nitratabhängigkeit von PdSLAC1 und HvSLAC1 wurde deutlich, dass Nitrat das spannungsabhängige Öffnen der Anionenkanäle zu hyperpolarisierten – also physiologischen – Membranpotenzialen verschiebt. So sorgt der Ligand Nitrat dafür, dass monokotyledone SLAC1 Kanäle bei physiologischen Membranpotenzialen von < -100 mV aktivieren und den Stomaschluss auslösen, wenn sie gleichzeitig durch die ABA-abhängige Kinase OST1 phosphoryliert werden. Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Nitrat-„primings“ legt nahe, dass physiologische Nitratkonzentrationen im Apoplasten von 2-5 mM für die Aktivierung von HvSLAC1 und PdSLAC1 völlig ausreichend sind (Speer and Kaiser 1991). Umfassende Analysen der

relativen Permeabilität von HvSLAC1 und PdSLAC1 sowie die Bestimmung der Chloridleitfähigkeit in Anwesenheit aktivierender Nitratkonzentrationen im Außenmedium zeigten deutlich, dass beide Anionenkanäle Chlorid permeieren lassen, sobald Nitrat als Ligand anwesend ist. Dieses Verhalten konnte bereits bei dem SLAC1 Homologon AtSLAH3 gezeigt werden (Geiger et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit experimentell nachgewiesen werden, dass der Anionenkanal aus *Phoenix dactylifera* ein sehr ähnliches Verhalten wie AtSLAH3 aufweist, da in beiden Fällen Nitrat als aktivierender Ligand fungiert. Im Gegensatz zu PdSLAC1, HvSLAC1 und AtSLAH3, weist AtSLAC1 auch in einer Nitrat-freien externen Lösung die volle Kanalaktivität im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten auf, sobald dieser mit OST1 bzw. CPK21/23 koexprimiert wird (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Geiger et al. 2010).

Ein vergleichbarer Effekt konnte zuvor für tierische CLC-Kanäle aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den pflanzlichen Anionenkanälen wirkt bei den tierischen CLCs allerdings Chlorid als aktivierender Ligand. Darüber hinaus wird die Aktivität der tierischen CLCs sowohl von der externen als auch von der internen Cl⁻-Konzentration beeinflusst (Pusch et al. 1999).

4.7.4 Ein IA-Motiv in TMD3 verleiht SLAC1 Anionenkanälen aus monokotyledonen Pflanzen ihre Nitratabhängigkeit

Um die molekulare Basis der Nitratabhängigkeit von SLAC1 Anionenkanälen aus monokotyledonen Pflanzen zu verstehen, wurden Sequenzanalysen von SLAC1 Kanälen aus ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde ein Motiv in der Mitte von TMD3 identifiziert, das sich zwischen ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen deutlich unterscheidet. Während dikotyledone Pflanzen entweder ein IV- oder ein VV-Motiv besitzen, ist in monokotyledonen Pflanzen ausschließlich ein IA-Motiv zu erkennen. Ein Austausch des VV-Motivs zu einem IA-Motiv in AtSLAC1 (V272I V273A) verwandelte den Nitrat-insensitiven AtSLAC1 tatsächlich in einen Nitrat-abhängigen Anionenkanal mit Eigenschaften, wie sie PdSLAC1 und HvSLAC1 zeigen (Abbildung 3-33).

D.h. das IA-Motiv aus einkeimblättrigen SLAC1 Anionenkanälen ist notwendig und ausreichend, um AtSLAC1 in einen Nitrat-aktivierten Anionenkanal zu konvertieren. Allerdings zeigten PdSLAC1 und HvSLAC1 Anionenkanäle, die mit einem VV-Motiv ausgestattet waren, selbst in der Anwesenheit von Nitrat kaum messbare Anionenströme. Das deutet darauf hin, dass weitere Domänen/Aminosäurereste für die Übertragung der AtSLAC1-Eigenschaften auf Pd/HvSLAC1 notwendig sind.

Um dieser Frage nachzugehen, benutzte Morten Egevan Jörgensen eine evolutionäre Kopplungsanalyse, die die Evolution des IA- bzw. VV-Motivs mit weiteren Aminosäuren

vorhersagt. Interessanterweise lagen die 50 wahrscheinlichsten Aminosäurereste, die mit dem VV/IA-Motiv coevoluierten alle in den TMDs 1-3. Auf Grundlage dieser bioinformatischen Analyse wurden Chimären zwischen AtSLAC1 und den monokotyledonen SLAC1 hergestellt und hinsichtlich ihrer Nitratabhängigkeit getestet. Es stellte sich heraus, dass man TMD1-3 austauschen muss, um die Nitrat-insensitivität von AtSLAC1 auf Hv bzw. PdSLAC1 zu übertragen.

Vergleichende Struktur-Funktionsuntersuchungen an AtSLAH2 weisen auf eine spezielle Aminosäure in der Transmembrandomäne 3 hin (S228 in SLAH2), die einen starken Einfluss auf das Öffnungsverhalten und die Selektivität von SLAC/SLAH Anionenkanälen hat (Chen et al. 2010; Maierhofer, Lind, et al. 2014). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sobald diese polare Aminosäure S228 durch eine unpolare AS getauscht wird, sich der strikte Nitrat-selektive SLAH2 in ein Chlorid/Nitrat-permeablen Anionenkanal umwandelt (Maierhofer, Lind, et al. 2014). Die Position 228, welche in SLAH2 für die Nitrat-abhängige Kanalaktivierung verantwortlich ist, ist identisch mit Position 273 in Arabidopsis bzw. 287 in Gerste und 286 in der Dattelpalme der untersuchten SLAC1s, bei denen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das monokoytspezifische IA-Motiv an dieser Position für die Nitrataktivierung entscheidend ist.

Somit konnte im Rahmen meiner Dissertation gezeigt werden, dass die Gerste und die Dattelpalme einen Vorteil gegenüber anderen Pflanzen aufweisen und dieser ihnen ermöglicht, auch bei längeren Trockenphasen zu überleben, da nicht nur das Trockenstresshormon ABA, welches bei Wassermangel produziert wird, sondern zusätzlich auch Nitrat bei den Monokotyledonen vorhanden sein muss, um die Stomata vollständig und effizient zu schließen.

Die Monokotyledonen können somit nicht nur die Wasserverfügbarkeit über die ABA Synthese registrieren, sondern sie sind auch in der Lage, gleichzeitig die Photosyntheserate über den Nitratgehalt zu erkennen und haben somit einen entscheidenden Vorteil gegenüber Dikots. Durch diese einzigartige Fähigkeit gelingt es den Monokotyledonen, sich unter Stressbedingungen zwischen dem Verhungern und dem Verdursten zu entscheiden, so dass dieses monokotspezifische IA-Motiv den Schließzellen einen evolutionären Vorteil verschafft.

4.7.5 Die Evolution Nitrat-abhängiger SLAC1 Anionenkanäle

Aufgrund der besonderen Morphologie der Monokots wurde im Rahmen meiner Doktorarbeit in Kooperation mit Johannes Herrmann und Heike Müller (AG Ache/Hedrich) analysiert, ob die Nebenzellen, welche die Schließzellen umgeben, diesen landwirtschaftlich wichtigen Nutzpflanzen einen weiteren Vorteil gegenüber Trockenheit bieten bzw. zu einer effizienteren

Stomaregulierung verhelfen. So konnte schließlich anhand von *Hordeum vulgare* und *Phoenix dactylifera* gezeigt werden, dass die Stomabewegung, verglichen mit der Modellpflanze *Arabidopsis*, wesentlich schneller abläuft und nur in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat funktioniert (Muller et al. 2017; Schafer et al. 2018). Die enge Verknüpfung zwischen Schließ- und Nebenzellen scheint dafür verantwortlich zu sein, einen sehr schnellen Ionen- und Wassertransfer zwischen den beiden Zelltypen zu ermöglichen (Raschke and Fellows 1971). Der effiziente Stomaschluss erfolgt somit bei Getreide wie der Gerste sowie auch bei der Wüstenpalme durch einen schnellen Transfer von Ionen zwischen den beiden Zelltypen (Schafer et al. 2018) (Abbildung 4-4).

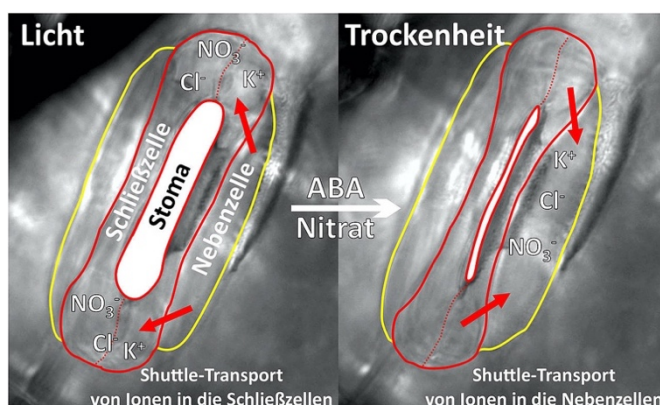


Abbildung 4-4: Die Transportvorgänge innerhalb der Stomata bei Gräsern

Beim Öffnen und Schließen der Stomata werden Ionen im Shuttle-Transport zwischen Schließ- (rot umrandet) und Nebenzellen (gelb umrandet) bewegt (Die Abbildung wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dietmar Geiger zur Verfügung gestellt).

Die Verknüpfung zwischen Schließ- und Nebenzellen ermöglicht den Monokotyledonen, dass beim Schließen der Pore Kalium, Nitrat und Chlorid aus den Schließzellen in die Nebenzellen transportiert und gespeichert werden. Beim Öffnen der Pore werden diese Ionen wieder an die Schließzellen weitergeleitet, so dass eine besonders effektive Stomaregulierung gewährleistet wird. Interessanterweise konnte im Rahmen meiner Arbeit gezeigt werden, dass bei der Brauereigerste und anderen Monokotyledonen wie der echten Dattelpalme zusätzlich zum Trockenstresshormon ABA auch Nitrat verfügbar sein muss, um einen erfolgreichen Stomaschluss zu ermöglichen (Muller et al. 2017; Schafer et al. 2018).

Es konnte bereits in Algen, Moose, Farne und Blütenpflanzen SLAC1 und OST1 orthologe Gene identifiziert werden. Die Frage blieb allerdings, wann sich im Laufe der Evolution eine funktionelle Interaktion zwischen OST1 Kinasen und SLAC1 Anionenkanälen ausgeprägt hat und wann Schließzellen die Fähigkeit erworben haben, den Öffnungsgrad der Stomata über ABA zu regulieren (Brodribb and McAdam 2011; Merced and Renzaglia 2014; Lind et al. 2015; Cai et al. 2017).

Da für Algen und Wasserpflanzen Trockenheit keine Rolle spielt, haben dagegen frühe Landpflanzen wie Moose und Farne schon vor etwa 480 Millionen Jahren eine Toleranz gegenüber Trockenperioden entwickelt. Die ersten Stomata entwickelten sich erst in den

Laubmoosen, obwohl bereits die Grünalgen über OST1 Kinasen und SLAC1-Kanäle verfügen (Lind et al. 2015).

In diesem Zusammenhang konnte Lind et al. beweisen, dass bereits die frühen OST1 Kinasen aus Algen und Moosen in der Lage sind, SLAC1 Kanäle aus höheren Pflanzen (Samenpflanzen) zu aktivieren. ABI1 Phosphatasen aus den basalen Pflanzen konnten die Aktivität der OST1 Kinasen inhibieren (Lind et al. 2015). Einige der wesentlichen Komponenten des ABA-Signalweges (OST1 und ABI1) sind demnach bereits in *Klebsormidium nitens* vorhanden und blieben im Laufe der Evolution stark konserviert. Zu diesem Zeitpunkt der Evolution sind sie jedoch noch nicht für die Stomaregulierung zuständig, da die ersten Stomata erst in den Sporophyten der Laubmoose aufzufinden sind (Raven 2002; Franks and Farquhar 2007; Chen et al. 2017). Erst beim Laubmoos *Physcomitrella patens* konnte die erste funktionelle Beziehung zwischen der OST1 Kinase und dem SLAC1 Kanal aufgezeigt werden, welche jedoch im Laufe der Entstehung der Streptophyten scheinbar wieder verloren ging. Der Kanal der Grünalge (KnSLAC1) und des Lebermooses (MpSLAC1) konnten zwar als funktioneller S-Typ Anionenkanal beschrieben werden, jedoch wurde zu diesem Zeitpunkt der Evolution die Aktivierung der Kanäle nicht über Komponenten des ABA-Signalweges bestimmt (Lind et al. 2015). Auch die Regulation der SLAC1 Kanalaktivität von *Marchantia polymorpha* und *Klebsormidium nitens* ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Die SLAC1 Kanäle der ersten Gefäßpflanzen aus *Selaginella* und *Ceratoperis* mit voll entwickelten Stomata passten sich im Laufe der Evolution immer mehr an die regulatorischen Komponenten an. Neben der benötigten OST1 Kinase entwickelten sich die Phosphorylierungsstellen im N-Terminus sowie eine essenzielle konservierte Domäne des C-Terminus zur Interaktion mit OST1 der Kanäle weiter. Jedoch reichten auch diese funktionellen Domänen nicht aus, um die Kanäle durch OST1 Kinasen zu aktivieren. Erst während der Entwicklung der Samenpflanzen konnte eine vollständige Regulation der Anionenkanäle über den OST1-basierten ABA-Signalweg erreicht werden (Lind et al. 2015).

Im Rahmen meiner Doktorarbeit stellt sich nun abschließend die Frage, wann die Nitratabhängigkeit der SLAC1 Aktivierung während der Evolution der Landpflanzen auftrat.

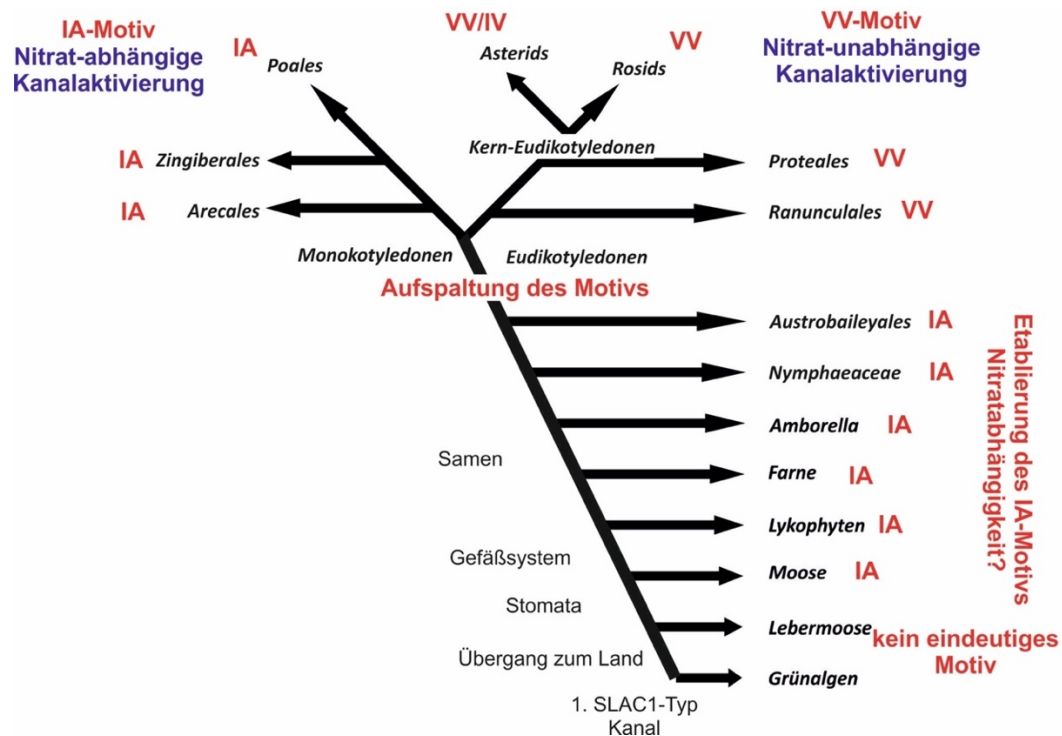


Abbildung 4-5: Die Evolution des schnellen ABA-abhängigen Stomaschlusses über SLAC1

Obwohl das IA-Motiv in SLAC1 Kanälen erstmals bei den Moosen auftaucht, erwarben erst die monokotyledonen Pflanzen ihre Nitratabhängigkeit. Das Schaltverhalten von SLAC1 Kanälen aus dikotyledonen Pflanzenarten bleibt dagegen nitratabhängig.

Basierend auf einem phylogenetischen Stammbaum aller verfügbaren SLAC1 Orthologen zeigt sich, dass bei dem ersten SLAC1 Kanal der Grünalge noch kein eindeutiges Motiv auf TMD3 zu erkennen ist. Interessanterweise verfügen bereits die Moose über das IA-Motiv, jedoch weisen erst die monokotyledonen Pflanzen eine Nitrat-abhängige Aktivierung der SLAC1 Anionenkanäle auf. Das VV-Motiv dagegen, das für ein Nitrat-unabhängiges Schaltverhalten von SLAC1 Kanälen aus zweikeimblättrigen Pflanzen essenziell ist, tritt erst bei der Aufspaltung zwischen mono- und dikotyledonen Pflanzen auf (Abbildung 4-5).

Durch die Analyse der Nitrat-abhängigen Regulierung der SLAC1 Kanäle aus unterschiedlichen Pflanzenspezies konnte somit im Rahmen meiner Arbeit ein fundamentaler Unterschied hinsichtlich der Stomaregulierung monokotyler und dikotyler Pflanzen aufgezeigt werden. Auch wenn der physiologische Hintergrund der Nitrat-abhängigen Regulation von SLAC1 Kanälen in Schließzellen von Monokotyledonen noch nicht aufgeklärt werden konnte, kann man spekulieren, dass die Nitrat-abhängigen SLAC1 Anionenkanäle die Wasserverfügbarkeit und die Stickstoffversorgung der Pflanze integrieren und so den Öffnungszustand der Stomata regulieren. Da der ABA-Signalweg aus Arabidopsis bereits weitestgehend erforscht ist, könnte nun die Entdeckung des Nitrat-abhängigen IA-Motivs der Monokots als eine Stellschraube für neue Züchtungen dienen. Durch die neuen Erkenntnisse könnten möglicherweise dikotyledone Nutzpflanzen wie z.B. Kartoffeln und Tomaten mit Nitrat-

abhängigen SLAC1 Anionenkanälen gezüchtet werden, die eventuell besser mit Wasser- und Stickstoffknappheit zurechtkommen.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- Abramson, J., S. Iwata, and H. R. Kaback. 2004. 'Lactose permease as a paradigm for membrane transport proteins - (Review)', *Molecular Membrane Biology*, 21: 227-36.
- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, and S. Iwata. 2003. 'Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*', *Science*, 301: 610-15.
- Ache, P., D. Becker, N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema, and R. Hedrich. 2000. 'GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel', *Febs Letters*, 486: 93-98.
- Adam, P., S. Hecht, W. G. Eisenreich, J. Kaiser, T. Grawert, D. Arigoni, A. Bacher, and F. Rohdich. 2002. 'Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 12108-13.
- Afoufa-Bastien, D., A. Medici, J. Jeauffre, P. Coutos-Thevenot, R. Lemoine, R. Atanassova, and M. Laloi. 2010. 'The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling', *Bmc Plant Biology*, 10.
- Al-Dous, E. K., B. George, M. E. Al-Mahmoud, M. Y. Al-Jaber, H. Wang, Y. M. Salameh, E. K. Al-Azwani, S. Chaluvadi, A. C. Pontaroli, J. DeBarry, V. Arondel, J. Ohlogge, I. J. Saie, K. M. Suliman-Elmeer, J. L. Bennetzen, R. R. Kruegger, and J. A. Malek. 2011. 'De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*)', *Nature Biotechnology*, 29: 521-U84.
- Al-Farsi, M., C. Alasalvar, A. Morris, M. Baron, and F. Shahidi. 2005. 'Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7592-99.
- Al-Mssallem, I. S., S. N. Hu, and X. W. Zhang. 2013. 'Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L', *Nature Communications*, 4.
- Allaway, W. G. 1973. 'Accumulation of Malate in Guard Cells of *Vicia-Faba* during Stomatal Opening', *Planta*, 110: 63-70.
- Ames, N., C. Rhymer, B. Rossnagel, M. Therrien, D. Ryland, S. Dua, and K. Ross. 2006. 'Utilization of diverse hulless barley properties to maximize food product quality', *Cereal Foods World*, 51: 23-28.
- Aoki, N., T. Hirose, G. N. Scofield, P. R. Whitfeld, and R. T. Furbank. 2003. 'The sucrose transporter gene family in rice', *Plant and Cell Physiology*, 44: 223-32.
- Aoki, N., T. Hirose, S. Takahashi, K. Ono, K. Ishimaru, and R. Ohsugi. 1999. 'Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter maize (*Zea mays* L.)', *Plant and Cell Physiology*, 40: 1072-78.
- Aoki, N., G. N. Scofield, X. D. Wang, J. W. Patrick, C. E. Offler, and R. T. Furbank. 2004. 'Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues', *Planta*, 219: 176-84.
- Atkinson, R. 1997. 'Gas-phase tropospheric chemistry of volatile organic compounds .1. Alkanes and alkenes', *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 26: 215-90.
- Bachmann, M., P. Matile, and F. Keller. 1994. 'Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga-Reptans* L - Cold-Acclimation, Translocation, and Sink to Source Transition - Discovery of Chain Elongation Enzyme', *Plant Physiology*, 105: 1335-45.
- Baker, R. F., K. A. Leach, N. R. Boyer, M. J. Swyers, Y. Benitez-Alfonso, T. Skopelitis, A. Luo, A. Sylvester, D. Jackson, and D. M. Braun. 2016. 'Sucrose Transporter ZmSut1 Expression and Localization Uncover New Insights into Sucrose Phloem Loading', *Plant Physiology*, 172: 1876-98.

- Baker, R. F., K. A. Leach, and D. M. Braun. 2012. 'SWEET as Sugar: New Sucrose Effluxers in Plants', *Molecular Plant*, 5: 766-68.
- Barbier-Brygoo, H., A. De Angeli, S. Filleur, J. M. Frachisse, F. Gambale, S. Thomine, and S. Wege. 2011. 'Anion Channels/Transporters in Plants: From Molecular Bases to Regulatory Networks', *Annual Review of Plant Biology*, Vol 62, 62: 25-51.
- Barker, L., C. Kuhn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Hirner, H. Hellmann, W. Schulze, J. M. Ward, and W. B. Frommer. 2000. 'SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements', *Plant Cell*, 12: 1153-64.
- Bauer, H., P. Ache, S. Lautner, J. Fromm, W. Hartung, K. A. S. Al-Rasheid, S. Sonnewald, U. Sonnewald, S. Kneitz, N. Lachmann, R. R. Mendel, F. Bittner, A. M. Hetherington, and R. Hedrich. 2013. 'The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis', *Current Biology*, 23: 53-57.
- Becker, D., S. Hoth, P. Ache, S. Wenkel, M. R. G. Roelfsema, O. Meyerhoff, W. Hartung, and R. Hedrich. 2003. 'Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress', *Febs Letters*, 554: 119-26.
- Behnke, K., M. Loivamaki, I. Zimmer, H. Rennenberg, J. P. Schnitzler, and S. Louis. 2010. 'Isoprene emission protects photosynthesis in sunfleck exposed Grey poplar', *Photosynthesis Research*, 104: 5-17.
- Bergmann, D. C., and F. D. Sack. 2007. 'Stomatal development', *Annual Review of Plant Biology*, 58: 163-81.
- Berry, J., and O. Bjorkman. 1980. 'Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher-Plants', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 31: 491-543.
- Bick, J. A., A. Neelam, E. Smith, S. J. Nelson, J. L. Hall, and L. E. Williams. 1998. 'Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*', *Plant Molecular Biology*, 38: 425-35.
- Blatt, M. R. 1992. 'K⁺ Channels of Stomatal Guard-Cells - Characteristics of the Inward Rectifier and Its Control by Ph', *Journal of General Physiology*, 99: 615-44.
- Boller, T., and A. Wiemken. 1986. 'Dynamics of Vacuolar Compartmentation', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 37: 137-64.
- Boorer, K. J., D. D. F. Loo, W. B. Frommer, and E. M. Wright. 1996. 'Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose cotransporter StSUT1', *Journal of Biological Chemistry*, 271: 25139-44.
- Boorer, K. J., D. D. F. Loo, and E. M. Wright. 1994. 'Steady-State and Presteady-State Kinetics of the H⁺/Hexose Cotransporter (Stp1) from Arabidopsis-Thaliana Expressed in *Xenopus-Oocytes*', *Journal of Biological Chemistry*, 269: 20417-24.
- Bouche-Pillon, S., P. Fleurat-Lessard, J. C. Fromont, R. Serrano, and J. L. Bonnemain. 1994. 'Immunolocalization of the Plasma Membrane H⁺ -ATPase in Minor Veins of *Vicia faba* in Relation to Phloem Loading', *Plant Physiology*, 105: 691-97.
- Bourgis, F., A. Kilaru, X. Cao, G. F. Ngando-Ebongue, N. Drira, J. B. Ohlrogge, and V. Arondel. 2011. 'Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning (vol 108, pg 12527, 2011)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 18186-86.
- Brandt, B., D. E. Brodsky, S. W. Xue, J. Negi, K. Iba, J. Kangasjarvi, M. Ghassemian, A. B. Stephan, H. H. Hu, and J. I. Schroeder. 2012. 'Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 10593-98.
- Brandt, B., S. Munemasa, C. Wang, D. Nguyen, T. M. Yong, P. G. Yang, E. Poretsky, T. F. Belknap, R. Waadt, F. Aleman, and J. I. Schroeder. 2015. 'Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells', *Elife*, 4.

- Braun, D. M., and T. L. Slewinski. 2009. 'Genetic Control of Carbon Partitioning in Grasses: Roles of Sucrose Transporters and Tie-dyed Loci in Phloem Loading', *Plant Physiology*, 149: 71-81.
- Brilli, F., C. Barta, A. Fortunati, M. Lerdau, F. Loreto, and M. Centritto. 2007. 'Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (*Populus alba*) saplings', *New Phytologist*, 175: 244-54.
- Brodribb, T. J., and S. A. M. McAdam. 2011. 'Passive Origins of Stomatal Control in Vascular Plants', *Science*, 331: 582-85.
- Brownlee, C. 2018. 'Stomatal Physiology: Cereal Successes', *Current Biology*, 28: R551-R53.
- Bruggemann, N., and J. P. Schnitzler. 2002. 'Comparison of isoprene emission, intercellular isoprene concentration and photosynthetic performance in water-limited oak (*Quercus pubescens* Willd. and *Quercus robur* L.) Saplings', *Plant Biology*, 4: 456-63.
- Burkle, L., J. M. Hibberd, W. P. Quick, C. Kuhn, B. Hirner, and W. B. Frommer. 1998. 'The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves', *Plant Physiology*, 118: 59-68.
- Buttner, M., and N. Sauer. 2000. 'Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology', *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1465: 263-74.
- Cai, S. G., G. Chen, Y. Y. Wang, Y. Q. Huang, D. B. Marchant, Y. Z. Wang, Q. Yang, F. Dai, A. Hills, P. J. Franks, E. Nevo, D. E. Soltis, P. S. Soltis, E. Sessa, P. G. Wolf, D. W. Xue, G. P. Zhang, B. J. Pogson, M. R. Blatt, and Z. H. Chen. 2017. 'Evolutionary Conservation of ABA Signaling for Stomatal Closure', *Plant Physiology*, 174: 732-47.
- Carpaneto, A., D. Geiger, E. Bamberg, N. Sauer, J. Fromm, and R. Hedrich. 2005. 'Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 21437-43.
- Carpaneto, A., H. Koepsell, E. Bamberg, R. Hedrich, and D. Geiger. 2010. 'Sucrose- and H⁺-Dependent Charge Movements Associated with the Gating of Sucrose Transporter ZmSUT1', *Plos One*, 5.
- Chandran, D., A. Reinders, and J. M. Ward. 2003. 'Substrate specificity of the Arabidopsis thaliana sucrose transporter AtSUC2', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 44320-25.
- Chaves, M. M., J. P. Maroco, and J. S. Pereira. 2003. 'Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant', *Functional Plant Biology*, 30: 239-64.
- Chaves, M. M., J. S. Pereira, J. Maroco, M. L. Rodrigues, C. P. P. Ricardo, M. L. Osorio, I. Carvalho, T. Faria, and C. Pinheiro. 2002. 'How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth', *Annals of Botany*, 89: 907-16.
- Chen, L. Q., X. Q. Qu, B. H. Hou, D. Sosso, S. Osorio, A. R. Fernie, and W. B. Frommer. 2012. 'Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport', *Science*, 335: 207-11.
- Chen, L. S., and D. R. Bush. 1997. 'LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 115: 1127-34.
- Chen, Y. H., L. Hu, M. Punta, R. Bruni, B. Hillerich, B. Kloss, B. Rost, J. Love, S. A. Siegelbaum, and W. A. Hendrickson. 2010. 'Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves', *Nature*, 467: 1074-U157.
- Chen, Z. H., G. Chen, F. Dai, Y. Z. Wang, A. Hills, Y. L. Ruan, G. P. Zhang, P. J. Franks, E. Nevo, and M. R. Blatt. 2017. 'Molecular Evolution of Grass Stomata', *Trends in Plant Science*, 22: 124-39.
- Cheng, W. H., A. Endo, L. Zhou, J. Penney, H. C. Chen, A. Arroyo, P. Leon, E. Nambara, T. Asami, M. Seo, T. Koshiba, and J. Sheen. 2002. 'A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions', *Plant Cell*, 14: 2723-43.
- Cho, S. S., L. Qi, G. C. Fahey, and D. M. Klurfeld. 2013. 'Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease', *American Journal of Clinical Nutrition*, 98: 594-619.

- Christmann, A., T. Hoffmann, I. Teplova, E. Grill, and A. Muller. 2005. 'Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo Imaging of water-stressed Arabidopsis', *Plant Physiology*, 137: 209-19.
- Christmann, A., E. W. Weiler, E. Steudle, and E. Grill. 2007. 'A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage', *Plant Journal*, 52: 167-74.
- Ciais, P., M. Reichstein, N. Viovy, A. Granier, J. Ogee, V. Allard, M. Aubinet, N. Buchmann, C. Bernhofer, A. Carrara, F. Chevallier, N. De Noblet, A. D. Friend, P. Friedlingstein, T. Grunwald, B. Heinesch, P. Keronen, A. Knohl, G. Krinner, D. Loustau, G. Manca, G. Matteucci, F. Miglietta, J. M. Ourcival, D. Papale, K. Pilegaard, S. Rambal, G. Seufert, J. F. Soussana, M. J. Sanz, E. D. Schulze, T. Vesala, and R. Valentini. 2005. 'Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003', *Nature*, 437: 529-33.
- Cole, K. S., and J. W. Moore. 1960. 'Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic', *Biophys J*, 1: 1-14.
- Cook, G. D., J. R. Dixon, and A. C. Leopold. 1964. 'Transpiration - Its Effects on Plant Leaf Temperature', *Science*, 144: 546-&.
- Cookson, P., and A. Lepiece. 2001. 'Could date palms ever disappear from the Batinah? Salination of a coastal plain in the Sultanate of Oman,' in *Water in the Arabian Peninsula: Problems and Policies*, ed. Mahdi K. A., editor. (Reading: Ithaca Press, Garnet Publishing Ltd.): 221-35.
- Cowan, I. R., and G. D. Farquhar. 1977. 'Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment', *Symp Soc Exp Biol*, 31: 471-505.
- Croteau, R. 1987. 'Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenoids', *Chemical Reviews*, 87: 929-54.
- Cubero-Font, P., T. Maierhofer, J. Jaslan, M. A. Rosales, J. Espartero, P. Diaz-Rueda, H. M. Muller, A. L. Hurter, K. A. S. AL-Rasheid, I. Marten, R. Hedrich, J. M. Colmenero-Flores, and D. Geiger. 2016. 'Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation', *Current Biology*, 26: 2213-20.
- Dawson, I. K., J. Russell, W. Powell, B. Steffenson, W. T. B. Thomas, and R. Waugh. 2015. 'Barley: a translational model for adaptation to climate change', *New Phytologist*, 206: 913-31.
- DeMichele, D. W., and P. J. Sharpe. 1973. 'An analysis of the mechanics of guard cell motion', *Journal of Theoretical Biology*, 41: 77-96.
- Demir, F., C. Horntrich, J. O. Blachutzik, S. Scherzer, Y. Reinders, S. Kierszniowska, W. X. Schulze, G. S. Harms, R. Hedrich, D. Geiger, and I. Kreuzer. 2013. 'Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 8296-301.
- Derrer, C., A. Wittek, E. Bamberg, A. Carpaneto, I. Dreyer, and D. Geiger. 2013. 'Conformational Changes Represent the Rate-Limiting Step in the Transport Cycle of Maize SUCROSE TRANSPORTER1', *Plant Cell*, 25: 3010-21.
- Desikan, R., R. Griffiths, J. Hancock, and S. Neill. 2002. 'A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16314-18.
- Dewitt, N. D., J. F. Harper, and M. R. Sussman. 1991. 'Evidence for a Plasma-Membrane Proton Pump in Phloem Cells of Higher-Plants', *Plant Journal*, 1: 121-28.
- Dietrich, P., and R. Hedrich. 1994. 'Interconversion of Fast and Slow Gating Modes of Gcac1, a Guard-Cell Anion Channel', *Planta*, 195: 301-04.
- Dinant, S., and R. Lemoine. 2010. 'The phloem pathway: New issues and old debates', *Comptes Rendus Biologies*, 333: 307-19.
- Dreyer, I., J. L. Gomez-Porrás, D. M. Riano-Pachon, R. Hedrich, and D. Geiger. 2012. 'Molecular evolution of slow and quick anion channels (SLACs and QUACs/ALMTs)', *Frontiers in Plant Science*, 3.

- Durand, M., B. Porcheron, N. Hennion, L. Maurousset, R. Lemoine, and N. Pourtau. 2016. 'Water Deficit Enhances C Export to the Roots in Arabidopsis thaliana Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots', *Plant Physiology*, 170: 1460-79.
- Dutzler, R., E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2002. 'X-ray structure of a Cl⁻ chloride channel at 3.0 angstrom reveals the molecular basis of anion selectivity', *Nature*, 415: 287-94.
- Edwards, D., H. Kerp, and H. Hass. 1998. 'Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach', *Journal of Experimental Botany*, 49: 255-78.
- Eid, N., S. Enani, G. Walton, G. Corona, A. Costabile, G. Gibson, I. Rowland, and J. P. Spencer. 2014. 'The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation', *J Nutr Sci*, 3: e46.
- Ellis, R. J. 1990. 'Molecular Chaperones - the Plant Connection', *Science*, 250: 954-59.
- Emi, T., T. Kinoshita, and K. Shimazaki. 2001. 'Specific binding of vfl4-3-3a isoform to the plasma membrane H⁺-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean', *Plant Physiology*, 125: 1115-25.
- Endler, A., S. Meyer, S. Schelbert, T. Schneider, W. Weschke, S. W. Peters, F. Keller, S. Baginsky, E. Martinoia, and U. G. Schmidt. 2006. 'Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach', *Plant Physiology*, 141: 196-207.
- Endo, A., Y. Sawada, H. Takahashi, M. Okamoto, K. Ikegami, H. Koiwai, M. Seo, T. Toyomasu, W. Mitsuhashi, K. Shinozaki, M. Nakazono, Y. Kamiya, T. Koshihara, and E. Nambara. 2008. 'Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells', *Plant Physiology*, 147: 1984-93.
- Eom, J. S., J. I. Cho, A. Reinders, S. W. Lee, Y. Yoo, P. Q. Tuan, S. B. Choi, G. Bang, Y. I. Park, M. H. Cho, S. H. Bhoo, G. An, T. R. Hahn, J. M. Ward, and J. S. Jeon. 2011. 'Impaired Function of the Tonoplast-Localized Sucrose Transporter in Rice, OsSUT2, Limits the Transport of Vacuolar Reserve Sucrose and Affects Plant Growth', *Plant Physiology*, 157: 109-19.
- Fehsenfeld, F., J. Calvert, R. Fall, P. Goldan, A. B. Guenther, C. N. Hewitt, B. Lamb, S. Liu, M. Trainer, H. Westberg, and P. Zimmerman. 1992. 'Emissions of Volatile Organic Compounds from Vegetation and the Implications for Atmospheric Chemistry', *Global Biogeochemical Cycles*, 6: 389-430.
- Felle, H. H. 2001. 'pH: Signal and messenger in plant cells', *Plant Biology*, 3: 577-91.
- Felle, H. H., A. Herrmann, R. Huckelhoven, and K. H. Kogel. 2005. 'Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalinization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*)', *Protoplasma*, 227: 17-24.
- Finkel, Alan S., and P. W. Gage. 1985. 'Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In Voltage and patch clamping with microelectrodes ', 11: 47-94.
- Finkel, Alan S., and Stephen Redman. 1984. 'Theory and operation of a single microelectrode voltage clamp', *J Neurosci Methods*, 11: 101-27.
- Finkelstein, R. R. 2006. 'Studies of abscisic acid perception finally flower', *Plant Cell*, 18: 786-91.
- Flugge, U. I., and W. Gao. 2005. 'Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes', *Plant Biology*, 7: 91-97.
- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005. 'Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses', *Plant Cell*, 17: 1866-75.
- Franks, P. J., T. N. Buckley, J. C. Shope, and K. A. Mott. 2001. 'Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe', *Plant Physiology*, 125: 1577-84.
- Franks, P. J., and G. D. Farquhar. 2007. 'The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control', *Plant Physiology*, 143: 78-87.

- Frayse, L. C., B. Wells, M. C. McCann, and P. Kjellbom. 2005. 'Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells', *Biol Cell*, 97: 519-34.
- Frommer, W. B., S. Hummel, M. Unseld, and O. Ninnemann. 1995. 'Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 12036-40.
- Frost, C. J., B. Nyamdari, C. J. Tsai, and S. A. Harding. 2012. 'The Tonoplast-Localized Sucrose Transporter in Populus (PtaSUT4) Regulates Whole-Plant Water Relations, Responses to Water Stress, and Photosynthesis', *Plos One*, 7.
- Fujii, H., V. Chinnusamy, A. Rodrigues, S. Rubio, R. Antoni, S. Y. Park, S. R. Cutler, J. Sheen, P. L. Rodriguez, and J. K. Zhu. 2009. 'In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway', *Nature*, 462: 660-U138.
- Furr, J. R., and W. W. Armstrong. 1975. *Water and salinity problems of Abadan Island date gardens*.
- Gadjev, I., S. Vanderauwera, T. S. Gechev, C. Laloi, I. N. Minkov, V. Shulaev, K. Apel, D. Inze, R. Mittler, and F. Van Breusegem. 2006. 'Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 141: 436-45.
- Geibel, S., J. H. Kaplan, E. Bamberg, and T. Friedrich. 2003. 'Conformational dynamics of the Na⁺/K⁺-ATPase probed by voltage clamp fluorometry', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 964-69.
- Geiger, D. 2011. 'Plant Sucrose Transporters from a Biophysical Point of View', *Molecular Plant*, 4: 395-406.
- Geiger, D., T. Maierhofer, K. A. S. Al-Rasheid, S. Scherzer, P. Mumm, A. Liese, P. Ache, C. Wellmann, I. Marten, E. Grill, T. Romeis, and R. Hedrich. 2011. 'Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1', *Science Signaling*, 4.
- Geiger, D., S. Scherzer, P. Mumm, I. Marten, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, C. Wellmann, K. A. S. Al-Rasheid, E. Grill, T. Romeis, and R. Hedrich. 2010. 'Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 8023-28.
- Geiger, D., S. Scherzer, P. Mumm, A. Stange, I. Marten, H. Bauer, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, K. A. S. Al-Rasheid, T. Romeis, and R. Hedrich. 2009. 'Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21425-30.
- Ghosh, I., A. D. Hamilton, and L. Regan. 2000. 'Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein', *Journal of the American Chemical Society*, 122: 5658-59.
- Giaquinta, R. 1977. 'Phloem Loading of Sucrose - Ph-Dependence and Selectivity', *Plant Physiology*, 59: 750-55.
- Goldman, D. E. 1943. 'Potential, Impedance, and Rectification in Membranes', *Journal of General Physiology*, 27: 37-60.
- Gong, X., M. L. Liu, L. J. Zhang, Y. Y. Ruan, R. Ding, Y. Q. Ji, N. Zhang, S. B. Zhang, J. Farmer, and C. Wang. 2015. 'Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway', *Physiologia Plantarum*, 153: 119-36.
- Gottwald, J. R., P. J. Krysan, J. C. Young, R. F. Evert, and M. R. Sussman. 2000. 'Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 13979-84.
- Grabov, A., J. Leung, J. Giraudat, and M. R. Blatt. 1997. 'Alteration of anion channel kinetics in wild-type and abi1-1 transgenic Nicotiana benthamiana guard cells by abscisic acid', *Plant Journal*, 12: 203-13.

- Grignon, C., and H. Sentenac. 1991. 'Ph and Ionic Conditions in the Apoplast', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 103-28.
- Guan, B., X. Chen, and H. Zhang. 2013. 'Two-electrode voltage clamp', *Methods Mol Biol*, 998: 79-89.
- Guenther, A. B., P. R. Zimmerman, P. C. Harley, R. K. Monson, and R. Fall. 1993. 'Isoprene and Monoterpene Emission Rate Variability - Model Evaluations and Sensitivity Analyses', *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 98: 12609-17.
- Gundersen, C. B., R. Miledi, and I. Parker. 1983a. 'Serotonin Receptors Induced by Exogenous Messenger-Rna in *Xenopus* Oocytes', *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*, 219: 103-09.
- . 1983b. 'Voltage-Operated Channels Induced by Foreign Messenger-Rna in *Xenopus* Oocytes', *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*, 220: 131-40.
- Guo, F. O., J. Young, and N. M. Crawford. 2003. 'The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 15: 107-17.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, H. R. Woodland, and G. Marbaix. 1971a. 'Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells', *Nature*, 233: 177-&.
- . 1971b. 'Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells', *Nature*, 233: 177-82.
- Hackel, A., N. Schauer, F. Carrari, A. R. Fernie, B. Grimm, and C. Kuhn. 2006. 'Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways', *Plant Journal*, 45: 180-92.
- Hafke, J. B., J. K. van Amerongen, F. Kelling, A. C. U. Furch, F. Gaupels, and A. J. E. van Bel. 2005. 'Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem', *Plant Physiology*, 138: 1527-37.
- Hare, P. D., and W. A. Cress. 1997. 'Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants', *Plant Growth Regulation*, 21: 79-102.
- Haritatos, E., B. G. Ayre, and R. Turgeon. 2000. 'Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter', *Plant Physiology*, 123: 929-37.
- Haritatos, E., F. Keller, and R. Turgeon. 1996. 'Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L leaves: Implications for phloem loading', *Planta*, 198: 614-22.
- Harlan, J. R., and D. Zohary. 1966. 'Distribution of Wild Wheats and Barley', *Science*, 153: 1074-&.
- Harris, M. J., W. H. Outlaw, R. Mertens, and E. W. Weiler. 1988. 'Water-Stress-Induced Changes in the Abscisic-Acid Content of Guard-Cells and Other Cells of *Vicia-Faba* L Leaves as Determined by Enzyme-Amplified Immunoassay', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 2584-88.
- Hartung, W., J. W. Radin, and D. L. Hendrix. 1988. 'Abscisic-Acid Movement into the Apoplastic Solution of Water-Stressed Cotton Leaves - Role of Apoplastic Ph', *Plant Physiology*, 86: 908-13.
- Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, J. K. Zhu, and H. J. Bohnert. 2000. 'Plant cellular and molecular responses to high salinity', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-99.
- Hassanein, A., and N. Dorion. 2006. 'Determining morphological and physiological parameters for the selection of drought-tolerant geraniums (*Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey)', *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81: 707-13.
- Hayat, S., Q. Hayat, M. N. Alyemeni, A. S. Wani, J. Pichtel, and A. Ahmad. 2012. 'Role of proline under changing environments: a review', *Plant Signal Behav*, 7: 1456-66.
- Hedrich, R., H. Busch, and K. Raschke. 1990. 'Ca²⁺ and Nucleotide Dependent Regulation of Voltage Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells', *Embo Journal*, 9: 3889-92.

- Hedrich, R., S. Neimanis, G. Savchenko, H. H. Felle, W. M. Kaiser, and U. Heber. 2001. 'Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply', *Planta*, 213: 594-601.
- Hille, B. 1992. 'Ionic Channels - Molecular Pores of Excitable-Membranes', 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- . 2001. "Ion Channels of Excitable Membranes." In. edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hitz, W. D., P. J. Card, and K. G. Ripp. 1986. 'Substrate Recognition by a Sucrose Transporting Protein', *Journal of Biological Chemistry*, 261: 1986-91.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, and B. Katz. 1952. 'Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo', *J Physiol*, 116: 424-48.
- Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949a. 'The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid', *J Physiol*, 108: 37-77.
- . 1949b. 'The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of the Giant Axon of the Squid', *Journal of Physiology-London*, 108: 37-77.
- Holbrook, N. M., V. R. Shashidhar, R. A. James, and R. Munns. 2002. 'Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying', *Journal of Experimental Botany*, 53: 1503-14.
- Horstman, A., I. A. N. Tonaco, K. Boutilier, and R. G. H. Immink. 2014. 'A Cautionary Note on the Use of Split-YFP/BiFC in Plant Protein-Protein Interaction Studies', *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 9628-43.
- Hosy, E., A. Vavasseur, K. Mouline, I. Dreyer, F. Gaymard, F. Poree, J. Boucherez, A. Lebaudy, D. Bouchez, A. A. Very, T. Simonneau, J. B. Thibaud, and H. Sentenac. 2003. 'The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 5549-54.
- Hoth, S., I. Dreyer, P. Dietrich, D. Becker, B. Müller-Rober, and R. Hedrich. 1997. 'Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels', *European Journal of Cell Biology*, 72: 51-51.
- Hrabak, E. M., C. W. M. Chan, M. Gribskov, J. F. Harper, J. H. Choi, N. Halford, J. Kudla, S. Luan, H. G. Nimmo, M. R. Sussman, M. Thomas, K. Walker-Simmons, J. K. Zhu, and A. C. Harmon. 2003. 'The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases', *Plant Physiology*, 132: 666-80.
- Huang, Y. F., M. J. Lemieux, J. M. Song, M. Auer, and D. N. Wang. 2003. 'Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli', *Science*, 301: 616-20.
- Hummel, I., F. Pantin, R. Sulpice, M. Piques, G. Rolland, M. Dauzat, A. Christophe, M. Pervert, M. Bouteille, M. Stitt, Y. Gibon, and B. Müller. 2010. 'Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis', *Plant Physiology*, 154: 357-72.
- Ikegami, K., M. Okamoto, M. Seo, and T. Koshiba. 2009. 'Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of Arabidopsis thaliana in response to water deficit', *Journal of Plant Research*, 122: 235-43.
- Imes, D., P. Mumm, J. Bohm, K. A. S. Al-Rasheid, I. Marten, D. Geiger, and R. Hedrich. 2013. 'Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells', *Plant Journal*, 74: 372-82.
- Jamai, A., J. F. Chollet, and S. Delrot. 1994. 'Proton-Peptide Cotransport in Broad Bean Leaf Tissues', *Plant Physiology*, 106: 1023-31.
- Jia, W. Q., L. J. Zhang, D. Wu, S. Liu, X. Gong, Z. H. Cui, N. Cui, H. Y. Cao, L. B. Rao, and C. Wang. 2015. 'Sucrose Transporter AtSUC9 Mediated by a Low Sucrose Level is Involved in Arabidopsis Abiotic Stress Resistance by Regulating Sucrose Distribution and ABA Accumulation', *Plant and Cell Physiology*, 56: 1574-87.

- Johnson, R. R., R. L. Wagner, S. D. Verhey, and M. K. Walker-Simmons. 2002. 'The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences', *Plant Physiology*, 130: 837-46.
- Jud, W., E. Vanzo, Z. R. Li, A. Ghirardo, I. Zimmer, T. D. Sharkey, A. Hansel, and J. P. Schnitzler. 2016. 'Effects of heat and drought stress on post-illumination bursts of volatile organic compounds in isoprene-emitting and non-emitting poplar', *Plant Cell and Environment*, 39: 1204-15.
- Kaczorowski, G. J., and H. R. Kaback. 1979. 'Mechanism of Lactose Translocation in Membrane-Vesicles from Escherichia-Coli .1. Effect of Ph on Efflux, Exchange, and Counterflow', *Biochemistry*, 18: 3691-97.
- Kaczorowski, G. J., D. E. Robertson, and H. R. Kaback. 1979. 'Mechanism of Lactose Translocation in Membrane-Vesicles from Escherichia-Coli .2. Effect of Imposed Delta-Psi, Delta-Ph, and Delta-Mu-H+', *Biochemistry*, 18: 3697-704.
- Kandler, O., and H. Hopf. 1982. *Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides)*.
- Kang, J., J. U. Hwang, M. Lee, Y. Y. Kim, S. M. Assmann, E. Martinoia, and Y. Lee. 2010. 'PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 2355-60.
- Kang, Y., W. H. Outlaw, P. C. Andersen, and G. B. Fiore. 2007. 'Guard-cell apoplastic sucrose concentration - a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader *Vicia faba* L.', *Plant Cell and Environment*, 30: 551-58.
- Kangasjarvi, J., P. Jaspers, and H. Kollist. 2005. 'Signalling and cell death in ozone-exposed plants', *Plant Cell and Environment*, 28: 1021-36.
- Karl, T., R. Fall, T. N. Rosenstiel, P. Prazeller, B. Larsen, G. Seufert, and W. Lindinger. 2002. 'On-line analysis of the (CO₂)-C-13 labeling of leaf isoprene suggests multiple subcellular origins of isoprene precursors', *Planta*, 215: 894-905.
- Keller, F., and D.M. Pharr. 1996. *Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides* (New York).
- Kerppola, T. K. 2008. 'Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells', *Annual Review of Biophysics*, 37: 465-87.
- Kesselmeier, J., and M. Staudt. 1999. 'Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology', *Journal of Atmospheric Chemistry*, 33: 23-88.
- Kim, T. H., M. Bohmer, H. H. Hu, N. Nishimura, and J. I. Schroeder. 2010. 'Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling', *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, 61: 561-91.
- Kinoshita, T., and K. Shimazaki. 2001. 'Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase in response to fusicoccin', *Plant and Cell Physiology*, 42: 424-32.
- Klein, M., G. Cheng, M. Chung, and G. Tallman. 1996. 'Effects of turgor potentials of epidermal cells neighbouring guard cells on stomatal opening in detached leaf epidermis and intact leaflets of *Vicia faba* L (faba bean)', *Plant Cell and Environment*, 19: 1399-407.
- Koiwai, H., K. Nakaminami, M. Seo, W. Mitsuhashi, T. Toyomasu, and T. Koshiba. 2004. 'Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*', *Plant Physiology*, 134: 1697-707.
- Komor, E., M. Rotter, and W. Tanner. 1977. 'Proton-Cotransport System in a Higher Plant - Sucrose Transport in *Ricinus-Communis*', *Plant Science Letters*, 9: 153-62.
- Kosegarten, H. U., B. Hoffmann, and K. Mengel. 1999. 'Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves', *Plant Physiology*, 121: 1069-79.
- Kuhn, C., V. R. Franceschi, A. Schulz, R. Lemoine, and W. B. Frommer. 1997. 'Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements', *Science*, 275: 1298-300.

- Kuhn, C., and C. P. L. Grof. 2010. 'Sucrose transporters of higher plants', *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 287-98.
- Kuhn, C., M. R. Hajirezaei, A. R. Fernie, U. Roessner-Tunali, T. Czechowski, B. Hirner, and W. B. Frommer. 2003. 'The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development', *Plant Physiology*, 131: 102-13.
- Kuromori, T., T. Miyaji, H. Yabuuchi, H. Shimizu, E. Sugimoto, A. Kamiya, Y. Moriyama, and K. Shinozaki. 2010. 'ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 2361-66.
- Lafta, A. M., and J. H. Lorenzen. 1995. 'Effect of High-Temperature on Plant-Growth and Carbohydrate-Metabolism in Potato', *Plant Physiology*, 109: 637-43.
- Lahouar, L., S. El-Bok, and L. Achour. 2015. 'Therapeutic Potential of Young Green Barley Leaves in Prevention and Treatment of Chronic Diseases: An Overview', *Am J Chin Med*, 43: 1311-29.
- Lalitha, R., and T. Ramasarma. 1987. 'Role of Mevalonate-Metabolizing Enzymes in the Biosynthesis of Isoprenoid Compounds in Plants', *Journal of Scientific & Industrial Research*, 46: 386-404.
- Lalonde, S., M. Tegeder, M. Throne-Holst, W. B. Frommer, and J. W. Patrick. 2003. 'Phloem loading and unloading of sugars and amino acids', *Plant Cell and Environment*, 26: 37-56.
- Langer, K., V. Levchenko, J. Fromm, D. Geiger, R. Steinmeyer, S. Lautner, P. Ache, and R. Hedrich. 2004. 'The poplar K(+) channel KPT1 is associated with K(+) uptake during stomatal opening and bud development', *Plant Journal*, 37: 828-38.
- Larcher, W. 1994. "Ökophysiologie der Pflanzen." In, 360. Stuttgart.
- Law, C. J., P. C. Maloney, and D. N. Wang. 2008. 'Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily, Antiporters', *Annual Review of Microbiology*, 62: 289-305.
- Lee, S. C., W. Z. Lan, B. B. Buchanan, and S. Luan. 2009. 'A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21419-24.
- Lemoine, R. 2000. 'Sucrose transporters in plants: update on function and structure', *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1465: 246-62.
- Lemoine, R., L. Burkle, L. Barker, S. Sakr, C. Kuhn, M. Regnacq, C. Gaillard, S. Delrot, and W. B. Frommer. 1999. 'Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco', *Febs Letters*, 454: 325-30.
- Lemoine, R., C. Kuhn, N. Thiele, S. Delrot, and W. B. Frommer. 1996. 'Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: Effects on amount and activity', *Plant Cell and Environment*, 19: 1124-31.
- Leonhardt, N., J. M. Kwak, N. Robert, D. Waner, G. Leonhardt, and J. I. Schroeder. 2004. 'Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant', *Plant Cell*, 16: 596-615.
- Lerdau, M. 2007. 'A positive feedback with negative consequences', *Science*, 316: 212-13.
- Levchenko, V., K. R. Konrad, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema, and R. Hedrich. 2005. 'Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 4203-08.
- Li, J. X., and S. M. Assmann. 1996. 'An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean', *Plant Cell*, 8: 2359-68.
- Li, Z. C., and D. R. Bush. 1990. 'Delta-Ph-Dependent Amino-Acid-Transport into Plasma-Membrane Vesicles Isolated from Sugar-Beet Leaves .1. Evidence for Carrier-Mediated, Electrogenic Flux through Multiple Transport-Systems', *Plant Physiology*, 94: 268-77.

- Lichtenthaler, H. K. 1999. 'The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 47-65.
- Lichtenthaler, H. K., J. Schwender, A. Disch, and M. Rohmer. 1997. 'Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway', *Febs Letters*, 400: 271-74.
- Lind, C., I. Dreyer, E. J. Lopez-Sanjurjo, K. von Meyer, K. Ishizaki, T. Kohchi, D. Lang, Y. Zhao, I. Kreuzer, K. A. S. Al-Rasheid, H. Ronne, R. Reski, J. K. Zhu, D. Geiger, and R. Hedrich. 2015. 'Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure', *Current Biology*, 25: 928-35.
- Lind, K., A. Stalberg, N. Zoric, and M. Kubista. 2006. 'Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis', *Biotechniques*, 40: 315-19.
- Linder, B., and K. Raschke. 1992. 'A Slow Anion Channel in Guard-Cells, Activating at Large Hyperpolarization, May Be Principal for Stomatal Closing', *Febs Letters*, 313: 27-30.
- Little, C. H. A., and D. C. Eidt. 1968. 'Effect of Abscisic Acid on Budbreak and Transpiration in Woody Species', *Nature*, 220: 498-&.
- Lohaus, G., M. Burba, and H. W. Heldt. 1994. 'Comparison of the Contents of Sucrose and Amino-Acids in the Leaves, Phloem Sap and Taproots of High and Low Sugar-Producing Hybrids of Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris* L)', *Journal of Experimental Botany*, 45: 1097-101.
- Lohaus, G., and C. Moellers. 2000. 'Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B-carinata* genotype in relation to their seed protein content', *Planta*, 211: 833-40.
- Lohse, G., and R. Hedrich. 1992. 'Characterization of the Plasma-Membrane H⁺-Atpase from *Vicia-Faba* Guard-Cells - Modulation by Extracellular Factors and Seasonal-Changes', *Planta*, 188: 206-14.
- Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, E. M. Gallardo, J. T. Lam, E. Turk, and E. M. Wright. 1998. 'Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7789-94.
- Loreto, F., M. Mannozi, C. Maris, P. Nascetti, F. Ferranti, and S. Pasqualini. 2001. 'Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves', *Plant Physiology*, 126: 993-1000.
- Loreto, F., and V. Velikova. 2001. 'Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes', *Plant Physiology*, 127: 1781-87.
- Lunn, J. E. 2002. 'Evolution of sucrose synthesis', *Plant Physiology*, 128: 1490-500.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann, and E. Grill. 2009. 'Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors', *Science*, 324: 1064-68.
- Macnicol, P. K., J. V. Jacobsen, M. M. Keys, and I. M. Stuart. 1993. 'Effects of Heat and Water-Stress on Malt Quality and Grain Parameters of Schooner Barley Grown in Cabinets', *Journal of Cereal Science*, 18: 61-68.
- Macrobbie, E. A. C. 1984. 'Effects of Light Dark on Anion Fluxes in Isolated Guard-Cells of *Commelina-Communis* L', *Journal of Experimental Botany*, 35: 707-26.
- . 1998. 'Signal transduction and ion channels in guard cells', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 353: 1475-88.
- . 2006. 'Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 1135-40.
- Maierhofer, T., M. Diekmann, J. N. Offenborn, C. Lind, H. Bauer, K. Hashimoto, K. A. S. Al-Rasheid, S. Luan, J. Kudla, D. Geiger, and R. Hedrich. 2014. 'Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid', *Science Signaling*, 7.

- Maierhofer, T., C. Lind, S. Huttli, S. Scherzer, M. Papenfuss, J. Simon, K. A. S. Al-Rasheid, P. Ache, H. Rennenberg, R. Hedrich, T. D. Müller, and D. Geiger. 2014. 'A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective', *Plant Cell*, 26: 2554-67.
- Mannuzzu, L. M., M. M. Moronne, and E. Y. Isacoff. 1996. 'Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating', *Science*, 271: 213-16.
- Marger, M. D., and M. H. Saier. 1993. 'A Major Superfamily of Transmembrane Facilitators That Catalyze Uniport, Symport and Antiport', *Trends in Biochemical Sciences*, 18: 13-20.
- Marmont, G. 1949. 'Studies on the axon membrane; a new method', *Journal of Cellular Physiology*, 34: 351-82.
- Martinoia, E., M. Maeshima, and H. E. Neuhaus. 2007. 'Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism', *Journal of Experimental Botany*, 58: 83-102.
- Mathur, S., D. Agrawal, and A. Jajoo. 2014. 'Photosynthesis: Response to high temperature stress', *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 137: 116-26.
- Mayer, K. F. X., M. Martis, P. E. Hedley, H. Simkova, H. Liu, J. A. Morris, B. Steuernagel, S. Taudien, S. Roessner, H. Gundlach, M. Kubalaková, P. Suchanková, F. Murat, M. Felder, T. Nussbaumer, A. Graner, J. Salse, T. Endo, H. Sakai, T. Tanaka, T. Itoh, K. Sato, M. Platzer, T. Matsumoto, U. Scholz, J. Dolezel, R. Waugh, and N. Stein. 2011. 'Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics', *Plant Cell*, 23: 1249-63.
- McAdam, S. A. M., and T. J. Brodribb. 2014. 'Separating Active and Passive Influences on Stomatal Control of Transpiration', *Plant Physiology*, 164: 1578-86.
- Merced, A., and K. Renzaglia. 2014. 'Developmental changes in guard cell wall structure and pectin composition in the moss *Funaria*: implications for function and evolution of stomata', *Annals of Botany*, 114: 1001-10.
- Meyer, S., C. Lauterbach, M. Niedermeier, I. Barth, R. D. Sjolund, and N. Sauer. 2004. 'Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues', *Plant Physiology*, 134: 684-93.
- Michelet, B., and M. Boutry. 1995. 'The Plasma-Membrane H⁺-ATPase - a Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions', *Plant Physiology*, 108: 1-6.
- Milborrow, B. V., and H. S. Lee. 1998. 'Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI - Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts', *Australian Journal of Plant Physiology*, 25: 507-12.
- Mittelheuser, C. J., and Vansteve.Rf. 1969. 'Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration Induced by (Rs)-Abscisic Acid', *Nature*, 221: 281-+.
- Mittler, R. 2006. 'Abiotic stress, the field environment and stress combination', *Trends in Plant Science*, 11: 15-19.
- Mittler, R., A. Finka, and P. Goloubinoff. 2012. 'How do plants feel the heat?', *Trends in Biochemical Sciences*, 37: 118-25.
- Monson, R. K., C. H. Jaeger, W. W. Adams, E. M. Driggers, G. M. Silver, and R. Fall. 1992. 'Relationships among Isoprene Emission Rate, Photosynthesis, and Isoprene Synthase Activity as Influenced by Temperature', *Plant Physiology*, 98: 1175-80.
- Mori, I. C., Y. Murata, Y. Z. Yang, S. Munemasa, Y. F. Wang, S. Andreoli, H. Tiriác, J. M. Alonso, J. F. Harper, J. R. Ecker, J. M. Kwak, and J. I. Schroeder. 2006. 'CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure', *Plos Biology*, 4: 1749-62.
- Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. J. Buch-Pedersen, J. P. Andersen, B. Vilsen, M. G. Palmgren, and P. Nissen. 2011. 'A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12: 60-70.
- Mukherjee, S., A. H. Liu, K. K. Deol, K. Kulichikhin, C. Stasolla, A. Brule-Babel, and B. T. Ayele. 2015. 'Transcriptional coordination and abscisic acid mediated regulation of sucrose

- transport and sucrose-to-starch metabolism related genes during grain filling in wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Plant Science*, 240: 143-60.
- Muller, H. M., N. Schafer, H. Bauer, D. Geiger, S. Lautner, J. Fromm, M. Riederer, A. Bueno, T. Nussbaumer, K. Mayer, S. A. Alquraishi, A. H. Alfarhan, E. Neher, K. A. S. Al-Rasheid, P. Ache, and R. Hedrich. 2017. 'The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC1 anion channel', *New Phytologist*, 216: 150-62.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-73.
- Mumm, P., D. Imes, E. Martinoia, K. A. S. Al-Rasheid, D. Geiger, I. Marten, and R. Hedrich. 2013. 'C-Terminus-Mediated Voltage Gating of Arabidopsis Guard Cell Anion Channel QUAC1', *Molecular Plant*, 6: 1550-63.
- Mustilli, A. C., S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi, and J. Giraudat. 2002. 'Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production', *Plant Cell*, 14: 3089-99.
- Nambara, E., and A. Marion-Poll. 2005. 'Abscisic acid biosynthesis and catabolism', *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165-85.
- Negi, J., M. Hashimoto, and K. Iba. 2005. 'Characterization of CO₂-insensitive Arabidopsis mutant *cdi3*', *Plant and Cell Physiology*, 46: S176-S176.
- Negi, J., O. Matsuda, T. Nagasawa, Y. Oba, H. Takahashi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, M. Hashimoto, and K. Iba. 2008. 'CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells', *Nature*, 452: 483-U13.
- Norholm, M. H. 2010. 'A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering', *BMC Biotechnol*, 10: 21.
- Nour-Eldin, H. H., B. G. Hansen, M. H. Norholm, J. K. Jensen, and B. A. Halkier. 2006. 'Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments', *Nucleic Acids Res*, 34: e122.
- Okamoto, M., T. Kushiro, T. Asami, T. Koshiha, Y. Kamiya, and E. Nambara. 2005. 'Physiological role of ABA 8'-hydroxylase family, key enzymes in ABA catabolism in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 46: S50-S50.
- Page, J. E., G. Hause, M. Raschke, W. Y. Gao, J. Schmidt, M. H. Zenk, and T. M. Kutchan. 2004. 'Functional analysis of the final steps of the 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing', *Plant Physiology*, 134: 1401-13.
- Palmgren, M. G. 2001. 'Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 817-45.
- Palmgren, M. G., and K. B. Axelsen. 1998. 'Evolution of P-type ATPases', *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1365: 37-45.
- Park, S. Y., P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J. K. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman, and S. R. Cutler. 2009. 'Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins', *Science*, 324: 1068-71.
- Penfield, S. 2008. 'Temperature perception and signal transduction in plants', *New Phytologist*, 179: 615-28.
- Penuelas, J., J. Llusia, D. Asensio, and S. Munne-Bosch. 2005. 'Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions', *Plant Cell and Environment*, 28: 278-86.
- Pescod, K. V., W. P. Quick, and A. E. Douglas. 2007. 'Aphid responses to plants with genetically manipulated phloem nutrient levels', *Physiological Entomology*, 32: 253-58.
- Peters, S., and F. Keller. 2009. 'Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs)', *Plant Cell and Environment*, 32: 1099-107.

- Peterson, K. M., A. L. Rychel, and K. U. Torii. 2010. 'Out of the Mouths of Plants: The Molecular Basis of the Evolution and Diversity of Stomatal Development', *Plant Cell*, 22: 296-306.
- Pickering, R., and P. A. Johnston. 2005. 'Recent progress in barley improvement using wild species of *Hordeum*', *Cytogenetic and Genome Research*, 109: 344-49.
- Pieterse, C. M. J., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, and S. C. M. Van Wees. 2012. 'Hormonal Modulation of Plant Immunity', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 28, 28: 489-521.
- Pusch, M., S. E. Jordt, V. Stein, and T. J. Jentsch. 1999. 'Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates', *Journal of Physiology-London*, 515: 341-53.
- Queitsch, C., S. W. Hong, E. Vierling, and S. Lindquist. 2000. 'Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in arabidopsis', *Plant Cell*, 12: 479-92.
- Raissig, M. T., E. Abrash, A. Bettadapur, J. P. Vogel, and D. C. Bergmann. 2016. 'Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: 8326-31.
- Raschke, K. 2003. 'Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate', *Planta*, 217: 651-57.
- Raschke, K., and M. P. Fellows. 1971. 'Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells', *Planta*, 101: 296-316.
- Rasmussen, R. A., and C. A. Jones. 1973. 'Emission Isoprene from Leaf Disks of *Hamamelis*', *Phytochemistry*, 12: 15-19.
- Raven, J. A. 2002. 'Selection pressures on stomatal evolution', *New Phytologist*, 153: 371-86.
- Reinders, A., A. B. Sivitz, A. Hsi, C. P. L. Grof, J. M. Perroux, and J. M. Ward. 2006. 'Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose', *Plant Cell and Environment*, 29: 1871-80.
- Reinders, A., A. B. Sivitz, C. G. Starker, J. S. Gantt, and J. M. Ward. 2008. 'Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*', *Plant Molecular Biology*, 68: 289-99.
- Reinders, A., A. B. Sivitz, and J. M. Ward. 2012. 'Evolution of plant sucrose uptake transporters', *Frontiers in Plant Science*, 3.
- Reinders, A., Y. Sun, K. L. Karvonen, and J. M. Ward. 2012. 'Identification of Amino Acids Important for Substrate Specificity in Sucrose Transporters Using Gene Shuffling', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 30296-304.
- Rentsch, D., M. Laloi, I. Rouhara, E. Schmelzer, S. Delrot, and W. B. Frommer. 1995. 'Ntr1 Encodes a High-Affinity Oligopeptide Transporter in Arabidopsis', *Febs Letters*, 370: 264-68.
- Reynolds-Henne, C. E., A. Langenegger, J. Mani, N. Schenk, A. Zumsteg, and U. Feller. 2010. 'Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes', *Environmental and Experimental Botany*, 68: 37-43.
- Riesmeier, J. W., B. Hirner, and W. B. Frommer. 1993. 'Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading', *Plant Cell*, 5: 1591-98.
- Riesmeier, J. W., L. Willmitzer, and W. B. Frommer. 1992. 'Isolation and Characterization of a Sucrose Carrier Cdna from Spinach by Functional Expression in Yeast', *Embo Journal*, 11: 4705-13.
- . 1994. 'Evidence for an Essential Role of the Sucrose Transporter in Phloem Loading and Assimilate Partitioning', *Embo Journal*, 13: 1-7.
- Roelfsema, M. R. G., and R. Hedrich. 2005. 'In the light of stomatal opening: new insights into "the Watergate"', *New Phytologist*, 167: 665-91.
- Roelfsema, M. R. G., V. Levchenko, and R. Hedrich. 2004. 'ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels', *Plant Journal*, 37: 578-88.

- Rohmer, M. 2008. 'From Molecular Fossils of Bacterial Hopanoids to the Formation of Isoprene Units: Discovery and Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway', *Lipids*, 43: 1095-107.
- Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, and H. Sahn. 1993. 'Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria - a Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate', *Biochemical Journal*, 295: 517-24.
- Roitsch, T., M. E. Balibrea, M. Hofmann, R. Proels, and A. K. Sinha. 2003. 'Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein', *Journal of Experimental Botany*, 54: 513-24.
- Roitsch, T., and M. C. Gonzalez. 2004. 'Function and regulation of plant invertases: sweet sensations', *Trends in Plant Science*, 9: 606-13.
- Rosenstiel, T. N., A. L. Ebbets, W. C. Khatri, R. Fall, and R. K. Monson. 2004. 'Induction of poplar leaf nitrate reductase: A test of extrachloroplastic control of isoprene emission rate', *Plant Biology*, 6: 12-21.
- Sahin-Toth, M., and H. R. Kaback. 2000. 'Functional conservation in the putative substrate binding site of the sucrose permease from *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 39: 6170-75.
- Saidi, Y., A. Finka, and P. Goloubinoff. 2011. 'Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance', *New Phytologist*, 190: 556-65.
- Saier, M. H., and Q. H. Ren. 2006. 'The bioinformatic study of transmembrane molecular transport', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 11: 289-90.
- Saji, S., S. Bathula, A. Kubo, M. Tamaoki, M. Kanna, M. Aono, N. Nakajima, T. Nakaji, T. Takeda, M. Asayama, and H. Saji. 2008. 'Disruption of a gene encoding C4-dicarboxylate transporter-like protein increases ozone sensitivity through deregulation of the stomatal response in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 49: 2-10.
- Sanadze, G. A. 1969. *Light-dependent excretion of molecular isoprene* (Prog Photosyn Res).
- Sanadze, G. A., and A. N. Kursanov. 1966. *On certain conditions of the evolution of the diene C5H8* (Soviet Plant Physiol.).
- Sanadze, G. A. 1966. 'C5h8 Excretion by Leaves as Related to Oxygen Pressure in Air', *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 167: 714-&.
- . 2004. 'Biogenic isoprene - (A review)', *Russian Journal of Plant Physiology*, 51: 729-41.
- Sanadze, G. A., G. I. Dzhaiani, and I. M. Tevzadze. 1972. *Incorporation into the isoprene molecule of carbon from 13CO2 assimilated during photosynthesis*. (Soviet Plant Physiology).
- Sanadze, G. A., and A. N. Kalandadze. 1966. 'Excretion of Dien C5h8 by Populus Leaves under Different Illumination Conditions', *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 168: 227-+.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-67.
- Santiago, J., A. Rodrigues, A. Saez, S. Rubio, R. Antoni, F. Dupeux, S. Y. Park, J. A. Marquez, S. R. Cutler, and P. L. Rodriguez. 2009. 'Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs', *Plant Journal*, 60: 575-88.
- Sauer, N. 2007. 'Molecular physiology of higher plant sucrose transporters', *Febs Letters*, 581: 2309-17.
- Sauer, N., and J. Stolz. 1994. 'Suc1 and Suc2 - 2 Sucrose Transporters from *Arabidopsis-Thaliana* - Expression and Characterization in Bakers-Yeast and Identification of the Histidine-Tagged Protein', *Plant Journal*, 6: 67-77.
- Savchenko, G., C. Wiese, S. Neimanis, R. Hedrich, and U. Heber. 2000. 'pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves', *Planta*, 211: 246-55.
- Savin, R., P. J. Stone, M. E. Nicolas, and I. F. Wardlaw. 1997a. 'Grain growth and malting quality of barley .1. Effects of heat stress and moderately high temperature', *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 615-24.

- . 1997b. 'Grain growth and malting quality of barley .2. Effects of temperature regime before heat stress', *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 625-34.
- Schafer, N., T. Maierhofer, J. Herrmann, M. E. Jorgensen, C. Lind, K. von Meyer, S. Lautner, J. Fromm, M. Felder, A. M. Hetherington, P. Ache, D. Geiger, and R. Hedrich. 2018. 'A Tandem Amino Acid Residue Motif in Guard Cell SLAC1 Anion Channel of Grasses Allows for the Control of Stomatal Aperture by Nitrate', *Current Biology*, 28: 1370-U145.
- Scherzer, S., T. Maierhofer, K. A. S. Al-Rasheid, D. Geiger, and R. Hedrich. 2012. 'Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels', *Molecular Plant*, 5: 1409-12.
- Schmidt, C., I. Schelle, Y. J. Liao, and J. I. Schroeder. 1995. 'Strong Regulation of Slow Anion Channels and Abscisic-Acid Signaling in Guard-Cells by Phosphorylation and Dephosphorylation Events', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 9535-39.
- Schmidt, C., and J. I. Schroeder. 1994. 'Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells - Large Nitrate Permeability', *Plant Physiology*, 106: 383-91.
- Schnitzler, J. P., M. Graus, J. Kreuzwieser, U. Heizmann, H. Rennenberg, A. Wisthaler, and A. Hansel. 2004. 'Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar leaves', *Plant Physiology*, 135: 152-60.
- Schroeder, J. I., and S. Hagiwara. 1989. 'Cytosolic Calcium Regulates Ion Channels in the Plasma-Membrane of Vicia-Faba Guard-Cells', *Nature*, 338: 427-30.
- Schroeder, J. I., R. Hedrich, and J. M. Fernandez. 1984. 'Potassium-Selective Single Channels in Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba', *Nature*, 312: 361-62.
- Schroeder, J. I., and B. U. Keller. 1992. 'Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 5025-9.
- Schroeder, J. I., J. M. Kwak, and G. J. Allen. 2001. 'Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants', *Nature*, 410: 327-30.
- Schultz, H. R., and M. Stoll. 2010. 'Some critical issues in environmental physiology of grapevines: future challenges and current limitations', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 4-24.
- Schulz, A., D. Beyhl, I. Marten, A. Wormit, E. Neuhaus, G. Poschet, M. Buttner, S. Schneider, N. Sauer, and R. Hedrich. 2011. 'Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2', *Plant Journal*, 68: 129-36.
- Serrano, R. 1989. 'Structure and Function of Plasma-Membrane Atpase', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 61-94.
- Shakya, R., and A. Sturm. 1998. 'Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot', *Plant Physiology*, 118: 1473-80.
- Shallcross, D. E., and P. S. Monks. 2000. 'New Directions: A role for isoprene in biosphere-climate-chemistry feedbacks', *Atmospheric Environment*, 34: 1659-60.
- Sharkey, T. D., X. Y. Chen, and S. Yeh. 2001. 'Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves', *Plant Physiology*, 125: 2001-06.
- Sharkey, T. D., and F. Loreto. 1993. 'Water-Stress, Temperature, and Light Effects on Isoprene Emission and Photosynthesis of Kudzu Leaves', *Plant Physiology*, 102: 159-59.
- Sharkey, T. D., and E. L. Singaas. 1995. 'Why Plants Emit Isoprene', *Nature*, 374: 769-69.
- Sharkey, T. D., E. L. Singaas, P. J. Vanderveer, and C. Geron. 1996. 'Field measurements of isoprene emission from trees in response to temperature and light', *Tree Physiology*, 16: 649-54.
- Shimazaki, K., M. Doi, S. M. Assmann, and T. Kinoshita. 2007. 'Light regulation of stomatal movement', *Annual Review of Plant Biology*, 58: 219-47.
- Shope, J. C., and K. A. Mott. 2006. 'Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells', *Journal of Experimental Botany*, 57: 4123-31.
- Sivitz, A. B., A. Reinders, M. E. Johnson, A. D. Krentz, C. P. L. Grof, J. M. Perroux, and J. M. Ward. 2007. 'Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity,

- intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype', *Plant Physiology*, 143: 188-98.
- Sivitz, A. B., A. Reinders, and J. M. Ward. 2005. 'Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1', *Plant and Cell Physiology*, 46: 1666-73.
- . 2008. 'Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation', *Plant Physiology*, 147: 92-100.
- Siwko, M. E., S. J. Marrink, A. H. de Vries, A. Kozubek, A. J. M. S. Uiterkamp, and A. E. Mark. 2007. 'Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study', *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768: 198-206.
- Slewinski, T. L., A. Garg, G. S. Johal, and D. M. Braun. 2010. 'Maize SUT1 functions in phloem loading', *Plant Signal Behav*, 5: 687-90.
- Slewinski, T. L., R. Meeley, and D. M. Braun. 2009. 'Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves', *Journal of Experimental Botany*, 60: 881-92.
- Smirnova, I. N., V. Kasho, and H. R. Kaback. 2008. 'Protonation and sugar binding to LacY', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 8896-901.
- Soon, F. F., L. M. Ng, X. E. Zhou, G. M. West, A. Kovach, M. H. E. Tan, K. M. Suino-Powell, Y. Z. He, Y. Xu, M. J. Chalmers, J. S. Brunzelle, H. M. Zhang, H. Y. Yang, H. L. Jiang, J. Li, E. L. Yong, S. Cutler, J. K. Zhu, P. R. Griffin, K. Melcher, and H. E. Xu. 2012. 'Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases', *Science*, 335: 85-88.
- Speer, M., and W. M. Kaiser. 1991. 'Ion Relations of Symplastic and Apoplastic Space in Leaves from Spinacia-Oleracea L and Pisum-Sativum L under Salinity', *Plant Physiology*, 97: 990-97.
- Stadler, R., J. Brandner, A. Schulz, M. Gahrtz, and N. Sauer. 1995. 'Phloem Loading by the Pmsuc2 Sucrose Carrier from Plantago-Major Occurs into Companion Cells', *Plant Cell*, 7: 1545-54.
- Stadler, R., E. Truernit, M. Gahrtz, and N. Sauer. 1999. 'The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis', *Plant Journal*, 19: 269-78.
- Stone, B. A. 1994. 'Prospects for Improving the Nutritive-Value of Temperate, Perennial Pasture Grasses', *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 37: 349-63.
- Sturm, A., and G. Q. Tang. 1999. 'The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning', *Trends in Plant Science*, 4: 401-07.
- Sun, S. J., G. N. Qi, Q. F. Gao, H. Q. Wang, F. Y. Yao, J. Hussain, and Y. F. Wang. 2016. 'Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice', *Planta*, 243: 489-500.
- Sun, Y., A. Reinders, K. R. LaFleur, T. Mori, and J. M. Ward. 2010. 'Transport Activity of Rice Sucrose Transporters OsSUT1 and OsSUT5', *Plant and Cell Physiology*, 51: 114-22.
- Sussman, M. R. 1994. 'Molecular Analysis of Proteins in the Plant Plasma-Membrane', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 211-34.
- Sze, H., X. H. Li, and M. G. Palmgren. 1999. 'Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis', *Plant Cell*, 11: 677-89.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2014. *Physiologie der Pflanzen* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. 2002. 'Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana', *Plant Journal*, 29: 417-26.
- Takemiya, A., S. Yamauchi, T. Yano, C. Ariyoshi, and K. Shimazaki. 2013. 'Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening', *Plant and Cell Physiology*, 54: 24-35.
- Tan, B. C., L. M. Joseph, W. T. Deng, L. J. Liu, Q. B. Li, K. Cline, and D. R. McCarty. 2003. 'Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family', *Plant Journal*, 35: 44-56.

- Taraborrelli, D., M. G. Lawrence, J. N. Crowley, T. J. Dillon, S. Gromov, C. B. M. Gross, L. Vereecken, and J. Lelieveld. 2012. 'Hydroxyl radical buffered by isoprene oxidation over tropical forests', *Nature Geoscience*, 5: 190-93.
- Taylor, D. E., Y. F. Hou, R. J. Turner, and J. H. Weiner. 1994. 'Location of a Potassium Tellurite Resistance Operon (Teha Tehb) within the Terminus of Escherichia-Coli K-12', *Journal of Bacteriology*, 176: 2740-42.
- Tetlow, I. J., and J. F. Farrar. 1993. 'Apoplastic Sugar Concentration and Ph in Barley Leaves Infected with Brown Rust', *Journal of Experimental Botany*, 44: 929-36.
- Thomas, F. M., R. Blank, and G. Hartmann. 2002. 'Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe', *Forest Pathology*, 32: 277-307.
- Thomine, S., and H. Barbier-Brygoo. 2010. 'STRUCTURAL BIOLOGY A peep through anion channels', *Nature*, 467: 1058-59.
- Thompson, A. M. 1992. 'The Oxidizing Capacity of the Earths Atmosphere - Probable Past and Future Changes', *Science*, 256: 1157-65.
- Truernit, E., and N. Sauer. 1995. 'The Promoter of the Arabidopsis-Thaliana Suc2 Sucrose-H+ Symporter Gene Directs Expression of Beta-Glucuronidase to the Phloem - Evidence for Phloem Loading and Unloading by Suc2', *Planta*, 196: 564-70.
- Turgeon, R. 1996. 'Phloem loading and plasmodesmata', *Trends in Plant Science*, 1: 418-23.
- . 2000. 'Plasmodesmata and solute exchange in the phloem', *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 521-29.
- Turgeon, R., and D. U. Beebe. 1991. 'The Evidence for Symplastic Phloem Loading', *Plant Physiology*, 96: 349-54.
- Vahisalu, T., H. Kollist, Y. F. Wang, N. Nishimura, W. Y. Chan, G. Valerio, A. Lamminmaki, M. Brosche, H. Moldau, R. Desikan, J. I. Schroeder, and J. Kangasjarvi. 2008. 'SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling', *Nature*, 452: 487-U15.
- Vahisalu, T., I. Puzorjova, M. Brosche, E. Valk, M. Lepiku, H. Moldau, P. Pechter, Y. S. Wang, O. Lindgren, J. Salojarvi, M. Loog, J. Kangasjarvi, and H. Kollist. 2010. 'Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1', *Plant Journal*, 62: 442-53.
- Varshney. 2007. 'Advances in cereal genomics and applications in crop breeding (vol 11, pg 490, 2006)', *Trends in Biotechnology*, 25: 1-1.
- Varshney, R. K., P. Langridge, and A. Graner. 2007. 'Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley', *Advances in Genetics*, 58: 121-+.
- Velikova, V., and F. Loreto. 2005. 'On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in Phragmites australis leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress', *Plant Cell and Environment*, 28: 318-27.
- Velikova, V., P. Pinelli, and F. Loreto. 2005. 'Consequences of inhibition of isoprene synthesis in Phragmites australis leaves exposed to elevated temperatures', *Agriculture Ecosystems & Environment*, 106: 209-17.
- Verslues, P. E., and T. E. Juenger. 2011. 'Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments', *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 240-45.
- Very, A. A., F. Gaymard, C. Bosseux, H. Sentenac, and J. B. Thibaud. 1995. 'Expression of a Cloned Plant K+ Channel in Xenopus Oocytes - Analysis of Macroscopic Currents', *Plant Journal*, 7: 321-32.
- Vickers, C. E., M. Possell, C. I. Cojocariu, V. B. Velikova, J. Laothawornkitkul, A. Ryan, P. M. Mullineaux, and C. N. Hewitt. 2009. 'Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress', *Plant Cell and Environment*, 32: 520-31.
- Vinson, J. A., L. Zubik, P. Bose, N. Samman, and J. Proch. 2005. 'Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants', *J Am Coll Nutr*, 24: 44-50.

- Viola, R., A. G. Roberts, S. Haupt, S. Gazzani, R. D. Hancock, N. Marmioli, G. C. Machray, and K. J. Oparka. 2001. 'Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading', *Plant Cell*, 13: 385-98.
- Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter, and J. Kudla. 2004. 'Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation', *Plant Journal*, 40: 428-38.
- Wang, Z. Y., L. M. Xiong, W. B. Li, J. K. Zhu, and J. H. Zhu. 2011. 'The Plant Cuticle Is Required for Osmotic Stress Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in Arabidopsis', *Plant Cell*, 23: 1971-84.
- Weber, H., L. Borisjuk, U. Heim, N. Sauer, and U. Wobus. 1997. 'A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds', *Plant Cell*, 9: 895-908.
- Weber, H., and T. Roitsch. 2000. 'Invertases and life beyond sucrose cleavage', *Trends in Plant Science*, 5: 47-8.
- Weise, A., L. Barker, C. Kuhn, S. Lalonde, H. Buschmann, W. B. Frommer, and J. M. Ward. 2000. 'A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants', *Plant Cell*, 12: 1345-55.
- Wilkinson, S. 1999. 'pH as a stress signal', *Plant Growth Regulation*, 29: 87-99.
- Wilkinson, S., and W. J. Davies. 1997. 'Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast', *Plant Physiology*, 113: 559-73.
- . 2002. 'ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants', *Plant Cell and Environment*, 25: 195-210.
- . 2008. 'Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation', *Journal of Experimental Botany*, 59: 619-31.
- Williams, J., J. M. Roberts, F. C. Fehsenfeld, S. B. Bertman, M. P. Buhr, P. D. Goldan, G. Hubler, W. C. Kuster, T. B. Ryerson, M. Trainer, and V. Young. 1997. 'Regional ozone from biogenic hydrocarbons deduced from airborne measurements of PAN, PPN, and MPAN', *Geophysical Research Letters*, 24: 1099-102.
- Williams, L. E., R. Lemoine, and N. Sauer. 2000. 'Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation', *Trends in Plant Science*, 5: 283-90.
- Willmer, C., and M. Fricker. 1996. *Stomata* (Springer Science & Business Media).
- Wilson, T. A., R. J. Nicolosi, B. Delaney, K. Chadwell, V. Moolchandani, T. Kotyla, S. Ponduru, G. H. Zheng, R. Hess, N. Knutson, L. Curry, L. Kolberg, M. Goulson, and K. Ostergren. 2004. 'Reduced and high molecular weight barley beta-glucans decrease plasma total and non-HDL-cholesterol in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters', *Journal of Nutrition*, 134: 2617-22.
- Wippel, K., A. Wittek, R. Hedrich, and N. Sauer. 2010. 'Inverse pH Regulation of Plant and Fungal Sucrose Transporters: A Mechanism to Regulate Competition for Sucrose at the Host/Pathogen Interface?', *Plos One*, 5.
- Wong, S. C., I. R. Cowan, and G. D. Farquhar. 1979. 'Stomatal Conductance Correlates with Photosynthetic Capacity', *Nature*, 282: 424-26.
- Wright, E. M., D. D. F. Loo, M. Panayotovaheiermann, and K. J. Boorer. 1994. 'Mechanisms of Na⁺-Glucose Cotransport', *Biochemical Society Transactions*, 22: 646-50.
- Xiong, L. M., and J. K. Zhu. 2003. 'Regulation of abscisic acid biosynthesis', *Plant Physiology*, 133: 29-36.
- Xu, Q. Y., S. Y. Chen, Y. J. Ren, S. L. Chen, and J. Liesche. 2018. 'Regulation of Sucrose Transporters and Phloem Loading in Response to Environmental Cues', *Plant Physiology*, 176: 930-45.
- Yaish, M. W., and P. P. Kumar. 2015. 'Salt tolerance research in date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.), past, present, and future perspectives', *Frontiers in Plant Science*, 6.

- Yamada, M., H. Morishita, K. Urano, N. Shiozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, and Y. Yoshida. 2005. 'Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress', *Journal of Experimental Botany*, 56: 1975-81.
- Yeh, C. H., N. J. Kaplinsky, C. Hu, and Y. Y. Charng. 2012. 'Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity', *Plant Science*, 195: 10-23.
- Yoshida, R., T. Hobo, K. Ichimura, T. Mizoguchi, F. Takahashi, J. Aronso, J. R. Ecker, and K. Shinozaki. 2002. 'ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis', *Plant and Cell Physiology*, 43: 1473-83.
- Yoshida, R., T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi, and K. Shinozaki. 2006. 'The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 5310-18.
- Zaid, A., and de Wet P.F. 2002a. *Date palm cultivation*.
- Zeevaart, J. A. D., and R. A. Creelman. 1988. 'Metabolism and Physiology of Abscisic-Acid', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 439-73.
- Zhang, G., L. Pan, Y. Yin, W. Liu, D. Huang, T. Zhang, L. Wang, C. Xin, Q. Lin, G. Sun, M. M. Ba Abdullah, X. Zhang, S. Hu, I. S. Al-Mssallem, and J. Yu. 2012. 'Large-scale collection and annotation of gene models for date palm (*Phoenix dactylifera*, L.)', *Plant Molecular Biology*, 79: 521-36.
- Zhang, W., Y. L. Hu, and H. R. Kaback. 2003. 'Site-directed sulfhydryl labeling of helix IX in the lactose permease of *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 42: 4904-08.
- Zhao, R., V. Dielen, J. M. Kinet, and M. Boutry. 2000. 'Cosuppression of a plasma membrane H(+)-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility', *Plant Cell*, 12: 535-46.
- Zhou, J. J., F. Theodoulou, N. Sauer, D. Sanders, and A. J. Miller. 1997. 'A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an Arabidopsis H+/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus oocytes*', *Journal of Membrane Biology*, 159: 113-25.
- Zhu, J. K. 2002. 'Salt and drought stress signal transduction in plants', *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247-73.
- Zimmer, W., N. Bruggemann, S. Emeis, C. Giersch, A. Lehning, R. Steinbrecher, and J. P. Schnitzler. 2000. 'Process-based modelling of isoprene emission by oak leaves', *Plant Cell and Environment*, 23: 585-95.
- Zohary, D., and M Hopf. 2000. "Domestication of plants in the Old World " In.: *Annals of Botany*.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Echte Dattelpalme (<i>Phoenix dactylifera</i>).....	3
Abbildung 1-2: Darstellung eines Getreidefeldes der Gerste	4
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht.....	7
Abbildung 1-4: Phospholipide mit gesättigten und ungesättigten Fettsäureketten.....	8
Abbildung 1-5: Kurzfristige und langfristige Reaktionen auf Trockenstress	10
Abbildung 1-6: Isoprenoidbiosynthese	12
Abbildung 1-7: Molekulare Struktur eines DMPC-Bilayers in Wasser.....	14
Abbildung 1-8: S_{CD} -Werte in Abhängigkeit von Temperatur und Isopren.....	15
Abbildung 1-9: 3D-Struktur des Proteins LacY aus <i>E. coli</i> mit gebundenem Substrat.....	18
Abbildung 1-10: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher SUC-Transporter.....	20
Abbildung 1-11: Substratspezifität der pflanzlichen Saccharosetransporter	21
Abbildung 1-12: ZmSUT1 repräsentiert einen Saccharose/Protonen Symporter.....	23
Abbildung 1-13: Die Stomabewegung wird durch unterschiedliche Umwelteinflüsse reguliert	29
Abbildung 1-14: Blaulicht induziert die Stomaöffnung	30
Abbildung 1-15: ABA-Signalkaskade aktiviert den S-Typ Anionenkanal SLAC1	33
Abbildung 1-16: Vereinfachtes Modell der Regulation des Anionenkanals SLAC1	36
Abbildung 1-17: 3D-Struktur des SLAC1-Proteins	37
Abbildung 1-18: Zusammenfassendes Modell des ABA Signalwegs in Schließzellen.....	39
Abbildung 1-19: Morphologie der Stomata und seiner vier Nebenzellen von <i>Phoenix dactylifera</i>	40
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der USER™ Technik.....	48
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik	65
Abbildung 2-3: Standard-Einfachspannungspuls-Protokoll für Transporter	68
Abbildung 2-4: Standard-Spannungspuls-Protokoll für Anionenkanäle	69
Abbildung 3-1: Phylogenetische Einordnung der Saccharosetransporter aus <i>Phoenix dactylifera</i>	80
Abbildung 3-2: Expressionsanalysen der PdSUTs in unterschiedlichen Geweben	82
Abbildung 3-3: Veranschaulichung der Probenvorbereitung von Blättern aus <i>Phoenix dactylifera</i>	84
Abbildung 3-4: Expressionsanalysen der PdSUTs im Licht und in Dunkelheit	84
Abbildung 3-5: Transporter-vermittelnde Ströme von PdSUT1 nach Saccharosezugabe	88
Abbildung 3-6: Stromantwort von PdSUT1-exprimierenden Oozyten	89
Abbildung 3-7: Saccharose-abhängigen Transportströme sowie des K_m -Wertes von PdSUT1	90
Abbildung 3-8: PdSUT1 bei unterschiedlichen Protonen-konzentrationen	92

Abbildung 3-9: Ermittlung der Transportaktivität von ZmSUT1	93
Abbildung 3-10: Substratspezifität von PdSUT1.	95
Abbildung 3-11: Sucralose kein geeignetes Substrat für PdSUT1 und ZmSUT1	96
Abbildung 3-12: Sucralose inhibiert die Saccharose-induzierten Protonenströme von PdSUT1	97
Abbildung 3-13: Konzentrationsabhängige Inhibierung von PdSUT1 durch Sucralose.	98
Abbildung 3-14: Kompetitive Inhibierung von PdSUT1 durch Sucralose	100
Abbildung 3-15: Temperaturveränderung beeinflusst PdSUT1.....	101
Abbildung 3-16: Temperaturabhängigkeit von PdSUT1 und ZmSUT1	102
Abbildung 3-17: K_m -Werte von PdSUT1 und ZmSUT1 bei unterschiedlichen Temperaturen	103
Abbildung 3-18: Isopren beeinflusst nicht den SUC-Transport von PdSUT1 bei 25°C und hohen SUC-Konzentrationen	105
Abbildung 3-19: Isopren vermindert reversibel PdSUT1 und ZmSUT1 bei niedrigen SUC-Konzentrationen	107
Abbildung 3-20: K_m -Werte von ZmSUT1 und PdSUT1 in Abhängigkeit von Isopren	109
Abbildung 3-21: Phylogenetische Eingruppierung der Anionenkanäle aus <i>Phoenix dactylifera</i> und <i>Hordeum vulgare</i>	113
Abbildung 3-22: PdSLAC1 benötigt eine Kinase zur Aktivierung.	115
Abbildung 3-23: Der Anionenkanal HvSLAC1 benötigt für seine Aktivierung eine Kinase... ..	116
Abbildung 3-24: AtSLAC1 aktiviert unter Koexpression einer Kinase	117
Abbildung 3-25: Die Aktivierung von PdSLAC1 durch OST1 wird durch AtABI1 inhibiert....	118
Abbildung 3-26: Die Aktivierung von HvSLAC1 durch OST1 wird durch ABI1 inhibiert	119
Abbildung 3-27: Chlorid-/Nitrat- und Spannungsabhängigkeit und relative Offenwahrscheinlichkeit von PdSLAC1	120
Abbildung 3-28: Nitraterhöhung verstärkt die Kanalaktivität von PdSLAC1	122
Abbildung 3-29: Nitrat-/Chlorid- und Spannungsabhängigkeit und relative Offenwahrscheinlichkeit von HvSLAC1	123
Abbildung 3-30: Der Einfluss von externem Chlorid auf HvSLAC1	125
Abbildung 3-31: Analysen der rel. Leitfähigkeit unterschiedlicher Pflanzenarten.....	126
Abbildung 3-32: AS-Sequenzvergleiche von SLAC1s verschiedener Pflanzenarten.....	127
Abbildung 3-33: Vergleichenden Mutagenesestudien von AtSLAC1 gegenüber HvSLAC1 und PdSLAC1.....	128
Abbildung 3-34: evolutionäre Kopplungsanalyse	129
Abbildung 3-35: Schematische Darstellung der verwendeten Chimären	130

Abbildung 3-36: Vergleichende Analyse von AtSLAC1, HvSLAC1, PdSLAC1 und deren Chimären.....	131
Abbildung 3-37: Vergleich der rel. Offenwahrscheinlichkeit der SLAC1 WTs sowie deren Chimären.....	132
Abbildung 4-1: Kompetitive Inhibierung von ZmSUT1 durch Esculin.....	144
Abbildung 4-2: Temperaturabhängige Transportaktivität von ZmSUT1/PdSUT1	146
Abbildung 4-3: Isoprenemission von <i>Phoenix dactylifera</i>	149
Abbildung 4-4: Die Transportvorgänge innerhalb der Stomata bei Gräsern	159
Abbildung 4-5: Die Evolution des schnellen ABA-abhängigen Stomaschlusses über SLAC1	161

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Standardansatz einer PCR-Reaktion	44
Tabelle 2-2: Standardprogramm eines PCR-Cyclers	44
Tabelle 2-3: Standardansatz einer USER-Reaktion	49
Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren	50
Tabelle 2-5: Standardherstellung eines 1%-igen Agarosegels für DNA.....	51
Tabelle 2-6: Standardpuffer für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese	52
Tabelle 2-7: Standardansatz einer <i>in vitro</i> Transkription	56
Tabelle 2-8: Standardherstellung eines 1%-igen Agarosegels für RNA.....	57
Tabelle 2-9: Reaktionsansatz für einen DNase-Verdau	58
Tabelle 2-10: Reaktionsansatz für eine reverse Transkriptase	59
Tabelle 2-11: Standardreaktionsansatz für eine qPCR	59
Tabelle 2-12: Standard-Cycler Programm für eine qPCR	60
Tabelle 2-13: Herstellung einer Standardreihe für die qPCR	61
Tabelle 2-14: Zusammensetzung der ND96-Lösung	63
Tabelle 2-15: Standardmesslösungen für Zuckertransporter	70
Tabelle 2-16: Standardmesslösung für Anionenkanäle.....	70
Tabelle 3-1: Auflistung der identifizierten und klonierten Transportproteine aus <i>Phoenix dactylifera</i>	78
Tabelle 3-2: Bestimmung der halbmaximalen relativen Offenwahrscheinlichkeit ($V_{1/2}$) bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen	122

5.4 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind Abkürzungen beschrieben, die im Text nicht in ausführlicher Form erwähnt werden.

®	Warenzeichen (restricted)
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
3D	Dreidimensional (Zweidimensional)
A	Ampere (Einheit des Stroms)
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	ABA-insensitiv
ADP	Adenosindiphosphat
AgCl	Silberchlorid
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
AtSUC 1/2	<i>Arabidopsis</i> sucrose transporter 1/2
AtSLAC1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Slow anion channel associated 1
BIFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CIPK	CBL-interacting protein kinase
CBL	Calcineurin B-like
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CLC	chloride channel
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CO ₂	Kohlendioxid
CPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinase
cRNA	komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
CT	C-Terminus
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVC	<u>double-electrode-voltage-clamp</u> technik
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphate
dNTP	Didesoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alteres (<i>lat.: und andere</i>)
F	Farad (Einheit der Kapazität)
Fruc	Fructose
fwd	Vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm (Einheit des Gewichts)
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung
Gluc	Glucose
H ⁺	Protonen
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HAB	Homology to ABI1
HATS	high affinity transport system
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HvSLAC1	<i>Hordeum vulgare</i> Slow anion channel associated 1
I	Strom
I _{inst}	instantane Ströme
I _{ss}	Gleichgewichtsströme
I _{tail}	Folgestrom
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter (Einheit des Volumens)
Lac	Laktose
LaCl ₃	Lanthanchlorid
LacY	Laktose Permease von <i>E. coli</i>
LATS	low affinity transport system
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M = mol/l	Molar = Mol pro Liter (Einheit der Konzentration)
M	milli (10 ⁻³)
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MFS	major facilitator superfamily

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute (Einheit der Zeit)
Mol	Mol (Einheit der Stoffmenge)
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
mosmol/l	Milli-Osmol pro Liter (Einheit der Osmolarität)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Nitrit-Ion
NO ₃	Nitrat-Ion
NT	N-Terminus
norm	normiert
NTP	Nukleotidtriphosphat
NZ	Nebenzelle
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
OsSUT1	<i>Oryza sativa</i> sucrose transporter 1
OST	Open stomata
p	piko (10 ⁻¹²)
P _o	Offenwahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>P. dactylifera</i>	<i>Phoenix dactylifera</i>
PdSUTs	<i>Phoenix dactylifera</i> sucrose transporter
PdSLAC1	<i>Phoenix dactylifera</i> Slow anion channel associated 1
PE	Potenzialelektrode
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PM	Plasmamembran
PP2C	protein phosphatase 2C
PYL	PYR1 like
PYR	pyrabactin resistance
Q	Ladung
R	Gaskonstante
RCAR	regulatory component of ABA receptor
RE	Referenzelektrode
rel.	Relativ
rev	Rückwärts (reverse)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleinacid)
RNase	Ribonuklease

ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Scl	Sucralose, E955
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SE	Standardfehler (standard error)
SE/CC	sieve element/companion cell
Sek	Sekunde
SGLT1	sodium glucose linked transporter 1
ShSUT1	<i>Saccharum officinarum</i> sucrose transporter 1
SLAC1	Slow anion channel associated 1
SLAH1-4	SLAC1-Homolog 1-4
SnRK	Snf-1 related kinase
Std.	Stunde (Einheit der Zeit)
STP	sugar transport protein
StSUT1	<i>Solanum tuberosum</i> sucrose transporter
Suc	Saccharose
SUC/SUT	sucrose transporter
SUF	sucrose facilitator
SZ	Schließzelle
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TENS	TE-NaOH-SDS-Puffer
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik
™	Warenkennzeichen (<i>Trade Mark</i>)
TMD	Transmembrane Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U	Unit
USER	uracil-specific excision reagent
V	Volt (Einheit der Spannung)
$V_{1/2}$	Halbmaximale Aktivierungsspannung
V_m	Membranspannung
V_{rev}	Umkehrpotenzial
V_H	Haltespannung
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
ZmSUT1	<i>Zea mays</i> sucrose transporter

5.5 Lösungen und Puffer

DEPC Wasser für qPCR

DEPC (Diethylpyrocarbonat) 0,1 vol%
in ddH₂O ca. 24 h magnetisch gerührt
und 20 min bei 121°C autoklaviert

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer (Tris-Acetate-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)

λ Pst-Marker

330 µl λ DNA (= 100 µg)
117 µl H₂O
50 µl Puffer O⁺
3 µl Pst I (10 U/µl)
Inkubation bei 37°C über Nacht
+ 800 µl 5x Probenpuffer
+2700 µl ddH₂O

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 (Appllichem/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 Mg₂SO₄ x 7H₂O
20 g/l Trypton
5 g/l Yeast Extract
in ddH₂O

SOC-Medium

20 mM Glukose in SOB-Medium

1x-TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris-HCl; pH 7,5, HCl
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

5.6 Verwendete Primer

PdSUTs:	
PdSUT1 fwd	ATG GAC GCG GTG TCG ATC
PdSUT1 rev	TCA CCC AAA TCC ATG CAA GC
PdSUT1 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG ACG CGG TGT CGA TC
PdSUT1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT CAC CCA AAT CCA TGC AAG C
PdSUT1 fwd (qPCR)	TGCACAGCACTTATCTGA
PdSUT1 rev (qPCR)	GACTTTCAGATGGATCCC
PdSUT3a fwd	ATG GAG AGA GAG AAG AGA CCG
PdSUT3a rev	TTA TCT GCG ACC CCT TGT CC
PdSUT3a USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG AGA GAG AGA AGA GAC CG
PdSUT3a USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT TAT CTG CGA CCC CTT GTC C
PdSUT3a fwd (qPCR)	CACTCTTCATGGCCTTGG
PdSUT3a rev (qPCR)	TGGGTTGCCTCGATAGAT
PdSUT3b fwd	ATG GAC GCG GTG TCG ATC C
PdSUT3b rev	TCA ACC AAA TCC ATG GAA GC
PdSUT3b USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG ACG CGG TGT CGA TCC
PdSUT3b USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT CAA CCA AAT CCA TGG AAG C
PdSUT3b fwd (qPCR)	CTGAACAGCGGCTAT
PdSUT3b rev (qPCR)	CCATTTTGATAAGCAGTG
PdSUT4 fwd	ATG CCG AAT GGC GAG CGG
PdSUT4 rev	TCA GTG CAT TCC GCC AAC
PdSUT4 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AXA TGC CGA ATG GCG AGC GG
PdSUT4 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AXT CAG TGC ATT CCG CCA
PdSUT4 fwd (qPCR)	AGGAGCTGGCATACTTG
PdSUT4 rev (qPCR)	TCATAAGCAGCAATCTCA
ZmSUT1:	
ZmSUT1 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AXA TGG CTA GAG GAG ATG GAG AAC TG

ZmSUT1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AXT TAA TGT CCA CCA GCG GAC AC
ZmSUT1 USER os rev (USER Klonierung)	GGT TTA AXC CAT GTC CAC CAG CGG ACA C
PdSLAC1:	
PdSLAC1 fwd	ATG GCG AGC GGC CCC AAC
PdSLAC1 rev	TTA CCT CCC GTT GGA GCT CTT
PdSLAC1 USER fwd (USER Klonierung)	GGT TTA AUA TGG CGA GCG GTC CCA AC
PdSLAC1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT TAC CTC CCG TTG GAG TCC TT
PdSLAC1 USER os rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUC CCC TCC CGT TGG AGT CCT TGT
PdSLAC1 I285V A286V USER fwd (USER Klonierung)	ATG GGT TGT CUG CAT GTT CCT AGC CAT CG
PdSLAC1 I285V A286V USER rev (USER Klonierung)	AGA CAA CCC AUG GTG CGA AGA AGA AGT TGA C
AtSLAC1:	
AtSLAC1 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG AGA GGA AAC AGT CAA ATG CTC
AtSLAC1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT CAG TGA TGC GAC TCT TCC GC
AtSLAC1 USER os rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUC CGT GAT GCG ACT CTT CCT CTG CTT C
AtSLAC1 V285I V286A USER fwd (USER Klonierung)	ATG GAT TGC TUG CAT GTT CCT AGC CAT TAG C
AtSLAC1 V285I V286A USER rev (USERKlonierung)	AAG CAA TCC AUG GAG CGA AGA AGA AGT TGAC TC
HvSLAC1:	
HvSLAC1 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG CCG GTG CAG AAC CGT
HvSLAC1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT TAA TCG GTT TTC TCT TCT TCC
HvSLAC1 I286V A287V USER fwd (USER Klonierung)	AGT GTT GTC GCU ATG TTT CTG GCT ATT GGG C
HvSLAC1 I286V A287V USER rev (USER Klonierung)	AGC GAC AAC ACU CGG TGT AAA GAA GAA GTT AAC C
PdOST1:	
PdOST1 fwd	ATG GAT CGG GCA ACG CTG

PdOST1 rev	TCA CAT TGC ATA CAC TAT CTC CCC
PdOST1 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG ATC GGG CAA CGC TG
PdOST1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT CAC ATT GCA TAC ACT ATC TCC CC
PdOST1 USER os rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUC CCA TTG CAT ACA CTA TCT CCC C
AtOST1:	
AtOST1 USER fwd (USER Klonierung)	GCC TTA AUA TGG ATC GAC CAG CAG TGA GTC
AtOST1 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUT CAC ATT GCG TAC TAC ATC TCT CC
AtOST1 USER os rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUC CCA TTG CGT ACA CCA TCT CTC CGC
AtOST1 D140A USER fwd (Mutagenese Primer)	ACC GAG CCU TAA AGC TCG AGA ATA CG
AtOST1 D140A USER rev (Mutagenese Primer)	AGG CTC GGU GAC ATA CTT GCA TAG C
AtCPK6 USER fwd (USER Klonierung)	GGC TTA AUA TGG GCA ATT CAT GTC GTG GTT C
AtCPK6 USER rev (USER Klonierung)	GGT TTA AUC TAC ACA TCT CTC ATG CTG ATG TTT AGA C
Allg. verwendete Primer:	
Amp overlap fwd	AGA CCC ACG CXC ACC GGC TC
Amp overlap rev	AGC GTG GGT CXC GCG GTA TC
IVT fwd	CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C
IVT rev	GAT TAG GCC AAG CTA TTT AGG TG

6 Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

6.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Eine vergleichende biophysikalische Analyse von Hitze- und Trockentoleranzstrategien der Wüstenpflanze *Phoenix dactylifera* und Nutzpflanzen der gemäßigten Klimazonen**“, 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.

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

Würzburg, den.....

.....

Nadine Schäfer

6.2 Danksagung

Nun möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht wurde. Mein besonderer Dank gilt daher:

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Bereitstellung der interessanten Thematik sowie für die Gelegenheit, das Thema der vorliegenden Forschungsarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik mithilfe fachlicher Unterstützung untersuchen zu können.

Herrn Prof. Dr. Arthur Korte für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur dieser Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dietmar Geiger für seine freundliche und geduldige Betreuung und Unterstützung über die gesamte Dauer meiner Doktorarbeit. Dabei möchte ich mich besonders für die gute Atmosphäre innerhalb unserer Arbeitsgruppe und seine stete Hilfsbereitschaft bedanken, die die Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit erst ermöglichte.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik für die tolle Kollegialität und große Hilfsbereitschaft. Speziell bedanken möchte ich mich bei der gesamten AG Geiger für die wunderschöne gemeinsame Zeit, tollen Gesprächen und gemeinsamen Aktionen.

Allen Freunden, die mich schon vor aber auch während dieser Arbeit unterstützt haben und mich hoffentlich auch auf meinem zukünftigen Weg begleiten werden.

Vorallem möchte ich mich in diesem Zuge bei meiner besten Freundin Christiane bedanken, da sie in allen schwierigen Phasen meines Lebens, ob beruflich oder privat, immer für mich da war, mir Mut zugesprochen hat und immer wieder versucht hat mich aufzumuntern sowie auf andere Gedanken zu bringen.

Meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg uneingeschränkt unterstützt und gefördert haben. Euer Rückhalt hat es mir ermöglicht, meinen Weg bis hierher zu gehen.

Meinem Ehemann und besten Freund Stefan, dass er diesen langen Weg mit mir gemeinsam gegangen ist und auch in schweren Phasen stets zu mir steht. Danke, dass du immer für mich da bist. Ich freue mich auf unser weiteres gemeinsames Leben mit all den Abenteuern die uns noch erwarten.