

# **Extraflorale Nektarien der Pappeln**

*Populus trichocarpa*

**und**

*Populus tremula x P. tremuloides:*

## **Unterschiede und Gemeinsamkeiten**

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

vorgelegt von

**Mario Jaborsky**

geboren in Günzburg

Würzburg 2013

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Tautz

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die gemäß Wortlaut oder Inhalt aus anderen Arbeiten entnommen sind, wurden durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg 2013

.....

Mario Jaborsky



## Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung -----	1
1.1.	Die Pappel, <i>Populus spp.</i> -----	1
1.2.	Abiotischer und biotischer Stress und die Anpassungen einer Pflanze -----	1
1.3.	Extraflorale Nektarien-----	3
1.4.	Nektar -----	5
1.5.	Regulation der extrafloralen Nektarien- und Nektar-Produktion -----	7
1.6.	Nektar-Transport-----	8
1.6.1.	Symplastischer und apoplastischer Transport -----	8
1.6.2.	Sekretion -----	9
1.7.	Ekkrine Sekretion-----	11
1.7.1.	Transportproteine-----	11
1.7.2.	Steuerung von Transportproteinen -----	12
1.7.3.	Ionenkanäle -----	14
1.7.4.	Anionenkanäle-----	15
1.7.4.1.	S-Typ Anionenkanalfamilie -----	15
1.8.	Vorarbeiten an extrafloralen Nektarien der Pappeln <i>Populus trichocarpa</i> und <i>Populus tremula x Populus tremuloides</i> -----	17
1.8.1.	Nektarien-Lokalisation, -Struktur und Nektar-Sekretion -----	17
1.8.2.	Nektar-Zusammensetzung -----	20
1.8.3.	Nektarien-Ökologie -----	21
1.8.4.	Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)-----	21
1.8.5.	Nektarien-spezifische Genexpression -----	22
1.9.	Zielsetzung -----	23
2.	Material und Methoden-----	25
2.1.	Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen -----	25
2.2.	Tiermaterial und Raupenaufzucht -----	26
2.3.	Allgemeine Methoden-----	26
2.3.1.	Induktion von extrafloralen Nektarien bzw. Nektar -----	26
2.3.2.	Analyse flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs) -----	27
2.3.3.	Versuche zur Effektivität von extrafloralen Nektarien -----	28
2.3.3.1.	Vorversuche -----	29
2.3.3.2.	Effektivitätstest-----	29

## Inhaltsverzeichnis

2.3.4.	Microarrays, biostatistische Auswertung und Analyse	30
2.3.5.	Nektar-Anionenanalyse	31
2.3.6.	Immunfluoreszenz-Markierung von <i>Ptt</i> -EFN	31
2.4.	Molekularbiologische Methoden	32
2.4.1.	Bakterienkulturen	32
2.4.1.1.	Verwendete Stämme	32
2.4.1.2.	Selektion von Klonen	32
2.4.1.3.	Übernachtskulturen	33
2.4.2.	DNA-Techniken	33
2.4.2.1.	Primer Design	33
2.4.2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.4.2.2.1.	Kolonie-PCR	35
2.4.2.2.2.	USER-PCR	35
2.4.2.3.	DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese	36
2.4.2.3.1.	DNA-Auftrennung	36
2.4.2.3.2.	DNA-Auftrennung für anschließende DNA-Extraktion	37
2.4.2.4.	DNA Extraktion/Aufreinigung	37
2.4.2.5.	DNA (RNA) Quantifizierung	37
2.4.2.6.	Klonierungsmethoden	37
2.4.2.6.1.	T/A-Klonierung mittels pGEM <sup>®</sup> T-Easy-Vektor-System	37
2.4.2.6.2.	Klonierung mittels USER-Systems	38
2.4.2.7.	Spezielle Klonierungsmethoden mittels USER-Technik	40
2.4.2.7.1.	Mutagenese einzelner Nukleotide	40
2.4.2.7.2.	SLAH3-Chimären	40
2.4.2.8.	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen	41
2.4.2.9.	Isolation der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
2.4.2.10.	Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA	43
2.4.2.11.	Sequenzierung	43
2.4.2.12.	Quantitative real time PCR	44
2.4.2.13.	Identifikation von Pappel-SLAC/SLAH-Genen	46
2.4.2.14.	SMART-RACE-Technik	46
2.4.3.	RNA Techniken	47
2.4.3.1.	RNA-Isolation aus Pflanzengewebe	48
2.4.3.2.	Reverse Transkription	49

## Inhaltsverzeichnis

2.4.3.3.	<i>In vitro</i> Transkription-----	49
2.4.3.4.	RNA Agarose-Gel-Elektrophorese -----	51
2.5.	Biochemische Methoden-----	52
2.5.1.	Allgemeine Standard-Protein-Methoden-----	52
2.5.1.1.	Das Glutathion-S-Transferase (GST)-Expressionssystem-----	52
2.5.1.2.	Aufschließen von Bakterienzellen -----	52
2.5.1.3.	Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie-- -----	53
2.5.1.4.	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese (SDS-Page) -----	53
2.5.1.5.	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen -----	54
2.5.1.6.	Proteintransfer (Western-Blot)-----	54
2.5.2.	PttSLAH3-spezifische Proteinarbeiten -----	55
2.5.2.1.	PttSLAH3-Antikörpersynthese -----	55
2.5.2.2.	Protein-Expression-----	56
2.5.2.3.	Proteindetektion-----	57
2.5.2.3.1.	His-Antikörper-Markierung -----	57
2.5.2.3.2.	PttSLAH3-spezifische-Antikörper-Markierung -----	57
2.6.	Methoden für elektrophysiologische Charakterisierungen -----	58
2.6.1.	Das eukaryotische Expressionssystem von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-----	58
2.6.2.	cRNA Mikroinjektion -----	58
2.6.3.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen -----	59
2.6.4.	Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik-----	60
2.6.4.1.	Messprinzip und Messaufbau -----	60
2.6.4.2.	Mikroelektroden -----	62
2.6.4.3.	Konventionen-----	62
2.6.4.4.	Datenerfassung, -analyse und biophysikalische Grundlagen-----	63
2.6.4.4.1.	Datenerfassung-----	63
2.6.4.4.2.	Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse-----	64
3.	Ergebnisse-----	67
3.1.	Nektarien-Ökologie-----	67
3.1.1.	Nektarien-Präsenz-----	67
3.1.2.	Nektarien- und Nektar-Induktion -----	68
3.1.3.	Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)-----	70
3.1.4.	Nektar-Attraktivität und Nektarien-Effektivität-----	73

## Inhaltsverzeichnis

3.1.4.1.	„Besucher“	73
3.1.4.2.	Effektivität extrafloraler Nektarien	74
3.2.	Nektarien-spezifische Genexpression	76
3.2.1.	Validierung der Microarray-Daten	76
3.2.2.	Top-500 der am stärksten differenziell exprimierten Gene	77
3.2.2.1.	Wichtige Genklassen	78
3.2.2.1.1.	Zellwand-Metabolismus	78
3.2.2.1.2.	Hormon-Metabolismus	80
3.2.2.1.3.	Biotischer Stress	82
3.2.3.	Ausweitung der differentiellen Genexpressionsanalyse	83
3.2.3.1.	Antimikrobielle Nektar-Proteine	83
3.2.3.2.	Kohlenhydrat-Metabolismus	84
3.2.3.3.	An Exocytose beteiligte Gene	86
3.3.	Ekkrine Sekretion	89
3.3.1.	Voraussetzungen für ekkrine Sekretion	90
3.3.1.1.	Nektar-Anionenzusammensetzung	90
3.3.1.2.	Das Transportprotein	91
3.3.2.	PttSLAH3	92
3.3.2.1.	Identifizierung und Sequenzcharakterisierung	92
3.3.2.2.	Lokalisierung von PttSLAH3 in <i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	94
3.3.2.3.	Elektrophysiologische Charakterisierung	96
3.3.2.3.1.	Kanalaktivierung	97
3.3.2.3.2.	Selektivität und Permeabilität	98
3.3.2.3.3.	Genauere Betrachtung der externen Anionen-abhängigen Aktivierung	100
3.3.2.3.4.	Zytosolische Acidifizierung aktiviert PttSLAH3	102
3.3.2.3.5.	Aktivitätsvergleich nach Koexpression mit verschiedenen Kinasen	104
3.3.2.3.6.	Auswirkung eines Kinaseinhibitors auf die Aktivität von PttSLAH3	108
3.3.2.3.7.	PttSLAH3-Phosphorylierungsstellen	109
3.3.2.3.8.	SLAH3-Chimären	111
4.	Diskussion	116
4.1.	Funktion extrafloraler Nektarien von <i>Ptr</i> und <i>Ptt</i>	116
4.1.1.	Nektarien-Präsenz	116
4.1.2.	Nektarien/Nektar-Induktion in <i>Ptr</i>	117



## Inhaltsverzeichnis

4.1.3.	Effektivität extrafloraler Nektarien -----	120
4.2.	Transkriptionelle Regulation der Produktion und Sekretion von extrafloralem <i>Ptt</i> - und <i>Ptt</i> - Nektar -----	121
4.2.1.	Hormonelle Regulation -----	122
4.2.2.	Nektar-Produktion und -Sekretion -----	123
4.2.2.1.	<i>Populus tremula x tremuloides</i> -----	124
4.2.2.2.	<i>Populus trichocarpa</i> -----	125
4.2.3.	Antimikrobieller Schutz durch extrafloralen Nektar -----	126
4.3.	Ekkrine Sekretion in <i>Ptt</i> -----	126
4.3.1.	Initiale Abgabe anorganischer Anionen -----	127
4.3.2.	PttSLAH3 -----	127
4.3.2.1.	Protein-Struktur -----	127
4.3.2.2.	Lokalisation -----	128
4.3.2.3.	Funktionelle Charakterisierung -----	128
4.3.2.3.1.	Allgemeine elektrophysiologische Eigenschaften -----	128
4.3.2.3.2.	Aktivierung von PttSLAH3 -----	130
5.	Zusammenfassung -----	135
6.	Summary -----	137
7.	Anhang -----	139
7.1.	Literaturverzeichnis -----	139
7.2.	Abbildungsverzeichnis -----	155
7.3.	Tabellenverzeichnis -----	157
7.4.	Verwendete Medien und Lösungen -----	158
7.4.1.	Allgemeine Medien -----	158
7.4.2.	Fixierlösungen für Immunfluoreszenz-Markierung -----	159
7.4.3.	Molekularbiologie -----	159
7.4.4.	Lösungen für biochemische Methoden -----	161
7.4.5.	Lösungen für elektrophysiologische Charakterisierung -----	163
7.5.	Verwendete Primer -----	166
7.5.1.	USER-Primer -----	166
7.5.2.	Realtime Primer -----	167
7.5.3.	Sequenzierprimer -----	171
7.5.4.	SMART-RACE-Primer PttSLAH3 -----	171
7.6.	Gensequenzen -----	172

## Inhaltsverzeichnis

7.7.	Abkürzungen -----	174
7.8.	Firmenverzeichnis -----	179
7.9.	Lebenslauf -----	181
7.10.	Publikationen -----	182
7.11.	Teilnahme an Tagungen-----	182
7.12.	Danksagung-----	183

# **1. Einleitung**

## **1.1. Die Pappel, *Populus spp.***

Pappeln (*Populus spp.*) gehören zur Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*). Hauptsächlich in den nördlichen Hemisphären verbreitet, besteht die Gattung aus vielen verschiedenen Arten, die teilweise durch natürliche Hybridisierung untereinander entstanden sind. Je nach verwendeter taxonomischer Klassifizierung werden so in unterschiedlichen Studien zwischen 22 und 75 verschiedene Arten aufgezählt (Taylor, 2002 und Referenzen darin). Taylor selbst beschreibt für ungefähr 30 Arten eine klare morphologische Differenzierung. Charakteristisch für alle Pappeln sind jedoch ihr schnelles Wachstum und ihre hohe Reproduktionsrate. Weltweit dienen Pappelplantagen der Herstellung von Zellstoff und Papier, von Nutz- bzw. Bauholz oder allgemein der Energiegewinnung (Bradshaw et al., 2000). Ihre ökologische und ökonomische Bedeutung für die heutige, kontinuierlich wachsende und konsumorientierte Gesellschaft nimmt deshalb stetig zu. Neben dem industriellen Nutzen spielt die Pappel aber auch eine große Rolle in der Forschung. Wegen ihres relativ kleinen Genoms von 550 Millionen Basenpaaren (haploid) ist sie in der Baumbiologie ein optimaler Modellorganismus (Bradshaw et al., 2000). Tuskan und Kollegen veröffentlichten 2006 mit der Pappel *Populus trichocarpa* das erste vollständig sequenzierte Genom eines Baumes. Erst dadurch wurde es möglich, im Gegensatz zu einjährigen Pflanzen wie Arabidopsis oder Mais, den bisher wichtigsten Modellpflanzen, die Biologie und Physiologie mehrjähriger Pflanzen und damit baumspezifische, saisonale, abiotische und biotische Einflüsse und ihre Auswirkungen zu untersuchen (Jansson and Douglas, 2007).

## **1.2. Abiotischer und biotischer Stress und die Anpassungen einer Pflanze**

Pflanzen sind ein Leben lang an ihren Standort gebunden und deshalb den verschiedensten Umweltfaktoren stärker ausgesetzt als ortsungebundene Lebewesen. Die Entwicklung von Anpassungs- und Abwehrstrategien stellt daher einen essentiellen Teil des pflanzlichen Überlebens dar. Dabei spielen sowohl abiotische, also unbelebte Faktoren wie Temperatur, Wasserversorgung, Makronährelemente und Licht, als auch biotische Faktoren eine

entscheidende Rolle. Letztere können neben anderen Pflanzen, also Konkurrenten um den gleichen, optimalen Standort auch Pathogene wie Pilze, Bakterien und Viren, vor allem aber Herbivoren sein, zu denen Vertebraten, Insekten und deren Larven oder auch Milben zählen.

Gegen all diese Faktoren haben Pflanzen im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Anpassungsmechanismen entwickelt. In den 1950er Jahren rückte Reginal Painter das Gebiet der pflanzlichen Resistenz gegen Herbivoren in den Fokus der Wissenschaft (Painter, 1958). Sein Buch „Insect Resistance to Crop Plants“ von 1951 legte den Grundstein für viele nachfolgende Studien. Heute ist eine Vielzahl von Strategien bekannt, die Pflanzen entwickelt haben, um sich vor Schäden durch Herbivoren und anderen biotischen Faktoren zu schützen. So stellen Dornen, die Kutikula, aber auch die pflanzliche Zellwand an sich bereits erste konstitutive, morphologische Barrieren dar.

Neben diesen konstitutiven verfügen viele Pflanzen auch über induzierbare Abwehrmechanismen, die hauptsächlich durch Phytohormone wie ABA, Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen etc. gesteuert werden (Pieterse et al., 2012). Induzierte Mechanismen werden prinzipiell in direkt und indirekt gegen Angreifer gerichtete Abwehrstrategien unterteilt.

Als direkte Maßnahmen dienen zum Beispiel Trichome (haarähnliche Strukturen), die - nach Herbivoren Angriff vermehrt gebildet - eine Schutz- oder Drüsenfunktion übernehmen. Pflanzliche Sekundärstoffe wie Glukosinolate, Alkaloide oder Terpenoide wirken nach ihrer Freisetzung ebenfalls direkt gegen Pflanzenschädlinge, indem sie die Pflanze selbst giftig bzw. „unappetitlicher“ für Fraßfeinde machen (Mithöfer and Boland, 2012). Auch spezielle Proteine wie zum Beispiel „pathogenesis-related proteins“ (engl. für Pathogen-verbundene Proteine, PR-Proteine) können unterschiedlichste antimikrobielle Eigenschaften besitzen und schützen die Pflanze bei bzw. vor pathogenem Befall (Sels et al., 2008).

Dem gegenüber stehen induzierte indirekte Strategien, sog. tritrophische Interaktionen. Dabei steht die mutualistische Beziehung zwischen Pflanze und Tier im Vordergrund (Heil, 2008). Denn bei dieser Art von Abwehr schützen natürliche Feinde von Herbivoren, durch spezifische Lockmittel rekrutiert, die Pflanze indirekt. So können mit Hilfe der gleichen Strategie, die sich die Pflanze beim Anlocken ihrer Bestäuber zu Nutze macht, karnivore oder parasitäre Besucher für die Abwehr von Herbivoren angelockt werden. Ein Beispiel für spezifische Lockmittel in tritrophischen Interaktionen sind flüchtige organische Verbindungen (engl. volatile organic compounds, VOCs, siehe auch 1.5). Diese

gas- und dampfförmigen Stoffe werden von der Pflanze ausgesandt, um nicht nur sich selbst (systemisch) und andere Pflanzen in ihrer Umgebung durch entsprechende Warnsignale auf zukünftige Angreifer vorzubereiten (Baldwin et al., 2006; Heil and Silva Bueno, 2007), sondern auch um Feinde der sie befallenden Herbivoren anzulocken (Arimura et al., 2000; Unsicker et al., 2009). Neben VOCs stellen auch extraflorale Nektarien, also Nektarien die sich nicht in der Blüte befinden, solch ein spezielles Anlock-Organ dar. Ihre Funktion als indirekter Verteidigungsmechanismus war lange unklar, doch heute wird ihnen eine eindeutige anti-herbivore Wirkung zugesprochen.

### **1.3. Extraflorale Nektarien**

Grundsätzlich sind Nektarien spezialisierte Drüsenorgane, welche für die Rekrutierung tierischer Besucher spezifischen Nektar (siehe auch 1.4) sekretieren. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Struktur-, Lokalisations- und Sekretionsvarianten (siehe auch 1.6) ermöglichen eine zusätzliche Spezifizierung (Elias, 1983; Fahn, 1988; Pacini et al., 2003). Ohne direkten Einfluss auf die Funktion zu haben, reichen die Erscheinungsformen von „überhaupt keine Struktur“ - sogenannte gestaltlose Nektarien, die äußerlich kaum wahrnehmbar sind - bis hin zu klar sichtbaren und definierten Organen mit differenzierter Morphologie (Heil, 2011 und Referenzen darin). Solche teilweise äußerst komplex aufgebauten Nektarien sind größtenteils durch zwei spezifische Bereiche charakterisiert. Zum einen ermöglicht eine Epidermis, mit oder ohne spezifizierte Stomata oder Trichome, den finalen Transport von Nektar an die Drüsenoberfläche. Zum anderen dient ein spezialisiertes Parenchymgewebe der Produktion, Modifikation oder Speicherung des Nektars. Manche Nektarien-Typen besitzen neben dem Parenchymgewebe, das aus relativ kleinen, isodiametrischen Zellen aufgebaut ist, auch noch ein zusätzliches Sub-Nektarienparenchym mit größeren, weniger dicht gepackten Zellen. Dieses Gewebe, wenn vorhanden, ermöglicht hauptsächlich die Kommunikation mit dem vaskulären System und damit den Transport von Prä-Nektar- oder Nektar-Komponenten ins Nektarienparenchym (Stpiczynska et al., 2004; Kaczorowski et al., 2008; Escalante-Pérez and Heil, 2012a). Allerdings ist nur für etwa zwei Drittel aller Pflanzen mit Nektarien eine direkte Verbindung zwischen Leitgefäßsystem und der Nektarie selbst beschrieben (Fahn, 1988). Oftmals besitzen die meisten Nektarien nur eine Verbindung mit dem Phloem, einzelne aber auch nur mit dem Xylem, andere mit beiden Leitgefäßtypen (Fahn, 1988; Wist and Davis, 2006).

Neben der strukturellen Differenzierung kann grundsätzlich zwischen floralen (FN) und extrafloralen Nektarien (EFN) unterschieden werden. Ohne auf eine spezifische Nektarienstruktur beschränkt zu sein, besteht der offensichtlichste Unterschied in der Lokalisation. Während sich FN nur in der Blüte bzw. an den verschiedensten Blütenorganen befinden, sind EFN ausschließlich außerhalb der Blüte an allen vegetativen Pflanzenteilen, außer an der Wurzel, zu finden (Escalante-Pérez and Heil, 2012a).

Historisch wird vermutet, dass die erste Unterscheidung zwischen floralen und extrafloralen Nektarien bereits 1762 von Hall gemacht wurde. 1855 beschrieb Darwin, dass EFN von *Vicia spp.* von Bienen, Ameisen und Fliegen besucht wurden und er vermutete dahinter eine andere Funktion als die der Bestäubung. Delpino beobachtete 1873 zum ersten Mal die spezifische Funktion von floralen bzw. extrafloralen Nektarien und führte deshalb die Bezeichnungen „nuptial nectar glands“ (engl. für „hochzeitliche“ Nektardrüsen) und „extra-nuptial nectar glands“ (engl. für „zusätzliche zu den hochzeitlichen“ Nektardrüsen) ein, um ihre unterschiedliche ökologische Bedeutung zu verdeutlichen. Er entdeckte, dass „extra-nuptial nectar glands“ Ameisen, selten aber auch Wespen anlockten, die seiner Meinung nach eine „Bewacher-Funktion“ für die Pflanzen übernahmen. Die erste wirkliche Schutzfunktion extrafloraler Nektarien wurde durch von Wettstein 1889 beschrieben. Er entfernte von Hochblättern zweier Arten von Korbbblütlergewächsen Ameisen, die sich an den EFN befanden und konnte so zeigen, dass Samen von Pflanzen, auf denen die Ameisen belassen wurden, weniger Schaden durch Käfer und Wanzen zugefügt wurde, als den Samen von Pflanzen ohne Ameisen (Abschnitt verändert aus Wäckers et al., 2005). In der Folgezeit wurde die Funktion von EFN kontrovers diskutiert, bevor sie über einen längeren Zeitraum in Vergessenheit geriet. Erst Mitte bis Ende des letzten Jahrhunderts belebten und bestätigten mehrere neue Studien, dass Pflanzen mit Hilfe von EFN eine mutualistische Beziehung mit Insekten, vor allem mit Ameisen, besitzen (Bentley, 1977; Elias, 1983).

Grundsätzlich besitzen florale und extraflorale Nektarien die gleiche Funktion. Sie sekretieren spezifischen Nektar und „belohnen“ damit angelockte Besucher. Während FN dies aber ausschließlich zum Zwecke der für die Fortpflanzung unverzichtbaren Bestäubung machen, ermöglichen EFN der Pflanze durch die Anlockung von karnivoren oder parasitären Besuchern einen Schutz vor Herbivoren. Da die Bereitstellung von Nektar auch mit hohen Kosten für die Pflanze verbunden ist, stellt sich allerdings die Frage, warum diese indirekte und nicht garantiert erfolgsversprechende Abwehrstrategie existiert bzw. warum diese Organe evolutionär überdauert haben? Die seit den 1970er Jahren

steigende Zahl an Studien über die erfolgreiche Minderung des Herbivorendrucks durch EFN bestätigt aber eindeutig, dass der Nutzen dieser Organe für die Pflanze deren Bereitstellungskosten aufzuwiegen scheint (Bentley, 1977; Heil et al., 2001; Linsenmair et al., 2001; Almeida and Figueiredo, 2003; Heil and McKey, 2003; Mathews et al., 2007; Radhika et al., 2008; Gonzalez-Teuber et al., 2012; Escalante-Pérez and Heil, 2012a). Bis dato wurden für mindestens 3941 Spezies aus 108 Pflanzenfamilien EFN beschrieben (Weber and Keeler, 2012). Außerdem konnte in mehr als 100 Familien der Farne, Gymnospermen und Angiospermen extrafloraler Nektar als Bestandteil der pflanzlichen Abwehrstrategie identifiziert werden (Heil, 2011). In den letzten Jahren befassten sich außerdem vermehrt Forschungsgruppen mit Pappeln und deren Strategie zur Abwehr herbivorer Angreifer. So wurden als Reaktion auf Herbivorie die gezielte Expression von Abwehrgenen, die Aussendung von VOCs und zuletzt auch die Induktion von EFN beschrieben (Arimura et al., 2004; Lawrence et al., 2006; Ralph et al., 2006; Wooley et al., 2007; Danner et al., 2011). Die erste Erwähnung von EFN in Verbindung mit Pappel beschrieb bereits Trelease (1880). Ihm fiel zum einen der häufige Besuch von Honigbienen am Blattgrund mehrerer Pappelarten, zum anderen die Tatsache auf, dass diese dort unterschiedlich „geformte“ EFN präsentierten. Dabei umfasste die Bandbreite an beschriebenen Nektarienstrukturen von kaum sichtbaren, bis hin zu großen, stark vaskularisierten Becher-ähnlichen Organen. Fossile Funde einer Pappelart belegen sogar, dass Pflanzen bereits im Oligozän, also vor ungefähr 30 Millionen Jahren, über extraflorale Nektarien verfügten und diese wahrscheinlich schon damals zur Anlockung von Ameisen gegen Herbivoren dienten (Pemberton, 1992).

Die evolutive Entwicklung über Speziesgrenzen hinweg und die große Varianz von EFN sogar innerhalb einer Gattung lassen den Schluss zu, dass zusätzlich zu den multiplen morphologischen Strukturen ebenso viele spezifische Funktionsweisen für extraflorale Nektarien existieren.

## **1.4. Nektar**

Im Allgemeinen hängt die Funktion und damit Effektivität von Nektarien - wie erfolgreich Besucher angelockt werden - stark von der Attraktivität des Nektars ab. Dabei spielt die Zusammensetzung eine entscheidende Rolle. Nektar ist allgemein definiert als wässrige Lösung, die hauptsächlich durch Zucker und Aminosäuren geprägt ist. Er kann aber auch anorganische Ionen, verschiedene Proteine, Lipide, organische Säuren, Phenole, Alkaloide,

Terpene oder sogar für Insekten attraktive Duftstoffe enthalten (Nicolson and Thornburg, 2007; Heil, 2011). Diese unterschiedlichen Nektar-Komponenten sind letztlich nicht nur für die Anzahl, sondern auch für die Art der angelockten Besucher verantwortlich. Bestimmte parasitäre Wespen werden zum Beispiel allein durch den Duft des extrafloralen Nektars von Baumwollpflanzen angelockt (Röse et al., 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Nährstoffe, die die entsprechenden Nektar-Konsumenten benötigen, sind aber vor allem Kohlenhydrate als Nektar-Hauptkomponenten die attraktivsten Inhaltsstoffe. Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre zeigten eindrücklich eine Selektion der Besucher aufgrund der Nektar-Kohlenhydratzusammensetzung. Neben geringen Anteilen von Maltose, Raffinose, Galaktose und Melibiose kommen im Nektar hauptsächlich die Monosaccharide Glukose und Fruktose sowie das Disaccharid Saccharose vor (Fahn, 1988). Kolibris, Hummeln, Schmetterlinge, Motten, Bienen mit langen Zungen, zu denen auch die Honigbiene gehört sowie die meisten Ameisenarten, die sich von extrafloralen Nektar ernähren, scheinen dabei einen Saccharose-reichen Nektar zu bevorzugen. Bienen mit kurzen Zungen, Fliegen dagegen sammeln Hexose-reichen Nektar (Escalante-Pérez and Heil, 2012b und Referenzen darin). Es sind aber auch spezielle, sich von Nektar ernährende Vögel und Ameisen bekannt, die Saccharose nicht hydrolisieren und somit nicht weiterverarbeiten können. Sie bevorzugen deshalb ebenfalls Hexose-reichen Nektar (Heil et al., 2005). Kohlenhydrate im Nektar sind jedoch nicht nur maßgeblich für die Attraktivität und damit für die Art der angelockten Besucher verantwortlich, sondern sie bieten gleichzeitig ein optimales Nährmedium für pathogene Mikroorganismen. So können sich, von tierischen Nektar-Konsumenten mitgebrachte Pathogene zum Beispiel im Nektar vermehren und daraufhin sogar über die Nektarien oder Stomata in die Pflanze eindringen (Herrera et al., 2010; Sasu et al., 2010). Viele Nektar sekretierende Pflanzen haben aber gegen diesen Befall ebenfalls Strategien entwickelt. Im Nektar produziertes  $H_2O_2$ , sekundäre Metabolite, oder auch eine Vielzahl an hydrolytischen Enzymen, wie Chitinasen, Glucanasen oder andere mit der Pathogenabwehr verwandte (engl. pathogenesis-related, PR) Proteine sind in der Lage, die Pflanze vor einem mikrobiellen Infekt zu schützen (Escalante-Pérez and Heil, 2012b und Referenzen darin).

Aber nicht nur die Variabilität der Nektar-Komponenten, sondern auch die Regulation der extrafloralen Nektar-Produktion und -Freisetzung einer Pflanze stellt einen wichtigen Faktor bei der Herbivoren-Abwehr dar.



## 1.5. Regulation der extrafloralen Nektarien- und Nektar-Produktion

Die Kontrolle des Nektarvolumens und vor allem des Zeitpunktes der Sekretion erscheint sinnvoll, da eine kontinuierliche Produktion bzw. Freisetzung von Nektar auf Dauer zu kosten- und energieintensiv wäre. Damit die Nektar-Produktion an einen Herbivorenbefall und somit an den optimalen Zeitpunkt für die Abwehr angepasst werden kann, werden Regulationsmechanismen benötigt.

So gibt es zum Beispiel einige Belege dafür, dass extraflorale Nektarien nicht einmal konstitutiv vorhanden sein müssen, sondern eine kontrollierte Induktion von Nektarien und damit angepasste Strategien möglich sind. Bereits Trelease beschrieb 1881 für verschiedene Pappelarten, dass nicht alle Blätter extraflorale Nektarien besaßen. So wurden nur an einigen der ersten im Frühjahr entwickelten Blätter Nektarien festgestellt. Spätere Studien an *Populus tremuloides* bekräftigten diese Hypothese. Dabei konnten Wooley und Kollegen an jungen Bäumen und Blättern eine wesentlich höhere Nektariendichte feststellen als an älteren. Auch zeigten Blätter in der Baumkrone mehr Nektarien als weiter unten gelegene. Insgesamt hatten generell Bäume, die durch Herbivoren verletzt wurden, eine höhere Dichte an Nektarien, als Bäume, die keinen Herbivoren ausgesetzt waren. (Wooley et al., 2007). An afrikanischen Akazien konnte außerdem gezeigt werden, dass ein über Jahre hinweg verminderter Herbivorendruck zu einer Reduktion der EFN-Anzahl führte (Palmer et al., 2008).

Neben der Nektarienzahl kann aber auch die Regulierung des Nektars ein energieeffizienter Kontrollmechanismus sein. Den Nutzen einer solchen Nektar-Induktion bestätigten Experimente an Limabohne, bei denen zusätzlicher, künstlicher Nektar an extrafloralen Nektarien die Anzahl der Besucher steigerte (Kost and Heil, 2005). Dass extrafloraler Nektarfluss regulierbar ist, konnten auch Studien an *Macaranga tanarius* bekräftigen. Diese Baumart zeigte einen tageszyklischen Sekretionsrhythmus mit einem Nektarmaximum in den ersten zwei Stunden nach der Dämmerung. Es konnte außerdem eine verringerte Nektar-Produktion festgestellt werden, wenn keine Verbraucher (Ameisen) zu den Nektarien bzw. Pflanzen Zugang hatten. Nektar-Konsum bzw. -Entfernung steigerte dagegen die Nektar-Produktion (Heil et al., 2000). In zahlreichen Studien konnte zudem eine Steigerung der extrafloralen Nektar-Freisetzung beschrieben werden, wenn sich die Pflanze unter Stress, zum Beispiel durch Herbivorenbefall befand. (Heil et al., 2001; Kessler and Baldwin, 2001; Choh et al., 2006; Choh and Takabayashi,

2006; Kost and Heil, 2008; Radhika et al., 2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass die alleinige Applikation von Jasmonsäure (engl. jasmonic acid, JA) ausreicht, um eine Nektar-Freisetzung zu induzieren. Über den sogenannten octadecanoiden Weg produziert, spielt Jasmonsäure als ubiquitäres Phytohormon generell bei der Stressvermittlung, aber vor allem bei der Herbivoren-Abwehr eine große Rolle (Meldau et al., 2012). In Limabohne und *Macaranga tanarius* wird eine erhöhte JA-Konzentration auch in Verbindung mit der Freisetzung von VOCs, also einer anderen indirekten Abwehrstrategie (siehe auch 1.2), gebracht (Boland et al., 1995; Heil, 2008). Gleichzeitig zeigten Untersuchungen an diesen beiden Pflanzen, dass eine entsprechende VOCs-Freisetzung auch Einfluss auf den extrafloralen Nektarfluss hat. Denn sowohl in intakten Teilen der verletzten Pflanze, als auch in benachbarten Pflanzen wurde Nektar induziert (Heil et al., 2001; Heil, 2004; Kost and Heil, 2006). Dies bestätigte zumindest die indirekte Beteiligung von JA an der Nektar-Freisetzung dieser Pflanzen.

Für Hormone, im Speziellen JA, konnte demnach gezeigt werden, dass sie an einer Nektar-Regulation beteiligt sind. Aber auch auf transkriptioneller Ebene konnten bereits Belege für eine Regulation der Nektar-Produktion gefunden werden. So wurde erst kürzlich eine Zellwand-Invertase (*AtCWINV4*) identifiziert, die in *Arabidopsis* essenziell für die Sekretion von floralem Nektar ist (Ruhlmann et al., 2010). Dabei zeigte sich die Nektar-Freisetzung direkt abhängig von der *AtCWINV4* Transkription bzw. Translation.

Die Vielzahl an möglichen Nektarien- und/oder Nektar-Regulationsmöglichkeiten zeigt, dass der gesamten Nektar-Freisetzung ein komplexer Prozess zugrunde liegt, welcher an den unterschiedlichsten Orten bzw. Zeitpunkten reguliert werden kann.

## **1.6. Nektar-Transport**

### **1.6.1. Symplastischer und apoplastischer Transport**

In Pflanzen erfolgt der Ferntransport von Metaboliten und Assimilaten wie Zucker, Aminosäuren oder auch Wasser über das Phloem bzw. Xylem relativ unselektiv. Dabei werden Metabolite und Assimilate grundsätzlich von Orten der Synthese (source, engl. für Quelle) zu Orten des Verbrauchs (sink, engl. für Senke) transportiert. Auf kürzere Distanz und zellulärer Ebene können Plasmodesmata den Transport übernehmen. Sie bilden einen von der Plasmamembran umgebenen zytoplasmatischen Zellwanddurchgang und ermöglichen so einen symplastischen Transport zwischen Zellen. Dabei entscheidet die

Porengröße über die Selektion der transportierten Moleküle (Overall and Blackman, 1996). Jedoch sind nicht alle Zellen untereinander über Plasmodesmata verbunden, was Studien mit Zytosol-löslichen Farbstoffen zeigten (Imlau et al., 1999). Der Austausch von Stoffwechselmetaboliten und Mineralien zwischen symplastisch isolierten Zellen muss dann über bzw. durch die Plasmamembran erfolgen (apoplastischer Transport).

### **1.6.2. Sekretion**

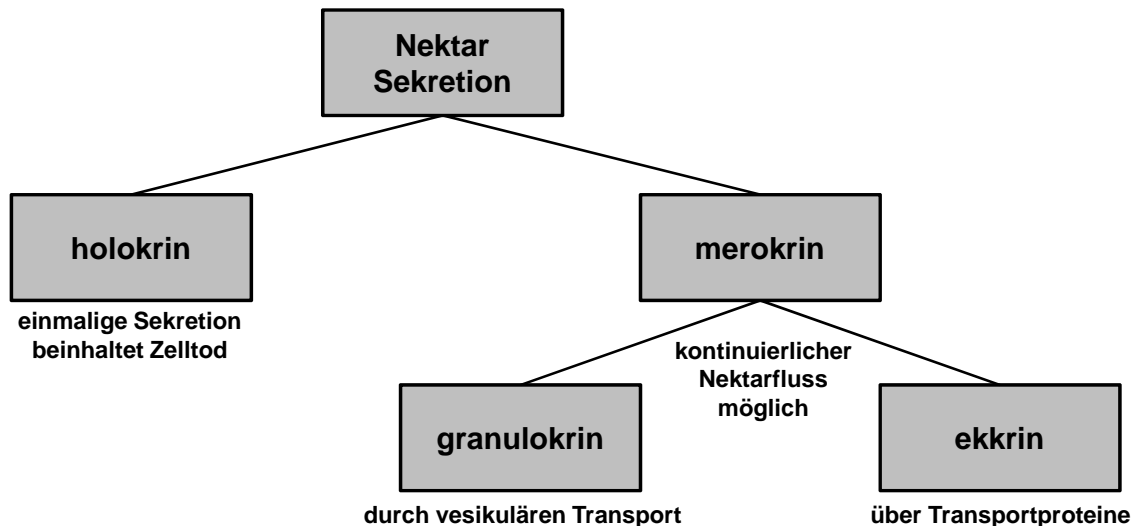
Nektar galt anfangs als einfacher, nicht modifizierter, direkt sekretierter Phloemsaft (Fahn, 1988 und Referenzen darin). Inzwischen ist klar, dass vielfältige Produktions- und Sekretionswege existieren. Heute wird der Prozess der Nektar-Sekretion in drei Phasen unterteilt: Beladung des Nektarienparenchyms mit Photoassimilaten und weiteren Nektar-Komponenten, Modifikation dieses Prä-Nektars und schließlich die eigentliche Sekretion (Escalante-Pérez and Heil, 2012a).

Der symplastische Transport über Plasmodesmata gilt als die häufigste Entladungsvariante von Photoassimilaten aus den Siebröhrenelementen des Phloems in das Nektarienparenchymgewebe (Vassilyev, 2010; Heil, 2011). Auf diesem Weg werden Kohlenhydrate, meist in Form von Saccharose und teilweise gespeichert in Vesikeln, passiv über den von Source- und Sink-Gewebe erzeugten hydrostatischen Druck angetrieben (Lalonde et al., 2003). Eine direkte apoplastische Entladung aus dem Phloem wird als eher unwahrscheinlich angesehen. Manche Nektarien sind aber, wie bereits erwähnt (siehe 1.3), nicht direkt mit dem Leitgefäßsystem verbunden. Dort werden Nektar-Komponenten nach Entladung aus dem Phloem über den Umweg benachbarter Parenchymzellen zu den Nektarienparenchymzellen transportiert. Dies kann zum einen auf einem symplastischen, aber auch auf apoplastischem Weg über interzelluläre Räume und Zellwände geschehen (Vassilyev, 2010). Für einige extraflorale Nektarien ist außerdem eine außergewöhnlich hohe Chloroplastenzahl im Nektarienparenchymgewebe beschrieben. Ein Teil der benötigten Kohlenhydrate wird in diesem Fall vermutlich direkt in den Nektarien erzeugt (Pacini et al., 2003).

Die Weiterverarbeitung der Nektar-Komponenten geschieht allgemein im Nektarienparenchym. Ein Beispiel hierfür ist die Spaltung von Saccharose oder gespeicherter Stärke durch Invertasen. Mehrere solcher Prozesse modifizieren nicht nur die benötigten Prä-Nektar-Komponenten, sondern kontrollieren dadurch zusätzlich das Source-

Sink Verhältnis, was einen erneuten Zuckertransport ins Nektarienparenchymgewebe ermöglicht (Escalante-Pérez and Heil, 2012a).

Der finale Schritt und der wahrscheinlich entscheidendste Faktor für die Spezifität und Art der Sekretion ist die Freisetzung des Nektars. Grundsätzlich kann man zwischen zwei Hauptarten der Sekretion unterscheiden: holokrine und merokrine Sekretion. (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Nektar-Sekretionstypen.**

Sekretion von Nektar kann grundsätzlich in den holokrinen und merokrinen Typ unterteilt werden. Während erstere einmalig geschieht und zum Absterben der Nektarie führt, sind merokrine Nektarien in der Lage, einen kontinuierlichen Nektarfluss aufrecht zu erhalten. Dies kann zum einen über einen vesikulären (granulokrinen) Transportweg und zum anderen mit Hilfe spezieller Transportproteine (ekkrine Sekretion) ermöglicht werden.

Von einer **holokrinen Sekretion** spricht man, wenn bei der Freisetzung des Nektars die Plasmamembran zerstört und der gesamte zelluläre Inhalt freigesetzt wird, was einem programmierten Zelltod gleichkommt (Vesprini et al., 2008). Da durch die Zerstörung der Drüsen eine erneute Sekretion nicht möglich ist, sollte diese Art der Sekretion insbesondere bei solchen Nektarien verbreitet sein, bei denen Nektar nur für ein einmaliges Ereignis benötigt wird. Es gibt jedoch nur wenige Belege für holokrin sekretierende Nektarien in Pflanzen, z.B. bei floralen Nektarien einzelner *Helleborus*- bzw. Bohnen-Arten (Vesprini et al., 2008).

**Merokrine Sekretion** liegt dann vor, wenn Nektarien in der Lage sind, Nektar bei Bedarf kontinuierlich zu sekretieren (Pacini and Nepi, 2007). Diese Eigenschaft ermöglicht zum Beispiel einen anpassungsfähigeren Schutz gegen Herbivoren als eine einmalige Sekretion. Voraussetzung hierfür ist, dass die Drüsenzellen die Nektar-Freisetzung überleben. Neben

kontinuierlicher Sekretion wird dadurch auch die Resorption überflüssigen Nektars ermöglicht, wodurch sonst verlorene Ressourcen wiedergewonnen werden können (Nepi and Stpiczynska, 2007, 2008).

Der merokrine Transportweg kann wiederum in die sogenannte granulokrine bzw. ekkrine Sekretion differenziert werden (Evert, 2006b). Bei der **granulokrinen Sekretion** werden Prä-Nektar bzw. entsprechende Zucker oder andere Nektar-Komponenten in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder des Golgi-Apparats gesammelt und in Vesikel eingeschlossen. Zur Plasmamembran transportiert, fusionieren diese und setzen über Exocytose ihren Inhalt in die entsprechenden Apoplasten, intrazelluläre Räume, extrazelluläre Zellwandareale oder spezielle Stomata frei (Dauwalder and Whaley, 1982; Fahn, 1988; Jurgens and Geldner, 2002; Vassilyev, 2010; Heil, 2011). Dem osmotischen Gefälle folgend fließt Wasser nach und erzeugt einen hydrostatischen Druck, durch den dann der Nektar an die Nektarienoberfläche getrieben wird (Vassilyev, 2010). Ein großer Anteil an ER, Golgi-Apparat und Vesikeln in Nektarienzellen gilt deshalb als Merkmal für granulokrin sekretierende Drüsen (Vassilyev, 2010).

**Ekkrine Sekretion** basiert ebenfalls auf einem Transportweg über die Plasmamembran. Da diese Art der Sekretion von besonderer Bedeutung für den Hauptteil der vorliegenden Arbeit ist, wird sie im folgenden Abschnitt ausführlich behandelt.

## 1.7. Ekkrine Sekretion

Bei dieser Variante der merokrinen Sekretion werden zunächst gezielt kleinere Moleküle oder Ionen mit Hilfe spezieller Transportproteine über die Plasmamembran der sekretierenden Drüsenzellen transportiert (Evert, 2006b). Anschließend folgen Wasser und erst dann andere noch fehlende Nektar-Komponenten. Die Drüsenorgane bleiben dabei intakt und ermöglichen so einen kontinuierlichen Nektarfluss sehr spezifischer Zusammensetzung.

### 1.7.1. Transportproteine

Die ersten Analysen des kompletten Genoms der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* im Jahre 2000 sagten vorher, dass allein diese Pflanze mindestens 600 Transportsysteme aus mindestens 100 Familien der Membrantransporter besitzt (Arabidopsis Genome, 2000). Diese Proteine können grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt werden: Aquaporine,

Kanalproteine, Carrier und Ionenpumpen. Sie vermitteln dabei entweder passive, sekundär-aktive oder aktive Transportprozesse (Schopfer and Brennicke, 2006; Evert, 2006a).

**Aquaporine** bilden in der Membran, ähnlich wie Plasmodesmata, Poren und erleichtern bei verschiedenen Prozessen, wie zum Beispiel dem Wassertransport in der Wurzel, die passive Diffusion von Wasser (Javot and Maurel, 2002). **Kanalproteine** ermöglichen prinzipiell ebenfalls einen passiven Transport. Über sie können bestimmte wasserlösliche Stoffe, meist anorganische Ionen, allein durch den über der Membran herrschenden elektrochemischen Gradienten auch entgegen einem Konzentrationsgefälle transportiert werden. Kanal-spezifische Charakteristika ermöglichen dabei einen mehr oder weniger selektiven Transport einzelner oder mehrerer Ionenarten. **Carrier** (Trägerproteine) beschreiben eine Gruppe der Transportproteine, die zunächst das zu transportierende Substrat temporär binden und es dann durch Konformationsänderung auf die andere Seite der Membran befördern. Im Vergleich zu Vorgängen ohne Konformationsänderungen, wie bei Ionenkanälen, haben diese Prozesse eine entsprechend niedrigere Transportrate zur Folge. Sowohl Kanäle als auch Carrier benötigen einen elektrischen Gradienten. Dieser wird in Form des Membranpotentials durch einen vorgeschalteten aktiven Transport bereitgestellt. Daher spricht man auch von „sekundär aktivem Transport“. Das Membranpotential wird von **Ionenpumpen** aufgebaut. Solche Pumpen, meist Protonenpumpen, können aktiv, d.h. unter Nutzung der bei der Spaltung von ATP freiwerdenden Energie, einen entsprechend hohen elektrochemischen Gradienten über der Membran erzeugen (Schopfer and Brennicke, 2006; Evert, 2006a). Die Protonenpumpen, auch  $H^+$ -ATPasen genannt, haben hierbei einen besonderen Stellenwert. Sie sind ubiquitär in allen pflanzlichen Zellen zu finden und stellen in Zelltypen mit hohem Bedarf an aktivem Transport die größte treibende Kraft dar. Sie sind hauptverantwortlich für die Hyperpolarisation pflanzlicher Membranen, was in einem Ruhe-Plasmamembranpotential von -110 bis -150mV resultiert (Hedrich, 2012). Diese Hyperpolarisation der Plasmamembran bzw. der durch Protonenpumpen erzeugte Protonengradient, ermöglichen letztlich alle durch Kanäle und Carrier-Proteine vermittelten Transportvorgänge über die Membran.

### **1.7.2. Steuerung von Transportproteinen**

Die große Variabilität an Transportprozessen in biologischen Zellen wird aber nicht alleine durch den elektrochemischen Gradienten oder die Vielzahl an unterschiedlichen

Transportproteinen ermöglicht, sondern auch durch deren Regulation. So werden Transportproteine durch das Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren wie transkriptionelle aber auch (post-) translationale Modifikationen gesteuert. Hierbei sind z.B. Signalmoleküle wie  $\text{Ca}^{2+}$ , aber vor allem auch Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsschritte durch Proteinkinasen oder Phosphatasen entscheidend für die Steuerung der Transportproteine.

### **Proteinkinasen:**

Proteinkinasen sind in Eukaryoten wichtige Faktoren, um die vielen unterschiedlichen Funktionen der entsprechenden Zellen zu ermöglichen und zu regulieren. Dies erklärt auch die große Vielzahl an unterschiedlichen Kinasefamilien und ihren relativ hohen Gesamtanteil im jeweiligen Genom. So besitzt zum Beispiel Arabidopsis 1085 typische Proteinkinasen, was in etwa 4% der im Modellpflanzen-Genom kodierten Proteine entspricht (Hrabak et al., 2003). Dabei ähneln viele der in Pflanzen vorkommenden Kinasetypen denen in Tieren oder Hefen. Grundsätzlich werden Kinasen danach unterschieden, welche Aminosäure sie phosphorylieren. Dabei treten vor allem zwei Typen von Kinasen in den Vordergrund. Diejenigen, die an ihrem Zielprotein Tyrosin und diejenigen, die Serin/Threonin phosphorylieren. Aber auch bi-spezifische Proteinkinasen wurden beschrieben. Deren primäre Struktur ähnelt Serin/Threonin Kinasen, sie sind jedoch in der Lage sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin zu phosphorylieren (Lindberg et al., 1992). Während im Tierreich Tyrosin Kinasen dominieren, gehören die meisten Pflanzenkinasen zu den Serin/Threonin Kinasen. Die Mitglieder der CDPK-SnRK Superfamilie in Arabidopsis zählen zu dieser Art von Proteinkinase. Dieser Familie gehören sieben verschiedene Kinasetypen an, wie beispielsweise Phosphoenolpyruvat Carboxylase Kinasen (PPCKs), Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMKs), Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) oder auch „sucrose non-fermenting-1“ (Snf-1, engl. für Saccharose nicht vergärende)-verwandte Proteinkinasen (SnRKs) (Hrabak et al., 2003).

**SnRKs** gehören zu einer in Arabidopsis 38 Mitglieder umfassenden Calcium-unabhängigen Kinasefamilie (Coello et al., 2011). Die Unterteilung erfolgt zusätzlich in die Unterfamilien SnRK1, SnRK2 und SnRK3. Ihnen wird allgemein in Pflanzen eine entscheidende Rolle bei der Verknüpfung von Metabolismus und Stresswahrnehmung zugeordnet. Besonders gut untersucht ist SnRK2.6 oder auch OST1 (open stomata 1, englisch für offene Stomata 1), ein Mitglied der SnRK2 Unterfamilie, der als positiver Regulator in der ABA-Signaltransduktionskette gilt. Allgemein wird der SnRK2 Familie eine Schlüsselrolle in der Vereinigung von ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen

Antworten auf osmotischen Stress zugeschrieben (Umezawa et al., 2009; Yunta et al., 2011).

**CDPKs** (engl. calcium dependent protein kinases), oder nach Hrabak (1996) in Arabidopsis auch als CPKs bezeichnete Kinasen, kommen außer in Pflanzen nur in grünen Algen und einigen Protozoen vor (Hrabak et al., 2003). In Arabidopsis besitzt diese Calcium-abhängige Serin/Threonin Kinasefamilie 34, in Pappel 30 Mitglieder (Hrabak et al., 2003; Zuo et al., 2012). Die Calcium-Abhängigkeit erhalten CDPKs durch ihren speziellen Aufbau. Dabei ist das N-terminale Ende der am wenigsten homologe Bereich. Entsprechend wird dort die substratspezifische Domäne vermutet. Die nachfolgende Kinase Domäne bildet das katalytisch aktive Zentrum. Einer autoinhibitorischen Domäne, welche ein Pseudosubstrat enthält, folgt C-terminal eine Calmodulin-ähnliche Domäne, die in der Regel vier Calcium-bindende EF-Hände enthält (Hrabak et al., 2003). Erst die Bindung von Calcium und die damit verbundene Konformationsänderung führt zu einer katalytisch aktiven CDPK Proteinkinase (Chandran et al., 2006).

Eine Vielzahl an Studien der unterschiedlichsten CDPKs verschiedener Pflanzen belegen, dass ihre biologische Funktion keineswegs konserviert oder generell auf eine Funktion fixiert ist, sondern zahlreiche Bereiche der Pflanzenphysiologie mit Hilfe dieser Kinasefamilie reguliert werden. So spielen CDPKs eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Weiterleitung von Trocken-, Salz-, Kälte- oder auch osmotischem Stress. Auch die Wahrnehmung von aus Pilzen stammenden Elicitoren, die Signalverarbeitung bei Verwundungen oder allgemein von Signalmolekülen wie ABA oder Jasmonsäure sind abhängig von CDPKs (Ludwig et al., 2004 und Referenzen darin). Speziell in neueren Studien konnte auch gezeigt werden, dass Mitglieder dieser Proteinkinasefamilie bei der Regulation des Transports von Ionen über spezielle Ionenkanäle eine wichtige Rolle spielen (Geiger et al., 2010).

### **1.7.3. Ionenkanäle**

Ionenkanäle ermöglichen im offenen Zustand eine sehr hohe Transportrate von bis zu  $10^8$  Ionen pro Sekunde pro Kanal. Sie spielen aufgrund dieser hohen Geschwindigkeit zum Beispiel bei der Reizweiterleitung in Nerven eine wichtige Rolle (Klinke et al., 2009). Aber auch in Pflanzen werden viele Prozesse über osmotisch aktive Ionen bzw. Ionenkanäle gesteuert. Das am besten untersuchte Beispiel hierfür ist die Regulierung der Stomaweite, die für die richtige Balance zwischen  $\text{CO}_2$ -Aufnahme und Wasserverlust



essentiell ist. Das Öffnen und Schließen der Stomata ist dabei entscheidend vom Turgor der Schließzellen und damit von der Konzentration osmotisch aktiver Stoffe abhängig. Bereits in den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass vor allem Kalium als Kation sowie Malat und/oder Chlorid als Gegenionen eine große Rolle bei der Steuerung des Schließzellturgors spielen (Humble and Raschke, 1971; Allaway, 1973). Neuere Studien belegen zudem, dass speziell bei einem schnell benötigten Stomaschluss starke Ionenflüsse nachweisbar sind. Elektrophysiologische Untersuchungen von *Vicia faba* Schließzellen belegten z.B., dass es nach Applikation des Pflanzenstresshormons ABA in Folge einer initialen Depolarisation der Schließzellenmembran durch Anionenkanäle zum Stomaschluss kommt (Roelfsema et al., 2004).

#### **1.7.4. Anionenkanäle**

Bereits in den 1990er Jahren konnte durch Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* gezeigt werden, dass zwei verschiedene Anionenkanalklassen für den Efflux von Anionen aus den Schließzellen verantwortlich sind. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Kinetik voneinander. R-Typ Anionenkanäle (R=rapid, engl. für schnell) besitzen dabei schnellere Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken als S-Typ-Anionenkanäle (S=slow, engl. für langsam). Während R-Typ-Kanäle spannungsabhängig im Bereich von Millisekunden aktiviert bzw. deaktiviert werden, besitzen S-Typ-Anionenkanäle nur eine schwache Spannungsabhängigkeit und aktivieren bzw. deaktivieren im Sekundenbereich. Die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit zeigt sich insoweit, dass bei R-Typ-Kanälen die Offenwahrscheinlichkeit stark abnimmt, wenn das Membranpotential negativer als -80 mV geklemmt wird, wohingegen S-Typ-Anionenkanäle nur eine schwache Deaktivierung bei Spannungen bis -200 mV zeigen (Hedrich et al., 1990; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992).

##### **1.7.4.1. S-Typ Anionenkanalfamilie**

Das erste Gen, welches eindeutig als S-Typ-Anionenkanal bestimmt werden konnte, wurde gleichzeitig in zwei unabhängigen Studien spezifiziert (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Als SLAC1 (**S**low **A**nion **C**hannel-associated **1**) bezeichnet, konnte dieses Protein in *Arabidopsis thaliana* ausschließlich in Schließzellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich außerdem, dass SLAC1 Mutanten einen langsameren Stomaschluss aufwiesen (Negi

et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Aus Analysen des Arabidopsis Genoms ging hervor, dass die S-Typ Anionenkanalfamilie aus vier weiteren Mitgliedern (**SLAC1 Homologe**, SLAHs 1-4) besteht (Vahisalu et al., 2008). Inzwischen sind ca. 200 SLAC1 Homologe in mehr als 30 Pflanzenspezies bekannt (Dreyer et al., 2012). Unter Zuhilfenahme der kürzlich identifizierten Proteinstruktur des aus Bakterien stammenden Transporters HiTehA (aus *Haemophilus influenza*), der hohe Homologie zum Arabidopsis S-Typ-Kanal besitzt, konnte außerdem ein Struktur-Modell des AtSLAC1-Kanals modelliert werden (Chen et al., 2010). Dabei konnte die dreidimensionale Struktur der Porenregion gezeigt werden und dass sehr wahrscheinlich drei Monomere mit jeweils 10 transmembranen Domänen, von denen fünf die Porenregion bilden, einen trimeren Komplex bilden.

Erste elektrophysiologische Charakterisierungen von S-Typ-Anionenkanälen zeigten, dass diese hauptsächlich Nitrat und, mit einer vergleichsweise niedrigen Permeabilität, Chlorid transportieren (Schmidt and Schroeder, 1994). Außerdem zeigten Analysen mit veränderten Konzentrationen von zytosolischem ATP oder auch die Verwendung des Kinaseinhibitors K252a, dass diese Kanäle für ihre Funktion eine Aktivierung durch Phosphorylierung benötigen (Schmidt et al., 1995). Spätere Studien bestätigten die Abhängigkeit und Regulierbarkeit von S-Typ-Anionenkanälen von und durch Proteinkinasen bzw. Phosphatasen (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009).

Neben SLAC1 konnte bislang nur SLAH3 aus der Familie der Arabidopsis SLACs vollständig funktionell charakterisiert werden (Geiger et al., 2011). Dabei zeichnet sich AtSLAH3 neben seiner ubiquitären Expression in der Pflanze hauptsächlich durch eine noch stärkere Nitrat-Spezifität aus. Neben einer bis zu 20fach erhöhten Permeabilität von Nitrat zu Chlorid im Vergleich zu einer 10fachen bei AtSLAC1, charakterisiert diesen Kanal vor allem die Nitrat-abhängige Aktivierung. Die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten zeigte dementsprechend ohne externes Nitrat keine typischen S-Typ-Anionenkanalströme. Beide Kanäle zeigten dagegen Abhängigkeit von Proteinkinasen und Phosphatasen. Während für AtSLAC1 eine Aktivierbarkeit durch Calcium-unabhängige Kinasen wie OST1 und durch die Calcium-abhängige Kinasen CPK21 und 23 gezeigt werden konnte, aktivierten AtSLAH3 nur Calcium-abhängige Kinasen, am stärksten CPK21. Die Phosphatase ABI1 war indes in der Lage, beide Kanäle zu dephosphorylieren und dadurch zu deaktivieren (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009; Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011).

Physiologisch wird sowohl AtSLAH3 als auch AtSLAC1 eine Beteiligung am Stomaschluss in Arabidopsis-Schließzellen zugeschrieben (Geiger et al., 2009; Geiger et

al., 2011). Der über sie vermittelte Ausstrom von Anionen aus den Schließzellen resultiert in einer Depolarisierung des Membranpotentials, was wiederum zu einer Aktivierung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen führt. Die Summe der Kalium- und Anionen-Ausströme ist dann für die Erniedrigung des Schließzellen-Turgors und schlussendlich für den Stomaschluss verantwortlich.

In ähnlicher Weise könnten Mitglieder dieser S-Typ-Anionenkanalfamilie auch für den initialen Schritt einer ekkrine Sekretion in Nektarien verantwortlich sein. Denn Vassilyev beschreibt diesen Nektar-Sekretionstyp als den aktiven Transport von Zuckern über die Plasmamembran sekretierender Zellen. Dem so erzeugten osmotischen Gradienten folgend diffundiert Wasser nach und erhöht den apoplastischen Druck. Dies ermöglicht einen Massenstrom von Nektar-Komponenten an die spezifische Nektarien-Öffnung bzw. -Oberfläche (Vassilyev, 2010). Der initiale Schritt könnte jedoch, anstatt über Zucker, auch über die Anreicherung anderer osmotisch aktiver Substanzen, wie zum Beispiel anorganischer Anionen, im Apoplasten geschehen. Mitglieder der S-Typ-Anionenkanalfamilie könnten deshalb optimale Kandidaten für diesen Transport darstellen.

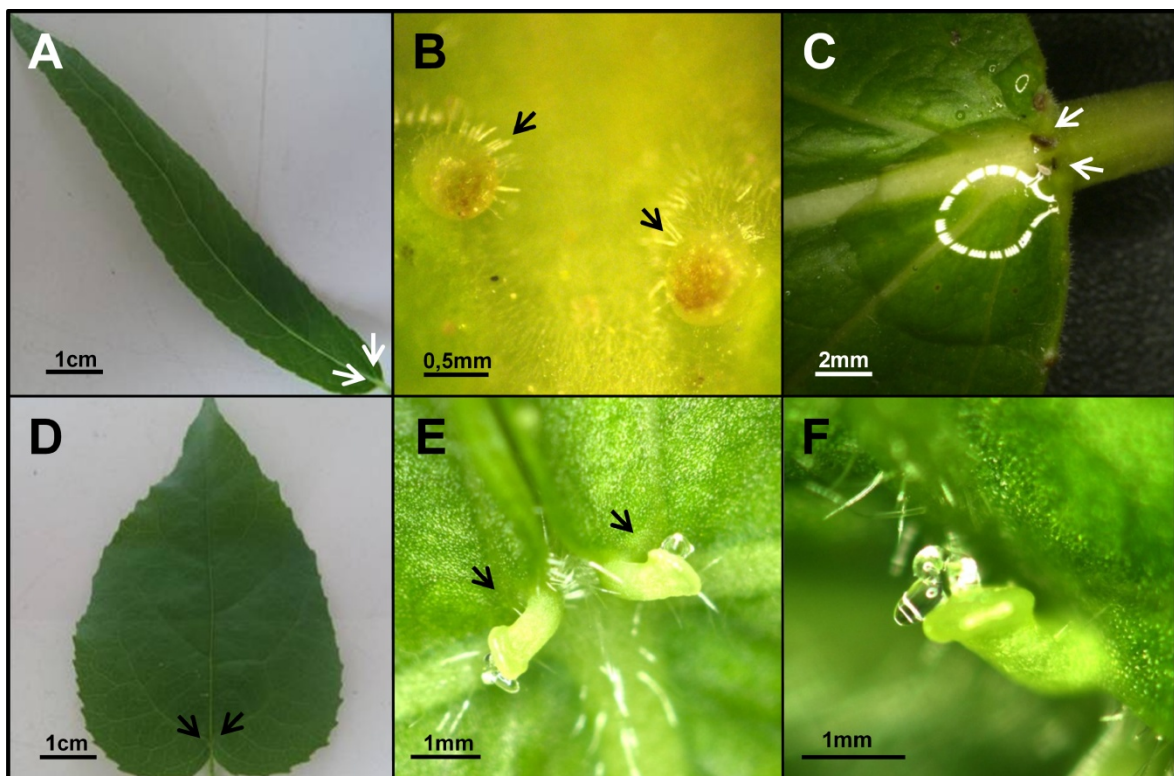
## **1.8. Vorarbeiten an extrafloralen Nektarien der Pappeln *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides***

Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bauen auf Erkenntnissen der Dissertation von Dr. María Escalante-Pérez auf (Escalante-Pérez, 2009). So lieferten einige der identifizierten und beschriebenen Charakteristika von *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* extrafloralen Nektarien die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen. Folglich führte auch die Summe der Ergebnisse beider Dissertationen zu zwei Publikationen (Escalante-Pérez et al., 2012a; Escalante-Pérez et al., 2012b). Einleitend sollen deshalb die wichtigsten dieser Vorarbeiten vorgestellt werden.

### **1.8.1. Nektarien-Lokalisation, -Struktur und Nektar-Sekretion**

Wie bereits beschrieben (siehe 1.3) unterscheiden sich extraflorale Nektarien (EFN) von floralen hauptsächlich durch ihre Lokalisation außerhalb der Blüte. Beide untersuchten Pappelarten *Populus trichocarpa* (*Ptr*) und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (*Ptt*) präsentieren dabei ihre EFN meist paarweise am Übergang von Petiole zu Blattspreite,

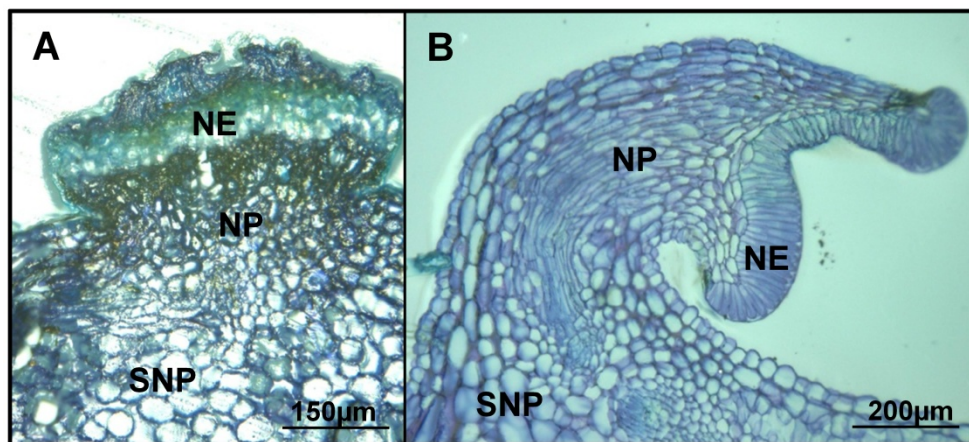
links und rechts der Mittelrippe (Abbildung 1.2 A und D). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die beiden Pflanzen aber phänotypisch. Neben der offensichtlichen unterschiedlichen Blattform - *Ptr* hauptsächlich lanzettartig und *Ptt* mehr eiförmig - differenzieren sie sich auch in der Form ihrer extrafloralen Nektarien (Abbildung 1.2 B und E). Während *Ptr* „knopfartige“ Nektarien besitzt, die sich nur knapp über der Blattoberfläche befinden, weist *Ptt* länger „gestielte“ Nektarien auf, bei denen das sekretierende Ende bis zu einem Millimeter vom Blatt entfernt sein kann. Betrachtet man das Sekretionsverhalten wird ein weiterer Unterschied deutlich (Abbildung 1.2 C und F). *Ptr* produziert große Mengen an Nektar auf einmal, *Ptt* hingegen sekretiert in derselben Zeit vergleichsweise wenig Nektar, kann die Sekretion aber über einen längeren Zeitraum kontinuierlich aufrechterhalten. Diese bereits mit bloßem Auge sichtbaren Unterschiede zweier Bäume derselben Gattung (*Populus*) ließen unterschiedliche Sekretionsstrategien bzw. Nektarien-Typen vermuten.



**Abbildung 1.2: Vergleich von Position, Form und Nektar-Sekretion extrafloraler Nektarien von *Ptr* und *Ptt*.**

Die einzelnen Abbildungen (A) bis (C) zeigen Aufnahmen von *Populus trichocarpa* (*Ptr*), (D) bis (F) von *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (*Ptt*). Bei beiden Pappeln befinden sich extraflorale Nektarien paarweise am Übergang von Blattstiel zu Blattspreite (Pfeile in A und D). (B) und (E) zeigen Nektarien in Nahaufnahmen. Dabei befinden sich *Ptr*-EFN als „knopfartige“ Organe nahe der Blattoberfläche (B), während *Ptt* EFN „gestielt“, eine größere Distanz zwischen Sekretionsfläche und Blattoberfläche besitzen (E). *Ptr* produziert große Mengen an Nektar (C), *Ptt* in der gleichen Zeit relativ kleine Volumina (F). Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Nektarien-Längsschnitten bestätigten den differentiellen Aufbau und zeigen einen weiteren morphologischen Unterschied (Abbildung 1.3). Im Gegensatz zu *Ptr* besitzt *Ptt* eine auffällige, sich deutlich abgrenzende, äußerste epidermale Schicht aus großen Bürstensaum-ähnlichen Zellen (Abbildung 1.3 B). Neben diesen Unterschieden konnten auch strukturelle Gemeinsamkeiten beider Nektarien-Typen festgestellt werden. Wie für die meisten floralen und extrafloralen Nektarien beschrieben, zeigen beide mehr oder weniger eindeutig eine Aufteilung in Nektarienepidermis, Nektarienparenchym und Sub-Nektarienparenchym.



**Abbildung 1.3: Unterschiedliche Morphologie von *Ptr*- und *Ptt*-EFN.**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von *Ptr* (A) bzw. *Ptt* (B) EFN-Längsschnitten zeigen, dass *Ptt*, im Gegensatz zu *Ptr*, neben der Aufteilung in NE, NP und SNP eine besonders abgegrenzte, äußerste epidermale Zellschicht aufweist. NE = Nektarienepidermis; NP = Nektarienparenchym; SNP = Sub-Nektarienparenchym. Abbildung verändert aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Detailreichere transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Escalante-Pérez et al. 2012) zeigten, dass beide Nektarien-Typen stark fragmentierte Vakuolen, viele Mitochondrien und viel endoplasmatisches Retikulum besitzen. Diese Anzeichen einer hohen Metabolismus-Aktivität sind typisch für Nektar produzierende und sekretierende Zellen. Ultrastrukturaufnahmen bestätigten außerdem den besonderen Aufbau der speziellen epidermalen *Ptt*-Zellschicht. Durch Plasmodesmata miteinander verbunden, scheinen diese modifizierten Zellen vom Rest der Nektarie symplastisch vollständig isoliert zu sein. Eine weitere Besonderheit von *Ptt*-Nektarien ist die Vielzahl an Vesikeln, die in ihren sekretorischen Zellen und im äußeren Apoplasten gefunden werden konnten. Diese deuten nicht nur auf eine hohe endo/exocytotische Aktivität hin, sondern könnten auch einen möglichen „Massentransport“ von vesikulären Einschlüssen durch „multivesicular bodies“ (MVB, engl. für multivesikuläre Körper) belegen. Solche

multivesikulären Strukturen konnten nahe des äußeren Apoplasten der *Ptt*-Nektarienepidermiszellen identifiziert werden. Dies bestätigte, dass Nektar-Komponenten in *Ptt* möglicherweise mit Hilfe von MVB in den Apoplasten sekretierender Zellen transportiert werden.

Beide, sowohl *Populus trichocarpa* als auch *Populus tremula tremuloides*, besitzen alle notwendigen Voraussetzungen für Nektar-Produktion bzw. -Sekretion. Auf Grund des unterschiedlichen morphologischen Aufbaus und Sekretionsverhaltens ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass verschiedene Nektarien-Typen vorliegen. Alle bisherigen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es sich bei *Ptt*-Nektarien um einen kontinuierlich sekretierenden, granulokrinen Typ handelt, während *Ptr*-Nektarien eine einmalige holokrine Sekretion aufweisen.

### **1.8.2. Nektar-Zusammensetzung**

Die Hauptfunktion von extrafloralem Nektar liegt, wie bereits erwähnt, in der Rekrutierung karnivorer Fraßfeinde angreifender Herbivoren. Seine Zusammensetzung spielt dabei eine wichtige Rolle für die Art und Variabilität der angelockten Besucher (Escalante-Pérez and Heil, 2012b). Wie die meisten Nektare besteht auch extrafloraler Pappelnektar zu einem großen Teil aus Zuckern. Hauptsächlich konnten dabei die Monosaccharide Glukose bzw. Fruktose und das Disaccharid Saccharose identifiziert werden. Während *Ptt*-Nektar ein ausgeglichenes Verhältnis von Glukose, Fruktose und Saccharose besitzt, zeigt *Ptr* eine Hexose-lastige Zuckerzusammensetzung. Dieser Unterschied hat womöglich Auswirkungen auf die Art der angelockten Besucher. Welche Tiere bzw. Insekten tatsächlich von *Ptr* bzw. *Ptt* angelockt werden war Teil der hier vorliegenden Arbeit (3.1.4.1).

Solche Zucker-lastigen Lösungen stellen gleichsam ideale Wachstumsbedingungen für pathogene Mikroorganismen dar. Nektarien, durch Sekretion gleich welcher Art, bilden ein „offenes Tor“ für bakterielle oder pilzliche Angreifer. Neben anderen Verteidigungsstrategien stellen deshalb beispielsweise anti-pathogene Proteine einen unverzichtbaren Bestandteil des Nektars dar (Escalante-Pérez and Heil, 2012b). Alle in *Populus trichocarpa* Nektar identifizierten 15 Proteine konnten mit solch einer Pathogen-Abwehr in Verbindung gebracht werden und scheinen daher von großer Bedeutung zu sein (Escalante-Pérez et al., 2012b). Diese Proteine gehörten entweder der Klasse der GDSL-Lipasen (fünf) oder der PR- Proteine (engl. PR für pathogen related, Pathogen assoziiert;

10 Proteine aus acht PR-Protein Klassen) an. GDSL Lipasen katalysieren die Spaltung von Esterbindungen. Dabei degradieren sie hauptsächlich Membran- bzw. Zellwandlipide von Pilzsporen (Kram et al., 2008). Die Familie der PR-Proteine besteht aus 17 verschiedenen Klassen (Sels et al., 2008). Unter den identifizierten PR-Proteinen befanden sich viele Chitinasen, beta 1,3-Glukanasen oder auch z.B. Hevein-ähnliche Proteine, die Chitin oder 1,3-Glukane, Hauptbestandteile mikrobieller Zellwände, spalten. Spezifische Proteine, denen allgemein eine antimykotische Funktion zugeschrieben wird, wie Kunitz-ähnliche Trypsin Inhibitoren, SCP-Proteine (engl. single cell protein) oder Thaumatin-ähnliche Proteine wurden in *Ptt*-Nektar gefunden. Dieser Cocktail zeigte bei dem Human-, Tier- und Pflanzen-Pathogen *Fusarium solani*, das an ausgetrockneten Pappel-EFN gefunden worden war, eine äußerst starke antibiotische Wirkung (Escalante-Pérez and Heil, 2012b).

### **1.8.3. Nektarien-Ökologie**

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen von María Escalante Pérez zeigten beide Pappeln unterschiedliches Auftreten extrafloraler Nektarien. Während im Frühjahr, zu Beginn der Vegetationsperiode, alle neuen *Ptt*-Blätter bereits sekretierfähige Nektarien aufwiesen, zeigte *Ptt* nur Nektarien-freie Blätter. Im Gegensatz zu *Ptt* bildete *Ptt* erst nach Befall durch Herbivoren oder Schädlinge EFN aus. Studien mit mechanischer Verwundung von intakten Pflanzen und Nektarien-freien Blättern zeigten aber, dass zwar innerhalb von 24h EFN ausgebildet wurden, jedoch selbst nach einigen Tagen keine Nektar-Sekretion festgestellt werden konnte. Diese „Neubildung“ von EFN als Reaktion auf Verwundung bestätigte eine mögliche Induktion bzw. Regulierbarkeit von *Ptt*-Nektarien. Der rein mechanische Verletzungsstimulus genügte dabei jedoch nicht, um Nektar-Sekretion auszulösen. Demnach investierte nur *Ptt*, nicht aber *Ptt* von Beginn an kontinuierlich in diese energieaufwändige Schutzfunktion. Zusammengefasst zeigten *Ptt* und *Ptt* also eindeutig verschiedene Strategien bei der indirekten Abwehr von Herbivoren durch extrafloralen Nektar. Beobachtungen über die Dauer von vier Jahren, in denen diese Arbeit angefertigt wurde, konnten jedoch nicht all diese Erkenntnisse bestätigen (3.1.1 und 3.1.2).

### **1.8.4. Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)**

Die fehlende Nektarien-Präsenz von *Ptt*-Pflanzen zu Beginn der Vegetationsperiode ließ vermuten, dass dieser Pappeltyp eine Alternativstrategie entwickelt hatte, die eine erste Barriere gegen Herbivoren ermöglicht, noch bevor EFN gebildet werden konnten.

Flüchtige organische Verbindungen (VOCs, engl. volatile organic compounds) spielen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, in vielen Pflanzenfamilien eine entscheidende Rolle in der systemischen Resistenz befallener, aber auch benachbarter Pflanzen. Messungen von *Ptr*-Pflanzen nach mechanischer Verwundung zeigten, dass hauptsächlich das Sesquiterpen Farnesen freigesetzt wurde, eine typische, durch Verwundung entstehende flüchtige Verbindung. Pflanzen, behandelt mit dem Phytohormon Jasmonsäure, wodurch eine herbivore Verletzung simuliert wird, oder Pflanzen, die durch echten Herbivorenbefall (*Spodoptera littoralis*) verletzt worden waren, sandten zusätzliche VOCs aus. So konnten zum Beispiel Ocimen oder das Homoterpen TMTT (4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen) identifiziert werden, die beide in vielen Pflanzenfamilien als typische VOCs nach herbivorer Verletzung auftreten (War et al., 2011).

### **1.8.5. Nektarien-spezifische Genexpression**

In wieweit sich die speziellen Eigenschaften der Nektarien auch in ihren Expressionsmustern widerspiegeln, sollte durch Microarray-Analysen von extrafloralen Nektarien im Vergleich zu Blättern ohne Nektarien geklärt werden. Bereits bei der ersten Auswertung (jeweils 3 Proben extraflorale Nektarien bzw. Blätter ohne Nektarien von *Ptt*) mit Hilfe eines sogenannten Ordinationsplots fiel auf, dass eine Blattprobe nicht eindeutig den beiden anderen Blattproben zugeordnet werden konnte. Die weitere Auswertung basierte deshalb auf den verbliebenen fünf Proben und wurde bioinformatisch entsprechend angepasst. Dabei wurden ca. 61.000 Pappeltranskripte untersucht. Eine Auswahl von zunächst 300 der 500 am stärksten differenziell exprimierten Transkripte wurde analysiert und kategorisiert. Viele der in Nektarien stärker exprimierten Gene konnten dabei dem Zellwand-, Hormon-, oder Kohlenhydrat-Metabolismus, andere der Signalweiterleitung oder der Stresswahrnehmung zugeordnet werden.



## 1.9. Zielsetzung

Viele Pflanzen besitzen neben floralen Nektarien sog. extraflorale Nektarien, die außerhalb der Blüte lokalisiert sind. Diese speziellen Drüsen sind, wie florale Nektarien, ebenfalls in der Lage Insekten anzulocken, dienen dabei aber vor allem der indirekten Abwehr von Herbivoren. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pappelarten *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *P. tremuloides* verfügen über solche Organe. Interessanterweise deuteten die bisherigen Studien zur jeweiligen Nektarien-Struktur, Nektar-Zusammensetzung und beobachteten Sekretionsweise auf zwei unterschiedliche Strategien dieser beiden Pappelarten hin (Escalante-Pérez, 2009). Diese Differenzierung der Herbivoren-Abwehr, sogar innerhalb der gleichen Gattung (*Populus*) bekräftigt, wie wichtig ein optimierter Schutz vor Herbivoren durch extraflorale Nektarien sein kann. Deshalb galt es, verschiedenste funktionale Aspekte beider extrafloralen Nektarien-Arten genauer zu untersuchen und im Besonderen folgende Fragen zu klären:

- **Gibt es Belege dafür, dass extraflorale Nektarien eine unterschiedliche herbivore Abwehrstrategie in den beiden Pappelarten entwickelt haben?**
  - Handelt es sich dabei um eine konstitutive Abwehr?
  - Oder ist die Nektarien-Bildung und/oder Nektar-Produktion induzierbar bzw. regulierbar?
- **Kann die allgemeine indirekte Herbivoren-Abwehrfunktion extrafloraler Nektarien für beide Pappelarten bestätigt werden?**
  - Welche Interaktionspartner werden dabei durch den extrafloralen Nektar angelockt?
  - Wie effektiv sind die jeweiligen extrafloralen Nektarien bei der Verminderung von herbivorem Blattfraß?
- **Was sagt die Transkriptomanalyse von extrafloralen Nektarien über deren Funktion aus?**
  - Welche spezifischen Gencluster sind entscheidend für die Nektarien-Funktion?
  - Welche transkriptionellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede existieren zwischen den extrafloralen Nektarien der beiden Pappelarten?

- **Welche Art der Sekretion wird von der jeweiligen Pappel genutzt?**
  - Wird bei *Populus tremula* x *P. tremuloides*, wie vermutet, extrafloraler Nektar granulokrin und bei *Ptr* holokrin sekretiert?
  - Können bereits auf transkriptioneller Ebene jeweils bestimmte Sekretionstypen ausgeschlossen werden?
  - Wenn ekkrine Sekretion eine Rolle spielt, ist dann für den initialen Wasserausstrom bei der Sekretion, wie beim Stomaschluss in Schließzellen von *Arabidopsis*, ein Mitglied der S-Typ-Anionenkanalfamilie (z.B. SLAH3) verantwortlich?
  
- **Verhalten sich die Anionenkanäle aus *Arabidopsis* und Pappel (*AtSLAH3* bzw. *PttSLAH3*) identisch, oder gibt es funktionelle Unterschiede?**
  - Zeigt *PttSLAH3* ebenfalls S-Typ-Anionenkanal-typische Charakteristika?
  - Wie wird der Pappel-Kanal reguliert?
  - Welche regulierenden Kinasen sind beteiligt?
  - Wo befinden sich die entscheidenden Phosphorylierungsstellen?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden verschiedenste Methoden aus den unterschiedlichsten Bereichen der Biologie angewandt. Neben verhaltensbiologischen Versuchen (Interaktionsstudien von Besuchern, Nektarien und Herbivoren) zur Beleuchtung der Nektarien-Ökologie wurden vor allem molekularbiologische Methoden zur Analyse der Physiologie extrafloraler Nektarien verwendet. Differentielle Transkriptomanalysen mittels quantitativer Realtime PCR und Microarrays sollten allgemein Rückschlüsse auf Art und Weise der jeweiligen Nektar-Produktion und auch Sekretion zulassen. Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten mit elektrophysiologischer Charakterisierung einzelner Kandidaten-Gene durch DEVC-Technik (engl. double electrode voltage clamp) sowie *in situ* Lokalisation sollten schlussendlich zur Identifizierung von Transportproteinen führen, die für eine eventuelle ekkrine Nektar-Sekretion entscheidend sind.

## 2. Material und Methoden

Alle aufgeführten Lösungen, Medien, Primersequenzen, Gensequenzen, Abkürzungen und ein Firmenverzeichnis werden ausführlich im Anhang beschrieben.

### 2.1. Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

In dieser Arbeit wurden zum einen Klone der westlichen Balsam Pappel (*Populus trichocarpa*, **Ptr**, Klon 93-968), zum anderen Pflanzen eines Hybriden aus der europäischen Zitterpappel (*Populus tremula*) und der amerikanischen Zitterpappel (*Populus tremuloides*), *Populus tremula x tremuloides* (**Ptt**, Klon T89) untersucht.

Zur Vermehrung dienten grundsätzlich sterile Kalluskulturen (undifferenzierte, totipotente Zellen). Diese wurden zur Differenzierung der Zellen in sterile Weckgläser mit Medium, welches entsprechende Phytohormone enthielt (PamII-Medium), überführt und in einer Klimakammer unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 22 °C / 8 h Dunkelheit, 17 °C; TLD 58W/840 Super 80, Philips und 58W L58/77, Osram) angezogen. Nach ca. zwei Monaten und einer Größe von ca. 2 - 3 cm wurden die Sprösslinge für eine bessere Bewurzelung in Hydrokulturen (Leitungswasser mit Lewatit HD 50; LANXESS; Langzeitdünger auf Ionenaustauscherbasis) überführt. Nach weiteren zwei bis drei Monaten wurden die ca. 30 bis 50 cm großen Pflanzen in Erde umgepflanzt. Diese wurden daraufhin zweimal pro Woche gewässert und regelmäßig mit WUXAL-Super (MANNA; 0,02%) gedüngt. Neben der Aufzucht unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer wurden einige Pflanzen nach dem Umsetzen in Erde auch unter natürlichen Bedingungen im Freiland kultiviert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden allerdings für die Versuche Pflanzen aus der Klimakammer verwendet.

Neben der relativ umständlichen Vermehrung von Pflanzen über sterile Kulturen konnten *Ptr*-Pflanzen auch durch Stecklinge vermehrt werden. Bei dieser einfachen Art der vegetativen Vermehrung wird sich zu Nutze gemacht, dass die von einer Mutterpflanze abgeschnittenen Sprosssteile einiger Pflanzenarten die Fähigkeit besitzen, in Kultursubstrat (hier einfache Pflanzenerde) Wurzeln auszutreiben. Im Gegensatz zu *Ptt*, waren allerdings nur *Ptr*-Sprosssteile dazu in der Lage. Entsprechend angezogene Pflanzen wurden ebenfalls zweimal pro Woche gewässert, regelmäßig mit WUXAL-Super gedüngt und entweder in der Klimakammer oder im Freiland kultiviert.

## **2.2. Tiermaterial und Raupenaufzucht**

Im Zuge dieser Arbeit wurden Larven fünf verschiedener Raupenarten (*Agrotis segetum*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar*) eingesetzt. Alle ernähren sich polyphag, das heißt von vielen verschiedenen Pflanzenarten. Die Raupen wurden entweder im Stadium kurz nach der Eiablage oder als wenige Tage alte Larven bezogen. Raupen der Art *Agrotis segetum*, *Spodoptera exigua* und *Spodoptera frugiperda* wurden dabei von Dr. Sascha Eilmus (Bayer CorpScience), *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar* Raupen von der AG Prof. Dr. Wilhelm Boland (Max-Planck-Institut, MPI für chemische Ökologie, Jena) zur Verfügung gestellt.

Zur Aufzucht wurden die Eier/Larven je nach Alter bzw. Größe in geeigneter Anzahl in Plastikboxen untergebracht und mit Hilfe eines künstlichen Raupenfutters (siehe 7.4.1) und konstanten Bedingungen (15 Stunden Licht, 25 °C / 9 Stunden Dunkelheit, 22 °; 70 % Luftfeuchtigkeit) in einem Phytotron aufgezogen. Für alle Versuche, bei denen Raupen eingesetzt wurden, wurden Larven verwendet, die sich ungefähr eine Woche vor Beginn der Verpuppung (drittes Larvenstadium) befanden.

## **2.3. Allgemeine Methoden**

### **2.3.1. Induktion von extrafloralen Nektarien bzw. Nektar**

Für die Induktion von extrafloralen Nektarien bzw. Nektar bei *Populus trichocarpa* wurden einjährige, ca. 1 - 1,5 m große Pflanzen verwendet. Wenn nicht anders erwähnt wurden dabei bei jeder Behandlung vier Blätter ohne Nektarien ausgewählt ( $n \geq 3$  Pflanzen) und auf unterschiedliche Weise behandelt. Für die Induktion der Nektar-Sekretion wurden auf gleiche Weise vier Blätter behandelt, die noch-nicht-sekretierende Nektarien besaßen. Zur Auswertung wurden alle Blätter bzw. Nektarien nach entsprechender Behandlung (nachfolgend beschrieben) mit Hilfe eines VHX-100k Digitalmikroskop (Keyence) über 48 h beobachtet und hinsichtlich einer Nektarien- bzw. Nektar-Induktion überprüft.

#### **Induktion durch einfachen mechanischen Schaden**

Für eine einfache mechanische Verletzung wurden Blätter entweder ca. 100mal mit einer Nadel (1 mm Durchmesser) durchbohrt oder ungefähr 10 % des Blattes von der Blattspitze her abgeschnitten.

### **Induktion durch chemische Elicitoren**

Jasmonsäure ist einer der Botenstoffe, der in Pflanzen nach Verwundung eine entscheidende Rolle bei der Abwehrreaktion spielt (siehe auch 1.2 und 1.5). Eine ähnliche, jedoch intensivere Wirkung wie Jasmonsäure zeigt das Phytotoxin Coronathin bzw. sein synthetisches Analogon Coronalon (Svoboda and Boland, 2010). Die zu untersuchenden Blätter wurden deshalb sowohl mit einer wässrigen Jasmonsäure- (0,5 mM bzw. 1 mM) als auch einer Coronalonlösung (0.1 mM) besprüht (Kontrollpflanzen mit Wasser).

### **Induktion durch kontinuierlich fortgeführten mechanischen Schaden (MecWorm)**

Um den durch Herbivoren zugefügten Schaden möglichst real zu simulieren, wurde das Robotersystem MecWorm (bereitgestellt von AG Prof. Dr. Wilhelm Boland, MPI für chemische Ökologie, Jena) verwendet (Mithöfer et al., 2005). Hierbei kann über einen programmierbaren Metallstempel ein Blatt so kontinuierlich geschädigt werden, dass die Verletzung zeitlich und räumlich einem realen Raupenfraß ähnelt. Dafür wurde der MecWorm so programmiert, dass im Laufe von 24 h und mit vier Schlägen pro Minute eine Fläche von 333 mm<sup>2</sup> des behandelten Blattes verletzt wurde.

### **Induktion durch Verletzung und Raupen-Oralsekret**

Um letztlich feststellen zu können, ob für die Antwort auf Herbivorenbefall zusätzlich zum mechanischen Schaden auch chemische Reize der Herbivoren benötigt werden, wurde neben dem Schaden durch MecWorm das Oralsekret einer polyphagen Raupe zugeführt (*Spodoptera littoralis* Sekret bereitgestellt von AG Prof. Dr. Wilhelm Boland, MPI für chemische Ökologie, Jena). Dafür wurde während der Verwundung durch den MecWorm kontinuierlich eine 1:10 mit Wasser verdünnte Lösung des Sekrets in die entstandene Verletzung perfundiert (Maffei et al., 2004).

### **Induktion durch Raupen**

Drei verschiedene polyphage Raupen wurden verwendet, um die Pflanze echter Herbivorie auszusetzen, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar*. Dabei wurden jeweils fünf Larven auf einzelne Blätter einer Pappel gesetzt und ihnen für 24 h das Fressen erlaubt.

## **2.3.2. Analyse flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs)**

Die Analyse flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs, engl. volatile organic compounds) unterschiedlich behandelter *Ptr*-Pflanzen wurde grundsätzlich durch einen einheitlichen Versuchsaufbau ermöglicht. Um keine der freigesetzten VOCs zu verlieren,

wurde die komplette Pflanze mit einem Polyethylenterephthalat (PET)- Folienschlauch (handelsüblicher Bratenschlauch) möglichst luftdicht verschlossen. Eine spezielle, ständig zirkulierende Luftumwälzpumpe („volatile collection device“, Kunert et al., 2009, bereitgestellt von der AG Prof. Dr. Wilhelm Boland, MPI für chemische Ökologie, Jena) wurde daraufhin mit dem abgeschlossenen System verbunden. Ein in die Pumpe eingesetzter Aktivkohle-Filter diente der VOCs-Sammlung, die während des Versuchszeitraums (24, 48 oder 72 h) freigesetzt wurden. Mit Hilfe von zweimal 20 µl Dichlormethan (Lösungsmittel inklusive 50 µg / ml 1-Bromodecan als interner Standard) konnten daraufhin alle organischen Verbindungen aus dem Filter eluiert werden (siehe auch Kunert et al., 2009). Für die eigentliche Analyse entsprechender Eluate bzw. der Ermittlung der freigesetzten VOCs wurden die so generierten Proben ans MPI für chemische Ökologie in Jena (AG Prof. Dr. Wilhelm Boland) geschickt. Dort wurden einzelne chemische Verbindungen von Dr. Maritta Kunert mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS)-Methode identifiziert und durch die Analyse entsprechender Original-Verbindungen verifiziert (siehe auch Escalante-Pérez et al., 2012a).

Die Analyse von freigesetzten VOCs erfolgte wie auch die Untersuchung der Nektarien/Nektar-Induktion an einjährigen *Ptr*-Pflanzen und unter denselben induktiven Bedingungen (siehe 2.3.1). Ergänzend muss erwähnt werden, dass bei der Versuchsdurchführung mit chemischen Elicitoren erst nach dem Trocknen der wässrigen Jasmonsäure- bzw. Coronalonlösung (ca. eine Stunde nach Besprühen) der Beutel um die Pflanze luftdicht verschlossen wurde, damit eine Verfälschung der VOCs-Analyse durch eine erhöhte Luftfeuchtigkeit ausgeschlossen werden konnte. Bei entsprechend langer Versuchszeit (48 oder 72 h) wurde zur Intensivierung der Behandlung außerdem nach jeweils 24 h die Sammlung der VOCs für die Dauer einer erneuten Sprühbehandlung unterbrochen.

### **2.3.3. Versuche zur Effektivität von extrafloralen Nektarien**

Um die Effektivität von extrafloralen Nektarien bei der Herbivoren-Abwehr zu testen, wurden Interaktionsstudien zwischen Pappeln (*Ptr* bzw. *Ptt*), herbivoren Raupen und deren Feinden durchgeführt. Als Versuchsmodell diente eine bereits durchgeführte Interaktionsstudie (Tautz and Rostas, 2008). Diese konnte für Sojabohne und Paprika zeigen, dass allein die Anwesenheit von Honigbienen (*Apis mellifera*) einen reduzierenden

Effekt auf das Fressverhalten von *Spodoptera exigua* Larven hatte. Vorversuche sollten deshalb klären, ob *Spodoptera exigua* auch als herbivore Raupe für Interaktionsstudien mit Pappeln in Frage kommt, oder ob es eine andere, geeignetere Raupenart gibt.

#### 2.3.3.1. Vorversuche

Entscheidend für die Qualifikation als Interaktionspartner waren zwei Faktoren: Entsprechende Larven mussten bevorzugt an *Ptr* bzw. *Ptt* fressen und eine Reaktion auf die Anwesenheit von Bienen zeigen.

Fünf verschiedene polyphage Raupenarten wurden deshalb auf ihre Eignung hin untersucht: *Agrotis segetum*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar*.

##### **Fraßuntersuchungen:**

Fünf Raupen jeder Art wurden in eine Box mit entweder *Ptr*- oder *Ptt*-Blättern gegeben und ihr Fraß nach 24 h kontrolliert und verglichen.

##### **Abwehrverhalten:**

Voraussetzung für die Reaktion der Larven auf die Anwesenheit von Bienen ist die Wahrnehmung von Vibrationen der Luft. Diese Schallwellen, erzeugt von karnivoren Feinden wie Wespen (Bienen erzeugen Vibrationen mit einer ähnlichen Frequenz im Bereich zwischen 100 und 600 Hz), können spezielle Raupenarten über spezifische, winzige Sinneshärchen detektieren (Tautz, 1977; Tautz and Markl, 1978). Alle potentiell geeigneten Raupenarten wurden deshalb mit Hilfe eines Schallwellengenerators, der die Flügelschlagfrequenz von Wespen bzw. Bienen simulieren kann, auf eine positive Abwehrreaktion, also auf eine Unterbrechung des Fraßes hin untersucht.

#### 2.3.3.2. Effektivitätstest

Für die Durchführung der Interaktionsstudien wurden im Sommer 2012 zwei Netzkäfige (Größe 2 m x 2 m x 2 m; Maschengröße 1 mm<sup>2</sup>, siehe auch Abbildung 3.5) im botanischen Garten der Universität Würzburg installiert. Dabei wurde einer der beiden Käfige mit einem Bienenstock (bereitgestellt von Prof. Dr. Jürgen Tautz, BEEgroup Universität Würzburg) verbunden. Zwei Ausgänge am Bienenstock ermöglichten es dem Bienenvolk (ca. 30.000 Bienen), entweder in den Käfig oder in den botanischen Garten zu fliegen. Ein Netzkäfig ohne Anschluss an ein Bienenvolk diente als Kontrolle.

Für die Versuche wurden jeweils neun zweijährige Freiland-*Ptr*- bzw. *Ptt*-Pflanzen (1 bis 2 m Wuchshöhe) gleichmäßig in den Käfigen verteilt. Aufgrund der Raupen-Vorversuche

wurden zu Beginn des Versuchs jeweils zehn *Spodoptera exigua* Larven auf eine Pflanze gesetzt. Nach 5 - 10 Tagen hatten die meisten Raupen ihre Entwicklung abgeschlossen und verpuppten sich. Um die Gesamt-Fraßfläche für eine genauere Auswertung zu erhöhen, wurden deshalb sieben Tage nach Versuchsbeginn erneut zehn Tiere pro Pflanze eingesetzt. Nach Beendigung aller Fraßtätigkeiten (ungefähr zwei Wochen) wurde der Versuch beendet. Für die Auswertung des Effektivitätstests wurde der Fraßschaden jeder einzelnen Pflanze dokumentiert und mit Hilfe einer Referenzfläche und der Software Adobe Photoshop (Version 12.0) die Fraßfläche pro Pflanze bestimmt. Daraufhin konnte mittels der Software Excel (Microsoft) der Mittelwert des Schadens pro Pflanze und der Gesamtfraß aller neun Pflanzen des entsprechenden Käfigs ermittelt werden.

#### **2.3.4. Microarrays, biostatistische Auswertung und Analyse**

Für die genomweite Expressionsanalyse von *Populus tremula* x *P. tremuloides* extrafloralen Nektarien gegen Blatt wurden bereits vorhandene *Ptt*-Microarray-Daten (Escalante-Pérez, 2009) detailliert ausgewertet. Die Analyse basierte dabei auf drei Proben *Ptt*-EFN und drei Proben *Ptt*-Blatt. Aufgrund einer nicht eindeutig möglichen Zuordnung musste eine der Blattproben bereits für die erste Auswertung ausgeschlossen werden. Rohdaten der übrigen Proben wurden für die vorliegende Arbeit erneut mit Hilfe einer angepassten statistischen Auswertung von Dr. Tobias Müller und Dr. Dr. Marcus Dittrich (Zentrum für Bioinformatik, Universität Würzburg) biostatistisch analysiert (für Details siehe Escalante-Pérez et al, 2012a). Dadurch konnte für alle auf den Microarrays identifizierten Transkripte (ca. 56.000) ein korrigiertes Expressionsverhältnis bestimmt werden. Während der so erhaltene logFC (Logarithmus zur Basis 2 des Induktionsfaktors, engl. fold change, FC) angibt, inwieweit das betrachtete Transkript differenziell zwischen extrafloralen Nektarien und Blatt exprimiert ist, wird durch den „adj.P-val“ (adjusted P-value, engl. für angepasster P-Wert) die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der das Transkript fälschlicherweise als differenziell eingestuft wurde. Alle adj.P-val Werte kleiner als 0,05 (also unter 5% Fehlerwahrscheinlichkeit) galten als signifikant.

Für eine Übersicht der 500 am stärksten differenziell exprimierten Gene wurden die Kategorisierungssoftware MapMan eingesetzt (Version 3.1.1., <http://mapman.gabipd.org/web/guest>, Usadel et al., 2009). Dazu wurden alle 500 Transkripte über ihre Affymetrix ID (Affymetrix probe set ID = die dem jeweiligen Transkript von der Firma Affymetrix spezifisch zugewiesene Identifizierungsnummer) und



mit ihren aus dem Array-Experiment hervorgegangenen logFCs in die Software importiert und mit Hilfe der Zuordnungsmappe (engl. mapping) „Populus trichocarpa/Ptrich\_AFFY\_09: 1.0“ und der Pfadeinteilung (engl. pathway) „Overview 1.0“ kategorisiert.

### **2.3.5. Nektar-Anionenanalyse**

Zur Analyse der Anionen in sekretiertem *Ptt*-Nektar wurden sechs ein- bis zweijährige *Ptt*-Pflanzen verwendet. Zu Beginn des Sammelzeitraums wurde der gesamte, bereits sekretierte Nektar entfernt und verworfen. Nach 24 h wurde dann der gesamte produzierte Nektar aller sechs Pflanzen gesammelt und zu einer Probe vereint. Bedingt durch die zähflüssige Konsistenz des Nektars musste das Sammeln des sekretierten Nektars über eine kontrollierte Verdünnung an den Nektarien erfolgen. Dazu wurde, je nach produzierter Nektar-Menge, 30 bzw. 50 µl H<sub>2</sub>O pro Probe verwendet. So konnte über die Massenzunahme das Nektar-Volumen in der finalen Auswertung die Anionenkonzentration in Abhängigkeit von „Nektar gesammelt pro Tag und Nektarie“ bestimmt werden.

Für die eigentliche Anionenanalyse wurden fünf Proben zu Dr. Judy Simons (Professur für Baumphysiologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) geschickt und dort mittels Ionenchromatographie untersucht.

### **2.3.6. Immunfluoreszenz-Markierung von *Ptt*-EFN**

Für Immunfluoreszenz-Studien an *Ptt*-EFN mussten entsprechend Schnitte von extrafloralen Nektarien hergestellt werden. Nur die beiden ersten Schritte dieses Prozesses - Fixierung und Entwässerung - wurden dabei selbst durchgeführt.

Für die Fixierung wurden *Ptt*-EFN mit Hilfe eines Skalpells vom Blatt getrennt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die Schnittstelle während des gesamten Vorgangs unter PBS-Puffer befand, um durch das darin enthaltene EGTA einen Wundverschluss zu verhindern und alle weiteren Schritte zu ermöglichen. Die eigentliche Fixierung der EFN fand für 60 min in Fixativ-Lösung statt. Anschließend folgten 30 min Inkubation in Pipes-Puffer, gefolgt von 15 min in PBS-Puffer. Die Dehydratation der Nektarien wurde durch jeweils 30 minütige Inkubationsschritte in aufsteigend 30, 50, 70 % Ethanol in PBS und abschließend reinem Ethanol erreicht. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Entwässerte Proben wurden dann in Ethanol an Dr. Andrea Olbrich (AG Fromm, Zentrum für Holzwirtschaft, Universität Hamburg) verschickt. Die weiteren Schritte der Probenvorbereitung (Einbettung; Herstellung von Dünnschnitten) sowie die Immunfluoreszenz-Markierung mit PttSLAH3-spezifischem Antikörper (siehe dazu 2.5.2.1) wurden von der AG Fromm durchgeführt.

## **2.4. Molekularbiologische Methoden**

Einige der in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden wurden bereits in der Diplomarbeit des Autors (Untersuchungen an extrafloralen Nektarien der Pappel, 2008, Universität Würzburg) ausführlich beschrieben und wurden deshalb übernommen bzw. entsprechend modifiziert.

### **2.4.1. Bakterienkulturen**

#### **2.4.1.1. Verwendete Stämme**

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien der Laborstämme MRF<sup>+</sup> und Rosetta verwendet, um DNA zu transformieren und *in vivo* zu amplifizieren. Grundsätzlich wurden für alle Transformationsarbeiten (2.4.2.8) MRF<sup>+</sup> Zellen benutzt. Nur für die Expression rekombinanter Proteine mit Hilfe des GST-Expressionssystem (2.5.1.1) dienten Rosetta Zellen, da diese eine hohe Protein-Expressionsrate aufweisen und eine gezielte Induktion der Expression durch IPTG ermöglichen. Bakterien mit gesteigerter Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNA (kompetente Zellen) wurden von den technischen Assistentinnen des Instituts hergestellt und bei -80°C gelagert (Ultralow MDF 792, Sanyo).

#### **2.4.1.2. Selektion von Klonen**

Zur Selektion positiver Klone wurden transformierte MRF<sup>+</sup>-Zellen auf einer Ampicillin (Amp)- und Rosetta-Zellen auf einer Ampicillin-Chloramphenicol (Amp-Cam)-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Temperaturschrank (Memmert; Schwabach, Deutschland) inkubiert. Ohne das durch die Transformation aufgenommene Amp-resistente Plasmid bzw. die Eigenresistenz der Rosetta Zellen gegen Chloramphenicol konnten untransformierte Bakterien der verwendeten *E. coli* Laborstämme nicht auf den Antibiotika enthaltenden Nährmedien wachsen, da ihnen das nötige Resistenzgen fehlt. Klone, die auf diesen so genannten Selektionsplatten wuchsen,

haben somit das Plasmid mit den entsprechenden Resistenzgenen aufgenommen. Kolonien dieser positiven Klone wurden in frisches LB<sub>Amp</sub>- bzw. LB<sub>Amp-Cam</sub>-Medium überführt und als Übernachtskulturen (2.4.1.3) angezogen. Durch Isolierung der Plasmid-DNA (2.4.2.3.2) und anschließenden Restriktionsverdau (2.4.2.10) konnte daraufhin bei positiven Klonen sowohl die Gegenwart des Inserts als auch, sofern notwendig, die Orientierung dessen ermittelt werden. Um die genaue DNA-Sequenz zu ermitteln, wurde gegebenenfalls eine Sequenzierung (2.4.2.11) der positiven Klone durchgeführt.

#### 2.4.1.3. **Übernachtskulturen**

Um ausgewählte Bakterienkolonien zu vermehren, wurde in ein 15 ml Reagenz-Gefäß 5 ml frisches, je nach Resistenzgen der Plasmid-DNA bzw. verwendeten Zellen LB<sub>Amp</sub>- oder LB<sub>Amp-Cam</sub>-Medium gegeben. Diese Flüssigkulturen wurden mit einzelnen Bakterienkolonien von einer Selektionsplatte oder durch Übernahme aus anderen Flüssigkulturen angeimpft. Die Nährlösungen wurden über Nacht (12–18 h) bei 37 °C unter ständigem Schütteln (NewBrunswick Shaker Incubator, G25, NewBrunswick scientific) inkubiert.

### 2.4.2. **DNA-Techniken**

#### 2.4.2.1. **Primer Design**

Zur Generierung von geeigneten Oligonukleotid-Sequenzen (Primer) für PCR-Reaktionen bzw. DNA-Sequenzierungen wurden drei verschiedene Softwareprodukte verwendet. Alle Primer für die Verwendung bei der SMART-RACE-Methode (2.4.2.14), für Klonierungsaufgaben in Verbindung mit dem pGem<sup>®</sup>T-Easy-Vektor-Systems (2.4.2.6.1) und alle Sequenzierungsprimer wurden mit Hilfe der Primer Analyse Software Oligo (Version 6.63, Molecular Biology Insights) designt. Die gesamte Primer Herstellung für Klonierungen mit dem USER-System (2.4.2.6.2) wurde mit der Software Vektor NTI<sup>®</sup> 10.3.1 (Invitrogen) durchgeführt. Um geeignete Primer für die qPCR (2.4.2.12) zu generieren, wurde die Software LightCycler Probe Design (Version 1.0, Roche) und die Primer Analyse Software Oligo (Molecular Biology Insights) verwendet.

Die meisten Primer wurden über das Oligonukleotid-Synthese-Unternehmen TIB Molbiol bezogen. Nur Primer für die Verwendung der USER-Technik wurden aufgrund der nötigen Uracilbase bei Metabion bestellt.

#### 2.4.2.2. **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit der Polymerasekettenreaktion (kurz PCR, für engl. polymerase chain reaction) können *in vitro* DNA-Fragmente (Template-DNA) exponentiell vervielfältigt, amplifiziert werden (Mullis et al., 1986). Dazu werden drei, bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufende Reaktionsschritte zyklisch wiederholt: Denaturierungs-, Primerannealings (engl. für Anlagerung)- und Elongationsphase. Im ersten Schritt wird die Template-DNA, abhängig von der thermischen Stabilität der verwendeten Polymerase, denaturiert, so dass einzelsträngige DNA vorliegt. Während der Annealing-Phase wird die Stringenz über die Temperatur so weit herabgesetzt, dass die gewünschten Primer an die einzelsträngige DNA binden können. Die Wahl der eingesetzten Primer wird dabei durch die zu amplifizierende DNA-Sequenz bestimmt, wobei die Desoxyribonukleotide mit einer Länge von ca. 15 bis 40 Nukleotiden das zu amplifizierende Fragment up- bzw. downstream (engl. stromauf bzw. –abwärts) komplementär flankieren. Die optimale Anlagerungstemperatur ist spezifisch und abhängig von Geometrie und Länge der Oligonukleotide. Wird eine zu niedrige Temperatur gewählt, kann es zu unspezifischen Primerbindungen kommen, wird sie zu hoch gewählt, zu gar keiner. In der folgenden Elongationsphase wird auf die Temperatur erhöht, die dem Aktivitätsoptimum der verwendeten Polymerase entspricht. Ausgehend von den Primern wird so, indem entsprechende dNTPs eingebaut und verknüpft werden, ein neuer, zur Matrize komplementärer DNA Strang synthetisiert. Durch die Wiederholung dieser drei temperaturgesteuerten Reaktionsschritte, die ungefähr 40mal erfolgen können bevor die Polymeraseaktivität abnimmt, kann die Menge des gewünschten DNA-Fragments exponentiell amplifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich „proofreading“ (engl. für Korrekturlesen)-Polymerasen nach Protokoll des Herstellers eingesetzt, die Polymerase PfuTurbo<sup>®</sup>C<sub>x</sub> Hotstart (Stratagene), die Phusion<sup>™</sup> DNA Polymerase (Finnzymes) und ein spezieller für eine T/A-Klonierung (2.4.2.6.1) geeigneter Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). „Proofreading“-Polymerasen besitzen neben ihrer Fähigkeit, DNA möglichst exakt zu kopieren auch die Funktion, fälschlicherweise eingebaute Nukleotide während des Prozesses zu entfernen und durch richtige zu ersetzen.

Alle PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Deckelheizung (MWG AG Primus 96 plus, MWG-Biotech) durchgeführt. Entsprechende PCR-Produkte wurden daraufhin mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (2.4.2.3) überprüft und gegebenenfalls aufgereinigt (2.4.2.4).

#### 2.4.2.2.1. Kolonie-PCR

Für die schnelle Überprüfung von Bakterienkulturen auf positive bzw. falschpositive Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei der Identifizierung unbekannter cDNA Enden (SMART Race Technik, siehe 2.4.2.14) konnte so eine Vielzahl an transformierten Plasmiden in relativ kurzer Zeit überprüft werden. Denn im Unterschied zu einer normalen PCR diente bei der Kolonie-PCR nicht eine zuvor über den Umweg einer Übernachtskultur und anschließenden Plasmid-DNA Isolation (2.4.2.9) isolierte DNA als Template, sondern direkt eine Bakterienkolonie. Der Ablauf der PCR änderte sich insoweit, dass vor Beginn der eigentlichen Amplifikation der komplette PCR-Ansatz mit Bakterienkultur aber ohne Enzym für 15 min bei 95 °C erhitzt wurde. Alle Bakterienzellen lagen dadurch aufgebrochen vor und die DNA war frei zugänglich. Erst dann wurde die entsprechende Polymerase zugegeben und nach Herstellerangaben bzw. Primerbedingungen weiter verfahren.

Alle Bakterienkolonien, die in dieser Arbeit überprüft wurden, waren mit einem Plasmid transformiert, welches mit Hilfe des pGEM<sup>®</sup> T-easy-Vektor-Systems (2.4.2.6.1) generiert wurde. Dieser pGEM<sup>®</sup> T-easy Vektor besitzt flankierend vom zu untersuchenden Insert jeweils Primerbindungsstellen für M13fwd- bzw. M13rev-Primer. Um positive bzw. falsch positive Klone identifizieren zu können, wurden deshalb entsprechende Primer für eine Kolonie-PCR verwendet. Das PCR-Produkt konnte daraufhin durch Agarose-Gel-Elektrophorese (2.4.2.3) überprüft und gegebenenfalls durch eine Sequenzierung (2.4.2.11) analysiert werden.

#### 2.4.2.2.2. USER-PCR

Für die Durchführung einer Klonierung mit dem USER-System (2.4.2.6.2) ist es entscheidend, dass am amplifizierten USER-PCR-Produkt jeweils zwei, mindestens acht Nukleotid-lange 3'-Überhänge erzeugt werden können. Um diese Überhänge möglich zu machen, musste bei der Herstellung der USER-Primer darauf geachtet werden, dass am 5'-Ende der Primer und am 3'-Ende der mindestens acht Nukleotid-lange zum Vektorüberhang komplementären Sequenz ein Desoxyuridin (dU) eingebaut wurde. Nur so entstanden mittels USER-Reaktion entsprechende Überhänge, die eine Verknüpfung von USER-PCR-Produkt und USER-Vektor erlaubten.

Entscheidend für die Durchführung einer USER-PCR ist deshalb auch, dass die verwendete Polymerase nicht nur eine Korrekturlese-Funktion besitzt, sondern dass sie in der Lage ist Uracile zu lesen, damit diese nicht fälschlicherweise während der

Amplifikation entfernt werden. Beide in der vorliegenden Arbeit dazu verwendeten Polymerasen, PfuTurbo<sup>®</sup>C<sub>x</sub> Hotstart (Stratagene) und Phusion<sup>™</sup> DNA Polymerase (Finnzymes), besitzen diese Eigenschaft (Norholm, 2010). Das PCR-Produkt wurde daraufhin mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (2.4.2.3) überprüft und gegebenenfalls aufgereinigt (2.4.2.4). Wurde als Template eine Plasmid-DNA verwendet, musste außerdem vor der Aufreinigung des PCR-Produkts ein DpnI (Fermentas)-Restriktionsverdau (2.4.2.10) mit anschließender Inaktivierung des Enzyms erfolgen. Denn dieses Enzym spaltet methylierte DNA und somit nur Plasmid-DNA und nicht das neu amplifizierte PCR-Produkt. Dadurch wird verhindert, dass es bei gleicher Antibiotika-Resistenz von Template-Plasmid und kloniertem Plasmid zu falsch positiven Klonen kommt.

### 2.4.2.3. DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese

#### 2.4.2.3.1. DNA-Auftrennung

Die Methode der Agarose-Gel-Elektrophorese wird hauptsächlich verwendet, um die Größe, die Sauberkeit, den Intaktheitsgrad oder allgemein das Vorhandensein eines bestimmten DNA- oder RNA-Fragmentes zu überprüfen. Dabei macht man sich zum einen die Porengröße der Gelmatrix aus dem Polysaccharid Agarose und zum anderen die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA- oder RNA-Stränge zu Nutzen.

Die Auftrennung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente beruht auf der Interaktion der DNA Stränge mit dem Polysaccharid Agarose. Je geringer konzentriert Agarose im Gel vorliegt, desto größer ist die Maschengröße des Gels und desto größere Fragmente können darin aufgetrennt werden. Legt man in der Elektrophoresekammer eine Spannung an, wird die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode angezogen und durch die Agarose-Gelmatrix bewegt. Dabei wandern Fragmente umso schneller, je kleiner sie sind. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, werden dem Gel bereits im flüssigen Zustand Farbstoffe zugesetzt, die mit der helikalen Nukleinsäurestruktur interkalieren und bei Anregung durch UV-Licht (Wellenlängenbereich ca. 260 - 360 nm) dokumentiert werden können.

Zur Herstellung der Gele wurden Universal-Agarose (Bio&SELL), Ethidiumbromid (1 µl / 100 ml Gel) und als Laufpuffer TBE verwendet. Im Laufe der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch Ethidiumbromid durch den weniger toxischen Farbstoff GelGreen<sup>™</sup> Nucleic Acid Stain (5 µl / 100 ml Gel, Biotium) ersetzt und dabei TAE als Laufpuffer verwendet. Vor dem Beladen des Gels wurde die DNA mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Eine mit

PstI verdaute  $\lambda$ -Phagen-DNA (Fermentas) wurde als Größenstandard aufgetragen. Nach Auftrennung der Proben bei 70 – 100 V erfolgte die Aufnahme der Gelbilder mit Hilfe des Intas UV Imager (Intas).

#### 2.4.2.3.2. DNA-Auftrennung für anschließende DNA-Extraktion

Für DNA-Auftrennungen, bei denen für nachfolgende Untersuchungen eine intakte und fehlerfreie DNA wichtig war, wurde ein spezieller Farbstoff eingesetzt. Bei „SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain“ (Molecular Probes) handelt es sich um einen Farbstoff, der sich ebenfalls an die DNA anlagert, aber mit Hilfe von Licht der Wellenlänge 495 nm detektiert werden kann. Im Gegensatz zu Ethidiumbromid oder GelGreen Gelen konnten so DNA-Fragmente ohne UV-Licht sichtbar gemacht werden. So wird verhindert, dass in der DNA durch UV-Licht Mutationen und Thymin-Dimerbildungen entstehen, was eine fehlerhafte Translation der DNA zur Folge hätte.

Dazu wurden Probenpuffer und  $\lambda$ -PstI-Marker im Verhältnis 1 zu 10.000 mit SYBR-Gold versetzt. DNA-Fragmente konnten daraufhin unter Zuhilfenahme eines Dark Readers (Transiluminator DR-45M, MoBiTec) aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt werden.

#### 2.4.2.4. **DNA Extraktion/Aufreinigung**

Die Extraktion und/oder gleichzeitige Aufreinigung von DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

#### 2.4.2.5. **DNA (RNA) Quantifizierung**

Für die genaue Konzentrationsbestimmung einer DNA- oder RNA-Probe wurde ein NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

#### 2.4.2.6. **Klonierungsmethoden**

##### 2.4.2.6.1. T/A-Klonierung mittels pGEM<sup>®</sup> T-Easy-Vektor-System

Beim pGEM<sup>®</sup> T-Easy-Vektor-System (Promega) handelt es sich um eine sog. T/A-Klonierungsmethode. Dabei wird mit Hilfe von 5'-Adenin (A)-Überhängen an einem PCR-Produkt und 3'-Thymin (T)-Überhängen am entsprechenden Vektor das DNA-Fragment durch eine Ligase mit dem Vektor verbunden. Die A-Überhänge des PCR-Produkts resultierten daraus, dass die für die PCR verwendete Polymerase (hier Advantage 2

Polymerase Mix, Clontech) an das 3'-Ende eines zu synthetisierenden Stranges ein zusätzliches Nukleotid anfügte, überwiegend ein Adenin. Der mitgelieferte pGEM<sup>®</sup> T-Easy Vektor selbst stellt bereits einen linearisierten und mit Thymin-Überhängen versehenen Vektor dar. Die folgenden Ligations- und Transformations-Schritte in chemisch kompetente MRF<sup>-</sup>-Zellen wurden daraufhin nach Herstellerangaben durchgeführt. Die vorhandene Ampicillin-Resistenz des Vektors ermöglichte eine Selektion der gewünschten Klone über LB<sub>Amp</sub>-Platten (2.4.1.2). Da es sich bei einer T/A-Klonierung aber immer um eine ungerichtete Reaktion handelt, konnten PCR-Produkte sowohl in sense (richtige Orientierung) als auch in anti-sense Richtung in den Vektor eingebaut werden. Deshalb musste die Orientierung des DNA-Inserts nach einer erfolgreichen Klonierung entweder durch einen Restriktionsenzymverdau (2.4.2.10) oder durch eine Kolonie-PCR (2.4.2.2.1) mit anschließender Sequenzierung überprüft werden.

#### 2.4.2.6.2. Klonierung mittels USER-Systems

Die USER-Methode (engl. Uracil-specific excision reagent = Uracil-spezifisches Entfernungsmittel) nach Nour-Eldin (2006) basiert auf der Verwendung des USER<sup>™</sup> enzyme-mix (New England BioLabs), der die Entfernung einer Uracilbase und die Entstehung von acht Nukleotid-langen 3'-Überhängen an den Enden des speziell amplifizierten USER-PCR-Konstrukts (2.4.2.2.2) katalysiert. Durch die zuvor in die „multiple cloning site“ (engl. für multiple Klonierungsstelle) des gewünschten Vektor eingefügte spezifische 38 bp lange, sog. PacI- oder auch USER-Kassette, können im linearisierten Vektor durch einen entsprechenden Enzymverdau mit PacI (Fermentas) und Nt.BbvCI (New England BioLabs) ebenfalls acht Nukleotid-lange komplementäre 3'-Überhänge generiert werden. Damit besitzen das PCR-Fragment und der Vektor so lange zueinander komplementäre Überhänge, dass beide ohne eine zusätzliche Ligase ein stabiles Hybridisierungsprodukt bilden können. Dadurch, dass sich die Überhänge am 5' und am 3' Ende sowohl des Vektors als auch des PCR-Fragments durch ein Nukleotid unterscheiden, wird außerdem verhindert, dass eine Religation des Vektors stattfindet und zusätzlich ein gerichteter Einbau des PCR-Produkts in den Vektor ermöglicht. Die Klonierung mittels USER-System ist deshalb wesentlich schneller und effizienter als andere Klonierungsmethoden und ermöglicht ein sehr einfaches und schnelles Einbauen von einem oder auch mehreren unterschiedlichen PCR-Fragmenten in eine Vielzahl entsprechend vorbereiteter spezifischer Vektoren.



Für Klonierungsarbeiten wurden bereits linearisierte und mit PacI/Nt.BbvCI verdaute USER Vektoren (bereitgestellt von der AG Prof. Dr. Dietmar Geiger, J-v-S Institut, Würzburg, Tabelle 2.1) verwendet. Bei vier dieser USER-Vektoren (pNB1u-) handelte es sich um speziell für die Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* geeignete Vektoren. Für Lokalisations- bzw. Interaktionsstudien mittels BiFC (engl. bimolecular fluorescence complementation, siehe auch 2.6.3) waren drei dieser Vektoren downstream der USER-Kassette so mit dem Gen für das Fluorophor YFP (engl. yellow-fluorescent-protein, Vektor #20) bzw. entsprechenden Hälften des Proteins (Vektor #18 bzw. #20) präpariert, dass nach Insertion des Zielgens bei der Expression ein entsprechendes Fusionsprotein entstand. Für die IPTG-induzierbare Expression von Proteinen in Bakterienzellen wurde ein USER-Proteinexpressionsvektor (pGEX-6P-1 V5 HIS) eingesetzt, der auf Basis des pGEX-6P-1 Vektors (GE Healthcare Europe) optimale Expression in *E. coli*-Zellen erlaubte (siehe auch 2.5.1.1).

Vektor	Bezeichnung	Funktion und Modifikation
#16	pNB1u	USER kompatibler Oozyten-Expressionsvektor
#18	pNB1u C-term YC	USER kompatibler Oozyten-Expressionsvektor mit C-terminaler Hälfte des YFPs downstream der USER Kassette für Interaktionsstudien
#20	pNB1u C-term YN	USER kompatibler Oozyten-Expressionsvektor mit N-terminaler Hälfte des YFPs downstream der USER Kassette für Interaktionsstudien
#22	pNB1u C-term YFP	USER kompatibler Oozyten-Expressionsvektor mit YFP downstream der USER Kassette für Lokalisationsstudien
#23	pGEX-6P-1 V5 HIS	USER kompatibler Protein-Expressionsvektor mit GST-tag stromaufwärts (engl. upstream) und HIS-tag downstream der USER Kassette für die induzierte Expression in Bakterienzellen

**Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren.**

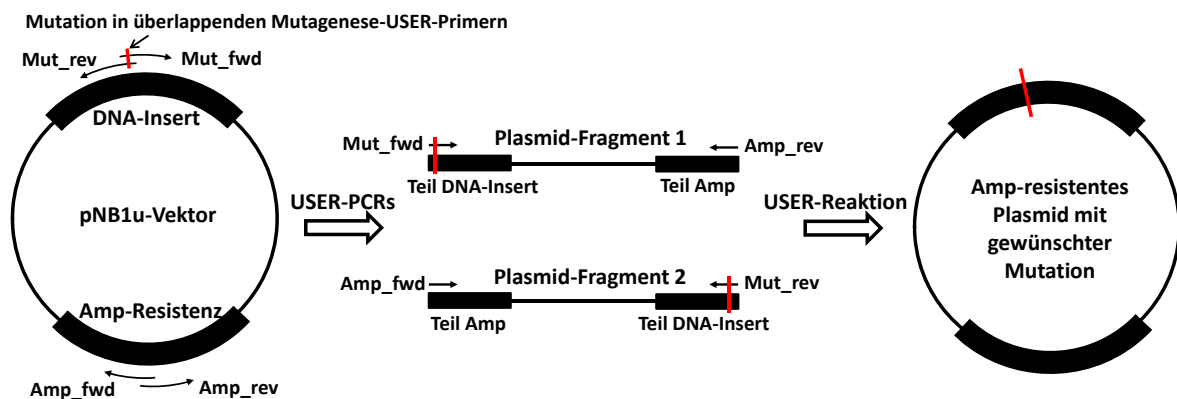
Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten USER-Vektoren, deren Nummer, Bezeichnung, Funktion und jeweilige Art der Modifikation. Die Spaltung des Fluorophors YFP (yellow-fluorescent-protein) für Interaktionsstudien mittels BiFC (engl. bimolecular fluorescence complementation)-Experimenten (Vektor #18 und #20) beruhte auf den Hälften: Aminosäuren 1 - 155 (N-terminale Hälfte) und Aminosäuren 156 - 239 (C-terminale Hälfte).

Für die eigentliche USER-Reaktion wurden 5 µl der aufgereinigten USER-PCR, 2 µl des vorverdauten linearisierten USER-Vektors, 1 µl des USER<sup>TM</sup> Enzym-Mixes in 5 µl TE-Puffer aufgenommen. Dieser Klonierungsansatz wurde dann für 20 min bei 37 °C und anschließend für 20 min bei 25 °C in einem Thermocycler mit Deckelheizung (MWG Primus 96 plus, MWG-Biotech) inkubiert. Es folgte die Transformation von chemisch kompetenten MRF' bzw. Rosetta Zellen (2.4.2.8).

### 2.4.2.7. Spezielle Klonierungsmethoden mittels USER-Technik

#### 2.4.2.7.1. Mutagenese einzelner Nukleotide

Die gezielte Mutation eines DNA-Inserts in einem pNB1u-Vektor konnte relativ schnell und zuverlässig ebenfalls mit Hilfe des USER-Systems (2.4.2.6.2) durchgeführt werden. Dazu mussten genspezifische Mutagenese-USER-Primer designt werden, die in den für die USER-Reaktion entscheidenden, mindestens acht Nukleotid-langen Überhangregionen die gewünschte Mutation aufwiesen. Kombiniert mit entsprechenden Forward- bzw. Reverse-Primern, die in der Ampicillin-Resistenz des Plasmids aufsetzten (Amp-USER-Primer), wurden so in zwei USER-PCR-Reaktionen zwei DNA- bzw. Plasmid-Fragmente amplifiziert, welche die gewünschte Mutation trugen (Abbildung 2.1). Durch die anschließende USER-Reaktion konnten beide linearen DNA-Fragmente wieder zu einem Plasmid verbunden werden. Bei erfolgreicher Mutagenese besaß das Plasmid also nicht nur die gewünschte Mutation im Insert, sondern auch wieder Ampicillin-Resistenz für die Selektionierung.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Mutagenese.**

Die Darstellung zeigt die beiden erforderlichen Schritte - USER-PCRs und USER-Reaktion - für die Mutagenese in pNB1u-Vektoren. Der Einbau der gewünschten Mutation in die Primersequenz (Mut\_fwd bzw. Mut\_rev) ermöglichte eine gezielte Mutation des Ampicillin-resistenten Plasmids. Mut = Mutagenese-USER-Primer; Amp = Ampicillin-USER-Primer; fwd = forward; rev = reverse

#### 2.4.2.7.2. SLAH3-Chimären

Um den Einfluss einzelner Proteinbereiche (N-Terminus; transmembrane Region; C-Terminus) auf die Kanalaktivität der beiden orthologen Anionenkanäle AtSLAH3 bzw. PttSLAH3 in *Xenopus laevis* Oozyten untersuchen zu können, wurden spezifische SLAH3-Chimären hergestellt.

Ähnlich der Mutagenese einzelner Nukleotide (siehe Abbildung 2.1 und 2.4.2.7.1), wurde das USER-System für eine schnelle und möglichst effektive Herstellung von SLAH3-Chimären verwendet. Entweder AtSLAH3 oder PttSLAH3, kloniert in denselben pNB1u-Vektor, dienten dabei als Ausgangsmaterial für entsprechende USER-PCRs. Mit genspezifischen und in der Ampicillin-Resistenz des Vektors aufsetzenden Amp-USER-Primern konnten SLAH3-Fragmente bzw. Plasmid-Fragmente erzeugt werden, die anschließend über eine USER-Reaktion zu entsprechenden Ampicillin-resistenten „Chimärplasmiden“ kombiniert werden konnten.

Die genspezifischen Chimären-USER-Primer wurden dabei so designt, dass die für die USER-Reaktion entscheidenden Überhänge in homologen Bereichen der beiden Kanäle lagen. Dafür wurde sowohl ein Bereich am Übergang von N-Terminus zur transmembranen Region (Nukleotidsequenz TCTCCGTT; 765-722 bp in der CDS von AtSLAH3; 561-568 bp in der CDS von PttSLAH3) als auch am Übergang von der transmembranen Region zum C-Terminus (Nukleotidsequenz CTTTGTCCT; 1692-1700 bp in der CDS von AtSLAH3; 1488-1496 bp in der CDS von PttSLAH3) ausgewählt. Bedingt durch die für die USER-Technik notwendige Komplementarität der überlappenden Primersequenzen entstanden allerdings am C-terminalen Bereich der transkribierten *Ptt*-Nukleotidsequenz Mutationen. Diese hatten jedoch keine Änderung der Proteinsequenz zur Folge und konnten deswegen vernachlässigt werden. Durch die finale Kombination entsprechender Plasmid-Fragmente von Arabidopsis- oder Pappel-N-Terminus, -C-Terminus, bzw. SLAH3-Rest mittels USER-Reaktion konnten daraufhin vier verschiedene Chimären erzeugt werden, bei denen jeweils der N- oder C-Terminus ausgetauscht war (PttNT, AtNT, PttCT und AtCT, siehe auch Abbildung 3.27). Unter Verwendung der Plasmid-DNA der beiden erzeugten N-terminalen Chimären (PttNT und AtNT, siehe auch Abbildung 3.27) als Template-DNA und entsprechender C-terminaler USER-Primersequenzen konnten anschließend auf die gleiche Weise Chimären generiert werden, bei denen als Ergebnis beide Termini ausgetauscht waren (PttNTCT, AtNTCT, siehe auch Abbildung 3.27).

#### 2.4.2.8. Transformation von *Escherichia coli* Zellen

Transformation ist die genetische Veränderung eines prokaryotischen Organismus durch die Einschleusung von artfremden Genen bzw. modifizierten Genkonstrukten. Es haben sich verschiedene Transformationstechniken etabliert, die je nach Form der vorliegenden DNA (Größe, Linearität usw.) Vor- und Nachteile aufweisen. In dieser Arbeit wurde

ausschließlich nach der „Heat-shock“ (engl. für Hitzeschock)-Methode transformiert und dabei chemisch kompetente Zellen der *E. coli* Stämme MRF' und Rosetta (2.4.1.1) verwendet. Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNA (2 µl pGEM<sup>®</sup> T-easy System, siehe 2.4.2.6.1 bzw. 13 µl USER-Methode 2.4.2.6.2) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen direkt aus dem Eis für 45 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt. Diese Hitzeschock-Phase bewirkt die Aufnahme von Nukleinsäuren in die kompetenten Zellen. Die transformierten Bakterienzellen wurden anschließend fünf Minuten auf Eis gehalten, im Folgenden auf Ampicillin-haltigen LB<sub>Amp</sub>- (MRF') bzw. LB<sub>Amp-Cam</sub>-Selektionsplatten (Rosetta) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschrank (Memmert) kultiviert.

#### 2.4.2.9. Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Diese Methode kann zur schnellen Aufreinigung plasmidärer DNA aus *E. coli* Bakterienzellen genutzt werden. Sie basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) und erfolgt in Anlehnung an ein Alkaline-Lysis-Protokoll von Zhou (1990).

Von jeweils frisch angesetzten Übernachtskulturen wurde je 1,5 ml Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec bei Raumtemperatur (RT) und 14500 Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute, rpm) zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die pelletierten Zellen wurden nach Abschütten des Überstandes im verbliebenen Medium resuspendiert und anschließend mit 300 µl TENS-Lysis-Puffer versetzt, mehrmals invertiert und bei RT für etwa 1 - 2 min lysiert, bis die Suspension klar und viskos war. Die lysierten Zellen wurden dann mittels 150 µl NaAc (3 M, pH 5,2) neutralisiert, um die in der Zelle vorhandenen Proteine, Lipide sowie die genomische DNA zu fällen und von der Plasmid-DNA zu trennen. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei RT und 14500 rpm wurde der Überstand mit 600 µl Isopropanol versetzt und durch Invertieren durchmischt, um die plasmidäre DNA zu fällen. Nach Zentrifugation (RT, 14500 rpm, 4 min) zur Sedimentierung der Plasmide und anschließendem Entfernen des Isopropanolüberstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach 2 min Zentrifugation (RT, 14500 rpm) der Ethanolüberstand entfernt. Die Plasmid-DNA wurde daraufhin vollständig bei 37 °C getrocknet und das Pellet anschließend in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Daraufhin konnte die DNA durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese (2.4.2.3) aufgetrennt, gegebenenfalls aufgereinigt (2.4.2.4) und die Konzentration quantifiziert werden (2.4.2.5).

#### 2.4.2.10. **Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA**

In einem Restriktionsverdau werden Restriktionsenzyme (aus Bakterien stammende Endonucleasen) dazu verwendet, doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen durch eine hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen aufzuschneiden. Endonucleasen finden auf DNA -entsprechend ihrer Herkunft- palindromische Erkennungssequenzen, die punktsymmetrisch im sense- und antisense Strang eine genau entgegengesetzte Basenabfolge aufweisen. Diese werden hochspezifisch erkannt und entweder innerhalb dieser Sequenz oder in unmittelbarer, definierter Umgebung geschnitten. Restriktionsenzyme können dabei je nach Typ entweder „blunt-ends“ (glatte) oder „sticky-ends“ (mit einseitigen Überhängen) Schnittstellen generieren. So können durch einen Verdau, der kompatible Enden erzeugt, z.B. verschiedene DNA-Fragmente zusammengefügt werden, wodurch neue DNA-Konstrukte entstehen (präparativer Restriktionsverdau).

Im Zuge dieser Arbeit wurde allerdings hauptsächlich ein analytischer Restriktionsverdau angewandt. Hierbei wird DNA bzw. Plasmid-DNA mit geeignetem Enzym so geschnitten, dass über die entstandenen Fragment-Längen der Erfolg einer Klonierung bzw. die Orientierung des Inserts festgestellt werden konnte. Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt und verwendet.

#### 2.4.2.11. **Sequenzierung**

Mit Hilfe eines Sequenzers kann die Nukleotidsequenz von DNA-Molekülen bestimmt und kontrolliert werden. Das Prinzip der Sequenzierung beruht darauf, dass eine Polymerase, ähnlich wie bei einer herkömmlichen PCR, Desoxyribonukleotide komplementär an das zu sequenzierende Template anfügt (Sanger et al., 1977). Statistisch gleich verteilt werden neben den üblichen dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet, welche bei ihrem Einbau den sofortigen Abbruch der Elongation zur Folge haben. Somit entstehen im Sequenzierungsansatz DNA-Fragmente aller Größen, wobei das Ende jedes Fragmentes mit einem Fluoreszenz-markierten ddNTP versehen ist. Diese Fragmente werden nun, ähnlich einer Agarose-Gel-Elektrophorese, durch eine Polymermatrix in einer dünnen Kapillare ihrer Größe nach aufgetrennt. Am Ende dieser Kapillare kann über die Reihenfolge der an der Detektionseinheit ankommenden fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente die Sequenz des Gesamtfragmentes bestimmt werden.

Ausgehend von Sequenzierprimern konnten so DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 500-700 Nukleotiden sequenziert und mit Hilfe der Software Vektor NTI<sup>®</sup> 10.3.1 (Invitrogen) analysiert werden. Die Sequenzierungen wurden entweder vom Institutseigenen Sequenzierlabor durchgeführt oder extern beim Sequenzierungsdienstleister GATC-Biotech in Auftrag gegeben.

#### 2.4.2.12. **Quantitative real time PCR**

Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. quantitative real time PCR, kurz qPCR) ist eine schnelle Methode zur Expressionsanalyse. Dabei kann mit Hilfe eines DNA-Doppelstrang-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, entsprechender cDNA als Template und genspezifischer Primer nach jeder Elongationsphase der qPCR die PCR-Produktmenge in Echtzeit verfolgt werden. Da hierbei eine lineare Abhängigkeit zur ursprünglich eingesetzten Templatmenge besteht, kann über Eichgeraden und Vergleich zu konstitutiv exprimierten Housekeeping-Genen“ das ursprüngliche mRNA Expressionslevel einzelner Transkripte in den Proben bestimmt werden (Kubista et al., 2006).

Die qPCR wurde entweder in einem Roche LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Carousel based Instrument, Roche; Software Version 3.5) oder einem Realplex Mastercycler<sup>®</sup> (ep realplex<sup>2</sup>S, Eppendorf; Software Version 2.2) durchgeführt. Unter Verwendung des ABsolute QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Capillary Mix (Thermo Scientific) wurden für einen Reaktionsansatz 10 µl ABsolute QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Capillary Mix, jeweils 0,12 µl Forward- und Reverse-Primer (50 µM), 7,76 µl HPLC-H<sub>2</sub>O und 2 µl cDNA als Matrize verwendet. Wegen Inkompatibilität der beiden verwendeten Puffersysteme wurde hierbei die als Matrize verwendete cDNA mit tRNA-H<sub>2</sub>O (10 ng / µl tRNA; Sigma-Aldrich; HPLC-H<sub>2</sub>O; Carl Roth) 20fach verdünnt eingesetzt. Die tRNA verhindert durch Anlagerung an das Reaktionsgefäß die Bindung und damit den Verlust der zu untersuchenden cDNA. Die Primer wurden so designt, dass sie möglichst eine Länge von 17 - 18 Nukleotiden hatten, eine Produktlänge von 200 - 500 bp erzeugten und ihr berechnetes Bindungs-Temperaturoptimum bei 52 - 60 °C lag. Für alle verwendeten Primer wurde vor der eigentlichen qPCR über einen Temperaturgradienten die optimale „Annealing“ Temperatur ermittelt.

Die eigentliche Durchführung der qPCR erfolgte nach einem Standardprotokoll (Tabelle 2.2). Der für eine PCR relativ lange erste 15 minütige Schritt bei 95°C diente dazu, die im ABsolute QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Capillary Mix verwendete besonders modifizierte „Hot Start“ Polymerase zu aktivieren. Die im Anschluss an die qPCR durchgeführte

Schmelzpunktanalyse erlaubt es direkt festzustellen, ob es sich beim PCR-Produkt ausschließlich um das gewünschte spezifische Fragment handelt oder ob auch sekundäre Nebenprodukte durch unspezifische Primerbindungen entstanden waren. Da bei dieser Methode alle DNA-Doppelstränge erfasst werden, würden solche Nebenprodukte ansonsten die Messergebnisse verfälschen.

qPCR-Phase		Reaktionsbedingungen
„Hot Start“		15 min bei 95 °C
Zyklische Phase (40 Wiederholungen)	Denaturierung	15 sec bei 95 °C
	Annealing	15 sec, Primer-spezifische Temperatur
	Elongation	20 sec bei 72 °C
	Detektion	10 sec bei 78 °C
Schmelzpunktanalyse		10 sec bei 95 °C daraufhin Temperaturreduktion von 95 bis 60 °C (0,3 °C/sec)

**Tabelle 2.2: Standardprotokoll qPCR**

Außerdem wurden jeweils Standards für die Eichgeraden hergestellt. Für diese Referenz-DNA-Mengen wurde das über die genspezifischen Primer amplifizierte PCR-Produkt gelelektrophoretisch überprüft, aufgereinigt und dann die Konzentration bestimmt. Standard #1 wurde als die Konzentration 10 ng /  $\mu$ l definiert. Über eine entsprechende Verdünnungsreihe konnten dann die Standards #7, #8, #9 und #10 (10 fg, 1 fg, 0,1 fg und 0,01 fg /  $\mu$ l; mit tRNA-H<sub>2</sub>O verdünnt) hergestellt werden. Mit diesen vier Standards bzw. deren jeweils in einer qPCR gemessenen Fluoreszenzen (am C<sub>T</sub>-Wert, engl. threshold cycle) wurde die jeweilige Eichgerade erzeugt. Diese ermöglichte die Ausgangsmenge jedes einzelnen Transkripts in der cDNA-Probe spezifisch zu ermitteln.

Um die Expression der Transkripte zwischen verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurden zur Berechnung der genauen Molekülzahlen die gemessenen Transkriptmengen auf Aktin 2 normiert. Aktin stellt in Pappel genau wie in Arabidopsis ein konstitutiv exprimiertes Housekeeping-Gen dar (für Details siehe An et al., 1996; Szyroki et al., 2001; Regier and Frey, 2010). Das entsprechende cDNA-Fragment wurde über die qPCR-Primer PtACT2fwd und PtACT2rev amplifiziert. Die letztendlich ermittelten Werte stellen somit die Anzahl der Moleküle pro 10.000 Moleküle Aktin dar.

#### 2.4.2.13. Identifikation von Pappel-SLAC/SLAH-Genen

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war das Genom von *Populus trichocarpa* zwar bereits bekannt, aber noch nicht vollständig annotiert. Da zusätzlich die in Arabidopsis beschriebenen SLAC/SLAH-Anionenkanäle sehr individuelle N- und C-Termini aufweisen (sowohl Länge als auch die Sequenz betreffend) war kein Ortholog der Pappel vollständig bekannt. Mit Hilfe der CDS (engl. coding sequence, für kodierende Sequenz) von Arabidopsis-SLAC1 (At1g12480) wurde deshalb im Genom von *Populus trichocarpa* („Joint Genome Institut“ Datenbank JGI, [http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=Poptr1\\_1](http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=Poptr1_1)) nach entsprechend homologen Sequenzen gesucht. Alle identifizierten orthologen *Ptr*-SLAC/SLAH-Teilsequenzen wurden daraufhin auf Ebene der abgeleiteten Proteinsequenzen und unter Zuhilfenahme der „Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW“ Anwendung (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) mit denen der SLAC/SLAH-Kanäle aus Arabidopsis verglichen. Mittels Treeview (Version 1.6.6) konnte das Ergebnis dieses Vergleichs dazu verwendet werden, die Verwandtschaftsverhältnisse aller untersuchten SLAC/SLAH-Proteine über ein Kladogramm zu verdeutlichen. Dies ermöglichte im Unterschied zu einem Phylogramm eine nicht gewichtete, einfache Zuordnung der Pappel-Sequenzen zu entsprechenden Arabidopsis-Kanälen.

#### 2.4.2.14. SMART-RACE-Technik

Die RACE-PCR (engl. rapid amplification of cDNA-ends) ist eine Methode, bei der mit Hilfe einer PCR unbekannte cDNA-Enden einer gesuchten Gen-Sequenz bis in den untranslatierten Bereich (5'-Ende) und den poly-A-Schwanz (3'-Ende) identifiziert werden können. Eine noch effektivere Methode stellt die SMART-RACE-Technik (engl. switching mechanism at 5' end of RNA transcripts) dar, bei der vor der eigentlichen RACE-PCR die Gesamt-RNA in eine direkt für die RACE-PCR verwendbare RACE-Ready-cDNA transkribiert werden kann. Dies wird durch die Verwendung spezieller Primer bei der Synthese der RACE-Ready-cDNA ermöglicht. Diese spezifischen Primer gewährleisten zum einen eine vollständige Amplifikation der gesuchten cDNA-Enden bis ans Ende der untranslatierten Bereiche, zum anderen durch eine jeweils identische Sequenz am 5'-Ende eine möglichst effektive RACE-PCR (5' und 3') mit nur einem entsprechenden Primer in Kombination mit dem jeweiligen genspezifischen Primer.

Eben jene SMART-RACE-Technik wurde zur Identifikation unbekannter cDNA-Enden des Pappel-Anionenkanals PttSLAH3 verwendet. Als Ausgangssequenz und Grundlage für



die Herstellung von genspezifischen Primern diente das über Sequenzvergleiche (2.4.2.13) identifizierte cDNA-Fragment PtSLAH2/3-1 (siehe auch 7.6). Für die Identifizierung der fehlenden cDNA-Enden wurde das SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit in Verbindung mit dem Advantage 2 PCR Kit (beides Clontech) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Gewinnung von 5'- bzw. 3'-RACE-Ready-cDNA diente isolierte Gesamt-RNA von *Ptt*-extrafloralen Nektarien. Als Primer für die jeweilige 5'- bzw. 3'-RACE-PCR wurden neben dem im Kit mitgelieferten speziellen Primer (UPM, Universal Primer A Mix), der entsprechend am 5'-Ende der RACE-Ready-cDNA aufsetzte, jeweils dazu passende genspezifische Primer (GSP1 bzw. GSP2) designiert und verwendet. Alle damit amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend über Agarose-Gel-Elektrophorese verifiziert (2.4.2.3). Stimmt die PCR-Produkte annähernd mit der über die Homologie zu AtSLAH3 (At5g24030) erwartenden Fragmentgröße (5'-RACE-PCR, etwa 1514bp bzw. 3'-RACE-PCR etwa 790bp) überein, wurde das DNA-Fragment über ein SYBR® Gold Agarose-Gel aufgetrennt (2.4.2.3.2) und aufgereinigt (2.4.2.4). Dadurch, dass durch die bei der RACE-PCR verwendete Advantage 2 Polymerase bereits Adenin-Überhänge an die PCR-Produkte generiert wurden, konnte das aufgereinigte DNA-Fragment direkt über die T/A-Klonierungs-Technik in das pGEM® T-Easy-Vektor-System (2.4.2.6.1) ligiert und abschließend sequenziert werden (2.4.2.11).

Da allerdings trotz vielversprechender RACE-PCR-Produkte weder das 5'- noch das 3'-Ende von PttSLAH3 auf diese Weise identifiziert werden konnten, wurde entsprechend Herstellerangaben auf allen primären aufgereinigten 5'- bzw. 3'-RACE-PCR-Produkten (neue Template-DNA) eine sekundäre RACE-PCR durchgeführt, um eine höhere Spezifität bzw. stärkere Amplifikation von zuvor bereits amplifizierten Fragmenten und damit eine Reduktion von Hintergrund-Signale zu erreichen. Dazu wurden wiederum im Kit enthaltene sog. „nested“ Primer (NUP, Nested Universal Primer Mix) und entsprechende „nested“ genspezifische Primer (NGSP1 bzw. NGSP2, Nested GSP) verwendet. Die sekundären RACE-PCR-Produkte wurden daraufhin erneut auf eine positive Fragmentgröße hin untersucht (5'-RACE-PCR, etwa 1445bp bzw. 3'-RACE-PCR etwa 650bp) und gegebenenfalls wie primäre RACE-PCR-Produkte abschließend sequenziert.

### **2.4.3. RNA Techniken**

Alle Arbeiten mit Beteiligung von RNA wurden in sterilen Gefäßen und Gerätschaften, RNase-freien Chemikalien und Lösungen sowie wenn möglich auf Eis durchgeführt.

#### 2.4.3.1. RNA-Isolation aus Pflanzengewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde aus zwei verschiedenen Pappelgeweben Gesamt-RNA isoliert, aus Blatt und extrafloralen Nektarien. Die RNAs bzw. cDNAs von *Ptt*-Blüten, -Knospen und -Schließzellen für die Expressionsanalyse von *PttSLAH3* über qPCR waren bereits aus früheren Experimenten vorhanden.

Für die Isolation von Blatt-Gesamt-RNA wurde das E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plant RNA Kit (Omega) nach Herstellerangaben und unter Modifikation des Homogenisationspuffers (RB) verwendet. Dieser wurde zur Denaturierung von Ribonukleasen mit 1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und zur Minimierung von in Pappelgeweben häufig vorkommenden und bei der Isolation von RNA störenden Phenolverbindungen bzw. Cellulaseverbindungen mit 10 % (v/v) PVP (10 prozentig in DEPC-H<sub>2</sub>O) und 10 % (v/v) K<sup>+</sup>-Ethylxanthogenat (0,0561 g / 5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O) versetzt.

Für die eigentliche Extraktion wurde ungefähr 50 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial eingesetzt. Dafür wurde Blattgewebe ohne extraflorale Nektarien unter flüssigem Stickstoff gemörsert und zusätzlich mit zwei Keramikkügelchen (Precellys<sup>®</sup> Keramik-Kit 1.4 mm, PEQLAB) in einer mit Stickstoff gekühlten Schwingmühle (MM300, Retsch) für 1 min bei 30 Hz weiter zerkleinert. In modifiziertem RB-Puffer aufgenommen konnte dann das homogenisierte Material für die RNA-Extraktion verwendet werden. Die Gesamt-RNA wurde zum Schluss mit 30  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

Aufgrund der wesentlich kleineren Menge an Ausgangsmaterial wurde zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus EFN das RNeasy MicroKit (Qiagen) verwendet. Hier wurde wiederum, bis auf kleine Veränderungen, nach Angaben des Herstellers verfahren. Erneut wurden dem Homogenisationspuffer (RLT) die gleichen Zusätze von  $\beta$ -Mercaptoethanol, PVP und K<sup>+</sup>- Ethylxanthogenat zugefügt. Außerdem wurde ohne „carrier RNA gearbeitet und der komplette DNaseI-Verdau ausgelassen, so dass nach dem Waschen mit RW1 direkt mit dem RPE Waschschrift fortgefahen wurde. Für jede Probe wurden 70 extraflorale Nektarien verwendet, die ebenfalls unter flüssiger Stickstoffkühlung mit zwei Keramikkügelchen in einer Schwingmühle allerdings zweimal für 1 min bei 30 Hz zerkleinert wurden. Homogenisiert in modifiziertem RLT-Puffer wurde die RNA zum Ende der Extraktion in 14  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Nach beiden Extraktionsmethoden wurde anschließend die RNA-Konzentration bestimmt (2.4.2.5) und mit Hilfe des Experion<sup>™</sup> Automated Electrophoresis System (Bio-Rad; Software Version 3.0) und dem dazugehörigen Experion<sup>™</sup> RNA HighSense Analysis Kit

(Bio-Rad) zusätzlich die Qualität der RNA nach Herstellerangaben analysiert. Kurzfristig wurde isolierte RNA bei -20 °C, für längere Zeit bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.3.2. **Reverse Transkription**

Aus Retroviren stammende Enzyme, sog. reverse Transkriptasen sind in der Lage, RNA wieder in DNA umzuschreiben. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um *in vitro* aus isolierter RNA cDNA für Expressionsanalysen zu generieren. Dazu muss vor Beginn der eigentlichen reversen Transkription die isolierte RNA von genomischer DNA befreit werden, da ansonsten Expressionsanalysen durch eigentlich nicht transkribierte DNA verfälscht werden könnten.

Für einen solchen DNase-Verdau wurde pro Ansatz 3 µg RNA, eine Unit einer RNase-freien DNase I mit entsprechendem Puffer und für einen zusätzlichen Schutz vor Degradation 1 Unit / µl Reaktionsvolumen Ribolock™ RNase-Inhibitor (alles Fermentas) verwendet. Nach 30 Minuten bei 37 °C konnte die RNA gefällt werden. Dazu wurde das Reaktionsvolumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und 10 µl NH<sub>4</sub>Ac (5 M in 100 mM EDTA), 75 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen (RNA grade, 20 mg / ml; Fermentas) beigefügt. Nach 30 min bei 4 °C und 20.000 g wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und die RNA nach weiteren 20 min Zentrifugation (4 °C, 20.000 g) getrocknet und erneut in 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die letztendliche Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe einer M-MLV reversen Transkriptase (Promega). Dazu wurden 6,7 µl der von genomischer DNA befreiten RNA mit 2 µl des 5fach Puffers, 0,5 µl dNTPs (10 mM) und 0,4 µl oligo-dT-Primer (100 µM) für 2 min bei 70 °C denaturiert. Danach wurden 0,4 µl (= 80 Units) des Enzyms zugefügt und die Transkription für 60 min bei 42 °C katalysiert. Die cDNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.4.3.3. ***In vitro* Transkription**

Bei der *in vitro* Transkription (IVT) wird DNA in RNA umgewandelt. Wie bei der Transkription *in vivo* werden dabei Ribonukleotide von RNA-Polymerasen komplementär zum codogenen Strang der DNA aufgebaut. Dadurch entsteht eine einzelsträngige cRNA, die für ihre Translation nur noch in ein geeignetes Expressionssystem gebracht werden muss.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die über IVT gewonnen cRNA ausschließlich in *Xenopus laevis* Oozyten (2.6.1) exprimiert. Das zu exprimierende Gen wurde deshalb mit Hilfe des

USER-Systems (2.4.2.6.2) in pNB1u-Oozyten-Vektoren (#16, #18, #20, #22, siehe Tabelle 2.1) kloniert. Diese Vektoren besitzen alle 5' vom zu transkribierenden Bereich eine T7-Promotor Bindestelle, an der die Transkription gestartet wurde. Außerdem konnten alle in dieser Arbeit erzeugten Plasmidkonstrukte durch das Restriktionsenzym XhoI (Fermentas) einmalig am Anfang des 3'-UTR- (untranslatierte Region) Bereichs linearisiert werden. Dadurch war gewährleistet, dass eine unnötige Transkription des restlichen Vektors minimal und so eine möglichst hohe Ausbeute an cRNA garantiert war. Der Erfolg der Linearisierung wurde über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (2.4.2.3), bevor die vollständig linearisierte DNA aufgereinigt wurde (2.4.2.4).

Für die eigentliche IVT wurden mindestens 500 ng der so linearisierten DNA als Template eingesetzt, welche zusammen mit den Komponenten aus Tabelle 2.3, respektive Tabelle 2.4 den Reaktionsansatz für eine *in vitro* Transkription bildeten. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion nach Zugabe von 0,5 µl GTP (100 mM) richtig gestartet und für weitere 3 h bei 37 °C fortgesetzt wurde. Um anschließend die RNA zu fällen, wurde der Ansatz mit 100 µl LiCl (7,5 M mit 50 mM EDTA) versetzt und für mindestens 1 h, besser über Nacht, bei -20 °C aufbewahrt. Nach Zentrifugation für mindestens 60 min bei 14.000 rpm und 0 °C (Eppendorf Zentrifuge 5417R) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol versetzt und nochmals für 15 min bei 14.000 rpm und 0 °C zentrifugiert.

#### Reaktionsansatz IVT

linearisierte DNA	8 µl (≥ 500 ng)
Mastermix A	37 µl
PPase	0,1 µl (0,01 Units)
RiboLock™ RNase Inhibitor	0,5 µl (20 Units)
Cap (10 mM)	0,3 µl
T7 RNA Polymerase	4 µl (20 Units)

**Tabelle 2.3: Reaktionsansatz IVT**

Alle Komponenten bis auf Cap (New England BioLabs) wurden über Fermentas bezogen.

**Mastermix A**

T7 Transkriptions Puffer (5fach)	500 $\mu$ l
ATP (100 mM)	25 $\mu$ l
UTP (100 mM)	25 $\mu$ l
CTP (100 mM)	25 $\mu$ l
GTP (100 mM)	1,25 $\mu$ l
DTT (0,1 M)	250 $\mu$ l
BSA (1,25 mg / ml)	25 $\mu$ l
BPC H <sub>2</sub> O	925 $\mu$ l

**Tabelle 2.4: Mastermix A für IVT**

Alle Komponenten bis auf BPC-H<sub>2</sub>O (AppliChem BioChemica) wurden über Fermentas bezogen.

Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für 15 min bei 37 °C vollständig getrocknet und die RNA anschließend in 20  $\mu$ l BPC-Wasser (Wasser für die Molekularbiologie, AppliChem) aufgenommen. Die Integrität der RNA wurde, um etwaige Degradationserscheinungen durch RNase-Kontamination ausschließen zu können, über eine RNA-Agarose-Gel-Elektrophorese (2.4.3.4) überprüft. Abschließend wurde die cRNA Konzentration bestimmt (2.4.2.5), diese für eine spätere Mikroinjektion in Oozyten (2.6.2) auf 0,5  $\mu$ g /  $\mu$ l eingestellt und bis auf weiteres bei -20 °C gelagert.

**2.4.3.4. RNA Agarose-Gel-Elektrophorese**

Wie bei einer DNA- werden auch bei einer RNA-Agarose-Gel-Elektrophorese Nukleinsäuren entsprechend ihrer Länge im Gel aufgetrennt.

Hierzu wurde 1  $\mu$ l RNA-Probe mit 3  $\mu$ l eines RNA-Probenpuffers (4fach) versetzt. Dieser Ansatz wurde, um mögliche Sekundärstrukturen zu lösen, für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt und anschließend für zwei Minuten auf Eis gestellt. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde ein Gemisch aus 1 % Agarose und Laufpuffer (MEN-Puffer und ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1 zu 10) nach kurzem Aufkochen und nachfolgendem Abkühlen auf ca. 60 °C mit Formaldehyd (37 %) im Verhältnis 1 zu 5 und mit Fluoreszenzfarbstoff GelGreen<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain (Biotium) im Verhältnis 1 zu 20.000 versetzt. In solch einem Formaldehyd-Agarose-Gel konnten die vorbehandelten RNA-Proben bei einer angelegten Spannung von 80 V aufgetrennt und unter dem Intas UV Imager (Intas) kontrolliert werden.

## 2.5. Biochemische Methoden

Einige der in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Methoden wurden bereits der Diplomarbeit des Autors (Untersuchungen an extrafloralen Nektarien der Pappel, 2008) ausführlich beschrieben und wurden deshalb übernommen bzw. entsprechend modifiziert.

### 2.5.1. Allgemeine Standard-Protein-Methoden

#### 2.5.1.1. Das Glutathion-STransferase (GST)-Expressionssystem

Bei einem GST-Expressionssystem handelt es sich um eine einfache Methode zur Expression und Aufreinigung von Proteinen in *E. coli* Zellen (Harper and Speicher, 2008). Das System beruht dabei auf der Verwendung von spezifischen sog. pGEX-Vektoren, die grundsätzlich eine Fusion des Zielproteins mit einer 26 kDa großen GST-Domäne und damit eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und Glutathion Sepharose ermöglichen. Zusätzlich besitzen diese Vektoren einen durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren Laktose (engl. lactose, lac)-Promotor. Dabei inaktiviert IPTG den lac-Repressor und induziert somit die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase. Dadurch wird die Expression des klonierten Gens ermöglicht, welches ebenfalls unter der Kontrolle des lac-Operons steht. Durch diese Methode lassen sich pro Liter Bakterienkultur zwischen 1 - 10 mg Protein aufreinigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der pGEX-6P-1-USER-Vektor (Tabelle 2.1) verwendet, um Proteine in Bakterienzellen zu exprimieren. Dieser Vektor vereint die Vorteile des USER-Systems (2.4.2.6.2) mit den Eigenschaften der pGEX-Vektoren und besitzt upstream der USER-Kassette den GST-kodierenden Bereich, downstream des Inserts eine kodierende Sequenz für zehn Histidine. Über diesen Vektor hergestellte Fusionsproteine besaßen demnach nicht nur N-terminal eine GST-Domäne für eine Aufreinigung über Glutathion Sepharose (2.5.1.3), sondern auch C-terminal ein Polyhistidin, welches über einen His-Antikörper detektiert werden konnte (2.5.2.3.1).

#### 2.5.1.2. Aufschließen von Bakterienzellen

Bakterienzellen, die sich in einer Lösung befinden, können durch die Erzeugung von Ultraschallimpulsen zum Platzen gebracht werden. In dieser Arbeit wurden induzierte Rosetta Zellen, welche für die Aufreinigung des PttSLAH3NT (siehe auch 2.5.2.2) über

das GST-Expressionssystem verwendet wurden, über diese Methode aufgeschlossen. Alle Schritte wurden dabei möglichst unter Kühlung im Eisbad durchgeführt.

Entsprechende Zellen wurden für 20 min bei 4 °C und 6.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet nach der Entfernung des Überstandes in PBS-Puffer (20 ml pro Liter verwendetes Expressionsmedium; plus Proteinaseinhibitor EGTA frei, Roche) resuspendiert. Zum eigentlichen Aufschluss der Zellen wurde mittels Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus HD3200, Bandelin) ein 30 sec andauernder Ultraschallimpuls (150 W, 20 kHz) in die Probenlösung gegeben. Über den Zeitraum von fünf Minuten wurde dieser Ultraschallimpuls in zyklischen Intervallen wiederholt und dabei, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden, durch 30 sec lange Pausen unterbrochen. Durch Abzentrifugation (1 h, 4 °C und 12.000 g, Eppendorf Zentrifuge, 5810R) der wasserunlöslichen Fraktion konnte das exprimierte wasserlösliche Fusionsprotein für eine spätere Aufreinigung (2.5.1.3) im Überstand isoliert werden.

#### **2.5.1.3. Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung von GST-markierten Fusionsproteinen wird dadurch ermöglicht, dass GST spezifisch an immobilisierter Glutathion Sepharose bindet und über reduziertes Glutathion wieder eluiert werden kann.

Für die Aufreinigung eines solchen Fusionsproteins wurde 1 ml (pro 2 l Ausgangsexpressionsmedium) Glutathion Sepharose™ (GE Healthcare) als stationäre Phase in einer Chromatographie-Säule (Glass Econo-Column, Bio-Rad) verwendet. Nach Equilibrierung des Säulenmaterials mit 15 ml GST-Equilibrierungspuffer konnte das aufgeschlossene Bakterienlysate langsam über die Säule gegeben werden. Nach einem Waschschrift (30 ml GST-Waschpuffer) wurde daraufhin das Fusionsprotein mit dreimal 2 ml GST-Elutionspuffer eluiert und entsprechende Proben gegen 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,4 über Nacht bei 4 °C dialysiert. Über eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2.5.1.4) konnte dann der Erfolg der Aufreinigung kontrolliert werden.

#### **2.5.1.4. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über ein diskontinuierliches SDS- (engl. sodium dodecyl sulfate) Gel nach Laemmli (1970). Da Proteine aufgrund ihrer unterschiedlich geladenen Aminosäurereste in einem elektrischen Feld in verschiedene Richtungen wandern würden, die Auftrennung aber über die unterschiedliche Größe der Proteine

erfolgen soll, müssen Proben entsprechend vorbehandelt werden. SDS fügt Proteinen so viele negative Ladungen zu, dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird.

Dazu wurde die Proteinprobe mit 6xSDS-Probenpuffer versetzt. Dieser Puffer enthielt DTT (Dithiothreitol), was zusätzlich zu einer 5-minütigen Erhitzung der Proben auf 87 °C dafür sorgte, dass die Proteine denaturiert, das heißt entfaltet und spezifisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten. Für die eigentliche Auftrennung wurde ein 8 - 16 % Precise™-Protein-Gradienten-Gel (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Eine „Page Ruler Plus Prestained“-Proteinleiter (Fermentas) diente als Größenmarker. Nach Beladung des Gels wurden die Proteinlösungen für 15 min bei 50 V in den Geltaschen konzentriert und dann für 60 min bei 100 V aufgetrennt.

#### 2.5.1.5. **Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen**

Um Proteine in Polyacrylamid-Gelen sichtbar zu machen, können sie mit Coomassie gefärbt werden. Die Färbelösung enthält den Farbstoff Brilliant Blue R250, der unspezifisch an Proteine bindet.

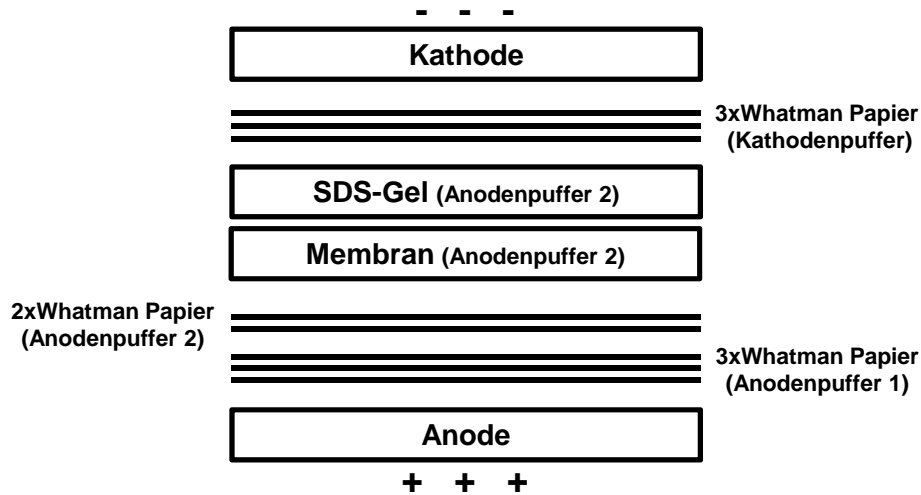
Hierfür wurde das zuvor für 10 min in dH<sub>2</sub>O geschwenkte Gel für 20 - 30 min unter leichtem Schwenken und RT in einer Coomassie-Lösung inkubiert. Danach wurde das Gel in frisches dH<sub>2</sub>O gegeben und zur schnelleren Entfärbung und Entfernung des überschüssigen Farbstoffs in einer Mikrowelle für 5 - 10 min erhitzt. Nach erneutem Schwenken in frischem dH<sub>2</sub>O waren nur über den Farbstoff markierte Proteine auf dem Gel sichtbar und konnten mit Hilfe einer einfachen Lichtquelle ohne UV Licht über den Intas UV Imager (Intas) dokumentiert werden.

#### 2.5.1.6. **Proteintransfer (Western-Blot)**

Für den Transfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde ein auf Kyhse-Andersen (1984) basierendes Drei-Puffer System verwendet. Dabei werden die zuvor aufgetrennten und negativ geladenen Proteine in einem „Semi-Dry“-Verfahren, also ohne ein vollständig mit Transferpuffer gefülltes Tanksystem nur mit Hilfe der in Puffer getränkten, als Ionenquelle dienenden Filterpapier-Schichten (Whatman™ filter paper, GE Healthcare Europe) elektrophoretisch transferiert.



Dazu wurde ein Semi-Dry Elektrobloetter (PEQLAB) verwendet und der Proteintransfer durch folgenden horizontalen Aufbau ermöglicht (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau Semi-Dry-Western-Blot.**

Um den Transfer der Proteine gewährleisten zu können, mussten SDS-Gel, Membran und die jeweiligen Whatman-Filterpapiere für 10 min in entsprechende Puffer (siehe Abbildung 2.2) eingelegt werden und daraufhin unter Vermeidung von Luftblasen in der Blotting-Apparatur geschichtet werden. Die verwendete PVDF-Membran (PVDF Transfer Membrane, Thermo Scientific) musste zusätzlich vor der Inkubation in Anodenpuffer 2 für 30 sec in 100 % Methanol aktiviert werden. Für den eigentlichen Proteintransfer wurde dann eine Stunde lang eine Spannung von 20 V angelegt.

## 2.5.2. PttSLAH3-spezifische Proteinarbeiten

### 2.5.2.1. PttSLAH3-Antikörpersynthese

Für die immunhistologische Lokalisierung des Anionenkanals PttSLAH3 in *Ptt* extrafloralen Nektarien (siehe auch 2.3.6) musste ein spezifischer Antikörper hergestellt werden. Mit Unterstützung der Firma ImmunoGlobe sowie aufgrund der Tatsache, dass die N-Termini der SLAC/SLAH-Familie im Zytosol vorliegen und untereinander die geringste Homologie aufweisen, wurden die ersten 17 Aminosäuren des Proteins (MGSDTAAFENQTDESQP, PttSLAH3-CDS siehe 7.6) ausgewählt, um einen polyklonalen Antikörper in Kaninchen herzustellen.

### 2.5.2.2. Protein-Expression

Für die Überprüfung der Spezifität des PttSLAH3-Antikörpers wurde das Antigen rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Dafür wurde der N-Terminus des PttSLAH3-Proteins (NT, AA 1 - 187) mit Hilfe des USER-Systems (siehe 2.4.2.6.2; USER-Primer PttSLAH3user\_fwd und PttSLAH3NTuser\_rev\_oS) in den pGEX-6P1-USER-Expressionsvektor (Tabelle 2.1) ligiert und damit MRF' Zellen transformiert. Nach Überprüfung durch Sequenzierung mit den Primern pGEXfdw bzw. pGEX-6P1-seq-rev wurde das Plasmid für die eigentliche Proteinexpression in Rosetta Zellen transformiert. 5 ml einer frischen Übernachtskultur wurden für eine sog. Vorkultur in 100 ml LB<sub>Amp-Cam</sub>-Medium überführt und für 12 - 18 h bei 37 °C in einem Schikanekolben geschüttelt (NewBrunswick Shaker Incubator, G25, NewBrunswick scientific). Jeweils 50 ml dieser Vorkultur wurden daraufhin auf zwei 2,5 l fassende Schikanekolben mit jeweils einem Liter frischem Medium verteilt und bei 37 °C für zwei bis drei Stunden solange inkubiert (Innova 4230 refrigerator inkubator shaker, New Brunswick scientific), bis für eine optimale Proteinexpression eine optische Dichte von  $5 - 7 \times 10^8$  Zellen / ml erreicht wurde. Eine Veränderung der bei 600 nm gemessenen (Photospektrometer, Gene Quant Pro, Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe) optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,1 entsprach einer Erhöhung der Zelldichte um  $10^8$  Zellen / ml. Deshalb wurde beim Erreichen einer netto OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 die Expression des Zielproteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 0,4 mM) induziert und das Fusionsprotein für 18 h bei 18 °C unter Schütteln und bei 130 U / min (Innova 4230 refrigerator inkubator shaker, New Brunswick scientific) exprimiert. Danach konnten die Zellen aufgeschlossen und das Fusionsprotein extrahiert werden. Eine Kontrolle der Expression bzw. Aufreinigung erfolgte über SDS-Page (2.5.1.4) und Coomassie-Färbung (2.5.1.5).

Auf ähnliche Weise und unter Verwendung des gleichen Systems (pGEX-6P1-USER-Vektor, Rosetta Zellen) wurden die in dieser Arbeit verwendeten und von der AG Prof. Dr. Dietmar Geiger (J-v-S-Institut) bereitgestellten Arabidopsis N-Termini von AtSLAH3 (AA 1 - 256) und AtSLAC1 (AA 1 - 186) exprimiert und aufgereinigt.

Die aufgereinigten Fusionsproteine aus entsprechenden N-Termini hatten mit GST- und His-Domäne eine Größe von ca. 51,9 kDa (PttSLAH3NT), ca. 60,5kDa (AtSLAH3NT) und ca. 52,3 kDa (AtSLAC1NT).

### 2.5.2.3. **Proteindetektion**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Antikörper, ein His- und ein PttSLAH3-spezifischer Antikörper verwendet, um Proteine auf PVDF-Membranen zu markieren. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen basiert dabei auf der Eigenschaft der an den entsprechenden Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase; HRP). Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid, was in Verbindung mit Luminol eine Chemilumineszenz-Reaktion zur Folge hat. Diese kann mit Hilfe eines Röntgenfilms dokumentiert werden.

Für die Proteindetektion wurde deshalb in beiden Fällen das HRP-Substrat-Kit (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Thermo Scientific) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Als Röntgenfilm wurde Super RX Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm) eingesetzt, der nach 1 - 15 Minuten Belichtungszeit nach Herstellerangaben entwickelt wurde.

#### 2.5.2.3.1. His-Antikörper-Markierung

Alle drei verwendeten, rekombinant exprimierten Proteine (PttSLAH3NT, AtSLAH3NT und AtSLAC1NT) besaßen an ihrem C-terminalen Ende ein Polyhistidin. Deshalb wurde zur einfachen Überprüfung des Proteintransfers bzw. als Kontrollmarkierung der Proteine eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe eines His-spezifischen Antikörpers („Penta His HRP Conjugate“ Kit, 5Prime) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.5.2.3.2. PttSLAH3-spezifische-Antikörper-Markierung

Für die PttSLAH3-spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mussten nach dem Proteintransfer (2.5.1.6) alle Stellen der PVDF-Membran, an die kein Protein vom Trenngel transferiert wurde, mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein gesättigt bzw. blockiert werden. Durch die einstündige Inkubation in Magermilch-Blockpuffer wurde so eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran verhindert. Dieser und alle folgenden Inkubations- bzw. Waschschrte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler (Heidolph Polymax 1040, Heidolph) durchgeführt. Nach erfolgter Sättigung wurde die Membran dreimal mit 5 ml PBS-T (jeweils 5 min) gewaschen, bevor sie für 1 h (RT oder über Nacht bei 4 °C) mit dem primären PttSLAH3-spezifischen Antikörper (1 µg / ml in PBS-T, siehe auch 2.5.2.1) inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligen Waschen (5 ml PBS-T, jeweils 5 min) wurde die Membran mit sekundärem, HRP-gekoppeltem Antikörper (ImmunoPure® Antibody

Goat Anti-rabbit HRP, Pierce, Thermo Scientific; verdünnt 1 zu 30.000 in PBS-T) für eine Stunde inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde erneut mit drei Waschschrritten (jeweils 5 min; PBS-T) entfernt, bevor die eigentliche Proteindetektion erfolgen konnte.

## **2.6. Methoden für elektrophysiologische Charakterisierungen**

Aufgrund des angestrebten Vergleichs des hier untersuchten PttSLAH3 mit dem orthologen Kanal aus Arabidopsis (AtSLAH3) wurden einige der Methoden zur elektrophysiologischen Charakterisierung von AtSLAH3 übernommen. Abschnitte des folgenden Methodenteils sind deshalb größtenteils an die Methoden zur Charakterisierung des Arabidopsis-Kanals (Maierhofer, 2012) angelehnt und gegebenenfalls modifiziert worden.

### **2.6.1. Das eukaryotische Expressionssystem von *Xenopus laevis* Oozyten**

Zur Expression und Charakterisierung des Anionenkanals PttSLAH3 wurden unbefruchtete Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Bereits in den frühen 1970er Jahren wurde gezeigt, dass sich diese Eizellen sehr gut als heterologes Expressionssystem eignen (Gurdon et al., 1971), ein Jahrzehnt später gelangen erste funktionelle Expressionen von Ionenkanälen (Gundersen et al., 1983). Heutzutage findet das System breite Anwendung in vielen Bereichen wissenschaftlicher Forschung und gilt als Standardmethode für die elektrophysiologische Charakterisierung von Transportproteinen.

### **2.6.2. cRNA Mikroinjektion**

Für die heterologe Expression der Transportproteine bzw. koexprimierten Kinasen mussten entsprechende cDNA-Sequenzen in geeignete USER-Vektoren gebracht und *in vitro* transkribiert werden. Die resultierende cRNA wurde dann mit Hilfe eines Nanoject-II-Auto-Nanoliter-Injektors (Drumond Scientific) in *Xenopus* Oozyten (bereitgestellt von AG Dietmar Geiger, J-v-S-Institut, Universität Würzburg) injiziert. Hierfür wurden Glaskapillaren (Drumond #3-00-203-G/X, Drumond Scientific) so verjüngt (Kapillarzyher, Narishige Scientific) und unter einem Mikroskop gebrochen, dass eine möglichst scharfe, schräge, ca. 2 µm große Öffnung entstand. Dies ermöglichte bei der

Injektion in Oozyten einen minimal invasiven Eingriff. Die entsprechende cRNA-Lösung (Tabelle 2.5) konnte daraufhin jeweils in das Zytoplasma der Oozyte injiziert werden. Danach wurden die Oozyten in ND-96-Lösung überführt und für die Expression der Proteine bei 18 °C für mindestens 48 Stunden im Temperaturschrank (Vinothek, Liebherr) inkubiert.

Studie	cRNA	Vektor	Konzentration
Kinastudien	PttSLAH3	#18	250 ng / µl
	entsprechende Kinase ( <i>At/Ptt</i> )	#20	250 ng / µl
Chimärenstudien	PttSLAH3/AtSLAH3/Chimäre	#18	250 ng / µl
	AtCPK21d	#20	250 ng / µl
Mutationsstudien	T119A/T119D	#16	500 ng / µl
andere	PttSLAH3	#16/#20	500 ng / µl

**Tabelle 2.5: Injizierte cRNA-Lösungen.**

Pro Oozyte wurden 50,6 nl der jeweiligen cRNA-Lösung bzw. der Kombination aus zwei cRNA-Lösungen injiziert. Außerdem angegeben ist der für die USER-Klonierung verwendete Plasmid-Vektor, der die flankierenden Sequenzen definierte und somit als Grundlage für die *in vitro* Transkription diente. Vektoren nach Tabelle 2.1.

### 2.6.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Zur Protein-Lokalisation im Allgemeinen und im Speziellen zur Bestätigung einer erfolgreichen Expression von Membranproteinen in *Xenopus laevis* Oozyten kann das gelb fluoreszierende Protein YFP (engl. yellow fluorescent protein) verwendet werden. YFP ist eine Mutationsvariante des grünfluoreszierenden Proteins aus Aequorin (Wachter et al., 1998; Shimomura, 2005). Es fluoresziert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 514 nm bei einem Emissionspeak von 527 nm.

Mit Hilfe des USER-Systems und dem USER-Vektor #22 (Tabelle 2.1) konnte relativ einfach ein Fusionsprotein hergestellt werden, bei dem der Fluorophor C-terminal an das Zielprotein fusioniert war. Bei so hergestellten und korrekt exprimierten Proteinen konnte daraufhin, mit Hilfe eines konfokalen Laserrastermikroskops (engl. laser scanning microscope, LSM, LSM 5 Pascal Axioskop 2 MOTplus, Zeiss) und eines 25 mW Argon-Lasers, der Fluorophor angeregt, gleichzeitig einzelne Ebenen der Oozyten fokussiert und die Fluoreszenz detektiert werden. Alle Fluoreszenz-Aufnahmen entstanden durch Verwendung eines Plan-Neofluar 10x/0,5 Objektivs (Zeiss).

Für Protein-Interaktionsstudien wurde eine spezielle Technik der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die „Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations“ Methode (BiFC, engl. bimolecular fluorescence complementation) stellt ein Verfahren dar, das es ermöglicht, die

Interaktion von Proteinen über die Zusammenführung zweier Fluorophor-Hälften nachzuweisen (Walter et al., 2004; Bhat et al., 2006). Ein Fluorophor, hier YFP, wird dazu in zwei Peptide gespalten, die alleine keine fluoreszierende Eigenschaft mehr besitzen. Eine räumliche Annäherung beider Fluorophor-Hälften resultiert jedoch in einer Komplementation des Fluorophors und damit der fluoreszierenden Eigenschaft.

Jeweils eine Hälfte des YFPs (Aminosäuren 1 - 155, N-terminale Hälfte; Aminosäuren 156 - 239, C-terminale Hälfte) wurde dazu an jeweils einen Partner der vermuteten Proteininteraktion fusioniert. Für Kanal-Kinase-Interaktionsstudien wurde deshalb erneut die USER-Technik verwendet wobei die C-Terminale Hälfte des YFPs an das entsprechende Kanalprotein (USER-Vektor #18, auch Tabelle 2.1) und die N-Terminale Hälfte des YFPs an die entsprechende Kinase (USER-Vektor #20, siehe auch Tabelle 2.1) kloniert wurde. Bei einer eintretenden Interaktion beider Proteine konnte daraufhin die entsprechende Fluoreszenz-Wiederherstellung des YFPs mit Hilfe der bereits beschriebenen LSM-Technik detektiert werden.

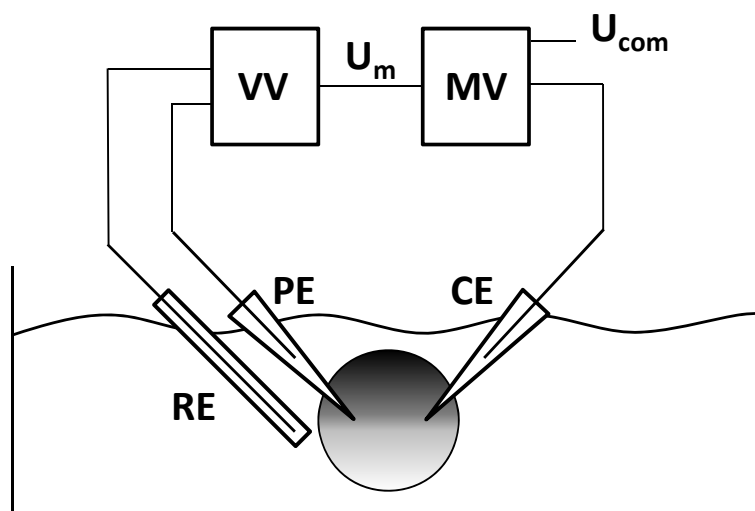
#### **2.6.4. Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik**

Zur Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften des PttSLAH3-Proteins in *Xenopus laevis* Oozyten diente die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (engl. Double Electrode Voltage Clamp, DEVC). Mit dieser Methode können elektrische Ströme, die über die gesamte Plasmamembran einer Zelle fließen, bei konstant gehaltener Membranspannung gemessen werden (Finkel and Gage, 1985).

##### **2.6.4.1. Messprinzip und Messaufbau**

Das Prinzip der DEVC Methode beruht darauf, dass durch eine konstant gehaltene Membranspannung alle über die Plasmamembran der Oozyte fließenden Ströme abgeleitet werden können. Dafür werden grundsätzlich drei verschiedene Elektroden benötigt. Dabei handelt es sich um zwei in die Oozyte einzustechende Elektroden, die Spannungselektrode (oder auch Potentialelektrode, PE) und die Stromelektrode (engl. current electrode, CE) sowie eine sich in der Badlösung möglichst nahe der Oozyte befindliche Bad- bzw. Referenzelektrode (RE). Für die Kontrolle des Membranpotentials misst ein Vorverstärker (VV) über die Potentialdifferenz zwischen PE und RE die zum Messzeitpunkt tatsächlich vorhandene Membranspannung ( $U_m$ ). Ein Messverstärker (MV) vergleicht  $U_m$  mit einer vorgegebenen Sollspannung ( $U_{com}$ ), die über eine Software (siehe unten) beliebig

kontrolliert werden kann. Über die CE wird dann durch Stromapplikation automatisch so viel Ladung in die Oozyte transportiert, dass  $U_m$  der gewünschten  $U_{com}$  entspricht (Abbildung 2.3). Bei einer so kontrollierten Membranspannung entspricht jede weitere, aufgrund veränderter Variablen auftretende gemessene Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Membran einem elektrogenen Ionentransport durch Membranproteine. Der um  $U_{com}$  halten zu könnende, über die CE zusätzlich applizierte Strom kommt deshalb proportional dem Netto-Ionenstrom gleich, der über entsprechende Transportproteine bzw. die gesamte Oozytenmembran fließt.



**Abbildung 2.3: DEVC-Messprinzip/Messaufbau.**

Die schematische Darstellung des Messaufbaus veranschaulicht alle Komponenten die nötig sind, um die Membranspannung zu kontrollieren bzw. dadurch ein Ableiten des Netto-Ionenstroms von Membrantransportproteinen zu ermöglichen. Der Vorverstärker verbunden mit Potential (PE)- und Referenzelektrode (RE) ermittelt die zum Messzeitpunkt tatsächlich vorhandene Membranspannung ( $U_m$ ). Der Messverstärker (MV) wiederum vergleicht  $U_m$  mit der vorgegebenen Sollspannung ( $U_{com}$ ) und appliziert über die Stromelektrode (CE) so viele Ladungen in die Oozyte, dass  $U_m$  konstant ist und der gewünschten  $U_{com}$  entspricht. Jede zusätzlich gemessene Membranpotentialänderung gleicht somit dem Netto-Ionentransport über entsprechende Membranproteine.

Der eigentliche Messplatz war, um möglichst alle Störungen mechanischer und elektronischer Art zu vermeiden, auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem faradayschen Käfig aufgebaut. Unter einer Stereolupe (SZ40, Olympus), beleuchtet von einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott), befand sich die Messkammer. Dort konnte mittels zweier Mikromanipulatoren (Mikromanipulator, Marzhauser MM33, Drumond Scientific), an denen jeweils die PE bzw. CE befestigt waren, in die fixierte Oozyte eingestochen werden. Gleichzeitig konnte die angestochene Zelle in der Messkammer über ein Perfusionssystem mit entsprechender Bad- bzw. Messlösung (7.4.5)

umspült werden. Über den Vorverstärker (VV) waren RE und PE mit dem eigentlichen Messverstärker (MV) verbunden, der über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech) mit dem Messrechner (IBM PC, Maxdata) kommunizieren konnte (siehe auch Abbildung 2.3). Über die Software (PatchMaster, HEKA-Elektronik) konnten zum einen verschiedene Spannungsprotokolle (siehe auch Abbildung 2.4) angelegt, zum anderen die Stromantworten aufgezeichnet werden. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit Excel (Microsoft), OriginPro (OriginLab) oder IGOR (WaveMetrics) ausgewertet.

#### 2.6.4.2. **Mikroelektroden**

Alle verwendeten Mikroelektroden waren sog. Silber/Silberchlorid-Elektroden. Dazu wurde Silberdraht in 2 M KCl-Lösung elektrolytisch chloriert (ACI-01, NPI electronics). Für die Referenzelektrode wurde ein 1 mm dicker Polyvinylschlauch mit einem Agarpropfen (3 M KCl; 2 % Agar (w/v), Bio&SELL) verschlossen und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, bevor der chlorierte Silberdraht eingeführt wurde. Um mit den Messelektroden (PE und CE) möglichst minimal invasiv durch die Oozytenmembran einstechen zu können, wurden aus Borsilikatglaskapillaren (KWIK-FIL™, World Precision Instruments) und mit Hilfe eines speziellen Kapillarziehers Einstichpipetten gezogen (Narishige Scientific). Die finale Öffnungsweite dieser Kapillaren wurde dabei so gewählt (2 - 3  $\mu\text{m}$ ), dass für optimale Messbedingungen der gemessene Pipettenwiderstand zwischen 0,3 und 1,2 M $\Omega$  lag. Diese so verjüngten Kapillaren wurden ebenfalls mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, bevor die Elektroden in die Oozyten eingestochen wurden. Die enge Öffnung der Einstichpipetten bzw. der Agarpropfen der Badelektrode ermöglichte nicht nur eine optimale Messung, sondern verhinderte bzw. erschwerte dabei außerdem, dass sich die wesentlich höher konzentrierten Elektroden-Lösungen mit der Badlösung bzw. dem Zytoplasma der Oozyte vermischen konnten.

#### 2.6.4.3. **Konventionen**

Wie bereits oben erwähnt beschreibt die Potentialdifferenz zwischen der Spannung außerhalb der Zelle (RE) und der Spannung des Zytoplasmas (PE) die Membranspannung ( $U_m$ ). Konventionsgemäß wird dabei das extrazelluläre Potential auf null gesetzt. Findet also ein Anionenausstrom oder ein Kationeneinstrom in die Oozyte statt, spricht man von einem negativen Strom. Bei einem Anioneneinstrom bzw. Kationenausstrom handelt es sich dementsprechend um einen positiven Strom.

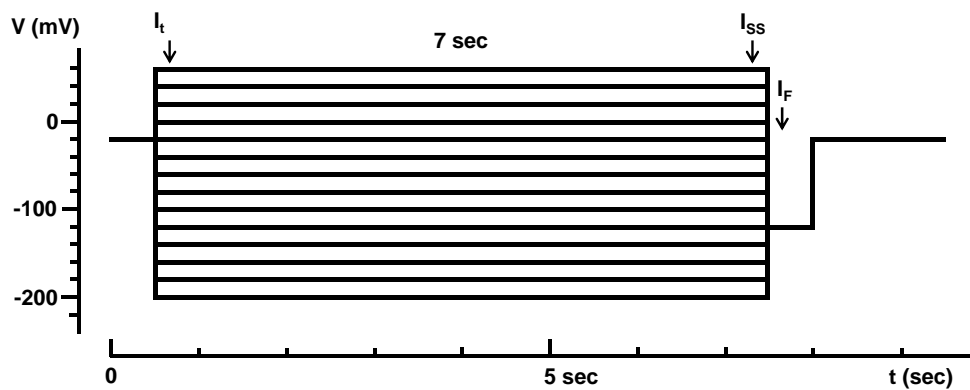


#### 2.6.4.4. Datenerfassung, -analyse und biophysikalische Grundlagen

##### 2.6.4.4.1. Datenerfassung

Zu Beginn jeder Messung wurden die Messelektroden in die Badlösung eingetaucht. Daraufhin musste der durch die unterschiedliche Chlorid-Konzentration zwischen Elektrodenlösung (3 M KCl) und Messlösung (nie mehr als 100 mM) bedingte Potentialgradient auf null abgeglichen werden. Nach dem Einstechen der Elektroden in die Oozyten konnte dann das zum entsprechenden Zeitpunkt vorliegende Gesamt-Membranpotential der Oozyte abgelesen werden. Für die Ermittlung der Anionenselektivität wurde der Strom über die Membran auf null geklemmt. Dadurch entsprach das gemessene Membranpotential dem Umkehrpotential des betrachteten Anions, welches daraufhin zur Berechnung der relativen Permeabilität des Anionenkanals verwendet werden konnte (siehe Datenanalyse 2.6.4.4.2).

Für detailliertere elektrophysiologische Charakterisierungen von Transportproteinen und hier im speziellen des Anionenkanals PttSLAH3 eignen sich im Besonderen Untersuchungen in Abhängigkeit von Membranspannungsänderungen. Hierzu wurde die Oozyte auf eine konstante Haltespannung von -20 mV geklemmt und mit Hilfe eines sog. Standard-Spannungspulsprotokolls (Abbildung 2.4) für eine definierte Zeit unterschiedliche Spannungen angelegt.



**Abbildung 2.4: Standard-Spannungspulsprotokoll**

Zu Beginn jedes der 14 Durchgänge eines Spannungspulsprotokolls wurde für 0,5 sec eine Haltespannung von -20 mV angelegt. In der nachfolgenden Phase wurde für sieben Sekunden bei jedem Durchgang eine unterschiedliche Spannung geklemmt. Beginnend bei +60 mV wurde diese pro Durchgang um 20 mV reduziert, so dass nach 14 Durchläufen eine Spannung von -200 mV erreicht wurde. Während dieser spannungsabhängigen Phase konnten nach jeweils 50 ms instantane Ströme ( $I_t$ ) und am Ende dieses Abschnittes Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ ) abgegriffen werden. Anschließende 0,5 Sekunden andauernde Folgepulsspannungen bei -120 mV ermöglichten die Erfassung sog. Tailströme (oder auch Folgepulsstrom,  $I_F$ ). Im letzten Segment wurde für 1,5 sec wiederum die Haltespannung von -20 mV angelegt.

Definiert war das Spannungsprotokoll durch vier verschiedene Phasen. Der erste bzw. letzte Abschnitt jedes Durchgangs diente - durch das Anlegen der Haltespannung von -20 mV - dem Erreichen einer identischen Ausgangslage vor dem darauffolgenden ersten Test-Abschnitt. In diesem wurde bei jedem der 14 Durchläufe die angelegte Spannung um 20 mV reduziert, sodass beginnend bei +60 mV bei der letzten Wiederholung die Oozyte auf -200 mV geklemmt war. Anschließend wurde ausgehend von der variablen Spannung aus dem vorherigen Abschnitt direkt auf dieselbe sog. Folgepulsspannung von -120 mV gesprungen, bevor wieder die Haltespannung von -20 mV angelegt wurde.

Für die Auswertung der durch das angelegte Pulsprotokoll erzeugten Stromantworten, wurden drei spezielle Zeitpunkte ausgewählt ( $I_t$ ,  $I_{SS}$ ,  $I_F$ ; siehe Abbildung 2.4). Zum Zeitpunkt 50 ms nach Beginn der variablen Spannungsphase konnten noch unabhängig von der zeitlichen Spannungsabhängigkeit die sog. instantanen Ströme ( $I_t$ ) abgegriffen werden. Für die Analyse der Kanal-Spannungsabhängigkeit wurde der Gleichgewichtsstrom ( $I_{SS}$ , engl. steady-state current), der sich nach einigen Sekunden einstellte, für die Auswertung verwendet. Mit Hilfe der nachfolgend aufgezeichneten Ströme zu Beginn des Spannungssprunges auf -120 mV ( $I_F$ ) konnte die relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit ermittelt werden. Die genauen Zusammenhänge bzw. Berechnungen der einzelnen Daten sollen in folgendem Abschnitt durch die Einbindung biophysikalischer Grundlagen erläutert werden.

#### 2.6.4.4.2. Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse

Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Protein PttSLAH3 handelt es sich um einen S-Typ-Anionenkanal, der ausschließlich in einem offen oder geschlossenen Zustand vorliegen kann.

Deshalb wird der über die DEVC-Methode messbare Gesamtzellstrom ( $I$ ) der Oozyte nur von drei Variablen bestimmt: Anzahl der Kanäle ( $N$ ), Einzelkanalstrom bei einer bestimmten Spannung ( $i$ ) und Offenwahrscheinlichkeit ( $P_O$ ).

$$I(U, t) = N * i(U) * P_O(U, t)$$

Zum Zeitpunkt  $I_{SS}$  (siehe Abbildung 2.4) stellt sich durch die länger anhaltende konstante Spannung nach einer gewissen Zeit ein Gleichgewichtszustand ein, bei dem sich der Stromfluss durch die Kanäle netto nicht mehr bzw. kaum noch verändert. Deshalb wird

genau zu diesem Zeitpunkt die den Kanal charakterisierende spannungsabhängige Stromantwort abgegriffen.

Da nach jedem dieser spannungsabhängigen Schritte des zweiten Segments immer dieselbe Folgepulsspannung von -120 mV geklemmt wurde und die Anzahl an Kanälen unverändert bleibt ( $N * i(U_F) = \text{konstant}$ ), ermöglicht die Bestimmung von  $I_F$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Folgepulsspannung ein direktes Maß für die relative spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Kanals  $P_O$ . Zur Berechnung von  $P_O$  wurden die  $I_F$ -Werte nach einer Boltzmann Funktion gefittet, auf den Maximalwert normalisiert und gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen.

Für die Bestimmung der relativen Kanalpermeabilität wurde die Umkehrspannung  $U_{rev}$  verwendet. Sie ist definiert als die Spannung zu dem Zeitpunkt, an dem die Summe aller Ionenströme über die Membran gleich Null ist. Die sonst dafür verantwortliche und durch den elektrochemischen Gradienten erzeugte Kraft ist also nicht in der Lage, einen Netto-Ionenfluss über die Membran zu erzeugen. Für die Berechnung des Umkehrpotentials gilt wie für die Berechnung jedes Membranpotentials unter Berücksichtigung einer entsprechenden Anzahl an permeierenden Ionen die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung.

$$U_M = \frac{R * T}{F} * \ln \frac{P_x [x^-]_{\text{innen}} + P_y [y^-]_{\text{innen}} + P_z [z^+]_{\text{außen}} + \text{etc.}}{P_x [x^-]_{\text{außen}} + P_y [y^-]_{\text{außen}} + P_z [z^+]_{\text{innen}} + \text{etc.}}$$

### **Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung:**

R = universelle Gaskonstante; T = absolute Temperatur in °Kelvin; F = Faraday'sche Konstante; P = Permeabilitätskoeffizient; [x, y, z, etc.] = Konzentration der jeweiligen Ionenart innen bzw. außen; - = Anion; + = Kation.

Handelt es sich wie in dieser Arbeit bei PttSLAH3 um einen Anionen-selektiven Kanal, der für einen Transport durch die Verwendung einer entsprechenden Messlösung nur ein mögliches permeables Anion zur Verfügung hat, kann für die Berechnung der  $U_{rev}$  die Nernst-Gleichung verwendet und entsprechend angepasst werden.

$$U_{rev} = \frac{R * T}{Z_x * F} * \ln \frac{P_x [x^-]_{\text{innen}}}{P_x [x^-]_{\text{außen}}}$$

### **Angepasste Nernst-Gleichung:**

R = universelle Gaskonstante; T = absolute Temperatur in °Kelvin;  $Z_x$  = Anzahl der Elektronenladung; F = Faraday'sche Konstante; P = Permeabilitätskoeffizient;  $[x^-]$  = Konzentration des jeweiligen Anions innen bzw. außen.

Bei monovalenten, also einwertigen Ionen wie zum Beispiel Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ergibt sich für  $Z_{\text{Nitrat}} = 1$ . Unter der Annahme einer Temperatur von 25 °C (298,15 °Kelvin) kann deshalb die Nernst-Gleichung noch weiter vereinfacht werden.

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

### Vereinfachte Nernst-Gleichung:

P = Permeabilitätskoeffizient;  $[X^-]$  = Konzentration des jeweiligen Anions innen bzw. außen.

Daraus ergibt sich in der Theorie, dass eine zehnfache Erniedrigung der externen Anionenkonzentration eine Verschiebung des  $U_{rev}$  um 59,1 mV zur Folge hat.

Da die intrazelluläre Anionenkonzentration bei der Verwendung der DEVC-Methode aber nicht bekannt ist, musste für die Berechnung der relativen Permeabilitäten ein Vergleich mit einer definierten Badlösung, in diesem Fall 50 mM  $\text{NaNO}_3$ , durchgeführt werden. Die Umstellung der vereinfachten Nernst-Gleichung ergab folgende Gleichung, anhand derer die relative Permeabilität der getesteten Anionen im Vergleich zu Nitrat bestimmt werden konnte.

$$\frac{P_x}{P_{\text{Nitrat}}} = 10^{\frac{\Delta U_{rev}}{59,1}} * \frac{[\text{NO}_3^-]_{\text{außen}}}{[X^-]_{\text{außen}}}$$

### Gleichung zur Berechnung der relativen Permeabilität:

P = Permeabilitätskoeffizient;  $[X^-]$  = Konzentration des getesteten Anions außen.  $\Delta U_{rev}$  definiert sich aus der Differenz der Umkehrpotentiale von Nitrat und dem getesteten Anion.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Nektarien-Ökologie**

Zu Beginn der hier präsentierten Ergebnisse soll ergänzend erwähnt werden, dass es sich bei etlichen der hier untersuchten Pappeln um Freilandpflanzen von *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* handelte, die nicht nur saisonalen Bedingungen ausgesetzt waren, sondern die sich auch auf z.B. klimatische Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahren einstellen konnten bzw. mussten. Im Verlauf dieser Arbeit (in einem Zeitraum von vier Jahre) konnten deshalb immer wieder neue Eigenschaften der Nektarien-Entwicklung bzw. -Regulierung beobachtet werden.

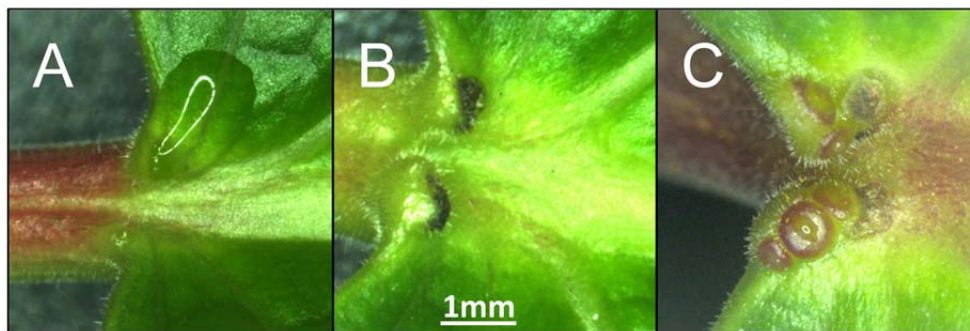
#### **3.1.1. Nektarien-Präsenz**

In den vier Untersuchungsjahren zeigte sich, dass keine der beiden Pappelarten im Frühjahr eine strikte Nektarien-Präsenz bzw. Absenz besaß. Ob und wie viele Blätter zu Beginn der Vegetationsperiode Nektarien präsentierten, schien dabei hauptsächlich von Umweltfaktoren bzw. von der Art und Intensität des Winters abhängig zu sein. Dabei konnten allerdings keine speziellen Bedingungen identifiziert werden, die entsprechend für einen Nektarien-, „reicherer“ bzw. -, „ärmerer“ Frühling verantwortlich waren. Es konnte jedoch insoweit eine Tendenz festgestellt werden, dass sich nach Wintern, in denen häufiger Kälteperioden durch längere, wärmere Phase unterbrochen wurden, eher junge Blätter mit Nektarien entwickelten.

Grundsätzlich konnte im Zuge dieser Arbeit die konstitutive extraflorale Nektarien-Präsenz, die zu Beginn des Frühlings bislang nur für die Mehrzahl aller frisch ausgetriebenen *Ptt*-Blätter bekannt war (siehe Einleitung), auch für *Ptr*-Pflanzen gezeigt werden. Interessanterweise konnten aber nur bei *Ptr* vereinzelte Pflanzen beobachtet werden, die im Frühling komplett Nektarien-frei waren, wohingegen sich *Ptt*-Pflanzen nie Nektarien-frei im Frühjahr präsentierten. Dies wiederum bestätigte die Erkenntnisse aus früheren Beobachtungen und bekräftigte, dass es sich bei den beiden Pappeln um unterschiedliche Nektarien-Strategien handeln muss.

### 3.1.2. Nektarien- und Nektar-Induktion

Die Beobachtungen an *Ptr*- und *Ptt*-Nektarien bestätigten die bereits in der Einleitung beschriebene unterschiedliche Nektar-Sekretion. Während *Ptt*-Nektarien kontinuierlich kleine Mengen an Nektar sekretierten (merokriner Typ), präsentierte *Ptr* innerhalb eines kurzen Zeitraums (wenige Tage) relativ viel Nektar. Die meisten dieser *Ptr*-Nektarien „starben“ außerdem nach wenigen Tagen der Sekretion ab (holokriner Typ) und standen demnach nicht mehr für eine erneute Sekretion von Nektar zur Verfügung. Interessanterweise waren einige *Ptr*-Blätter aber in der Lage, neben „verbrauchten“, toten Nektarien neue Drüsenorgane zu generieren (Abbildung 3.1). Diese Neubildung von EFN ermöglichte eine erneute Nektar-Sekretion und damit weiteren Schutz gegen herbivore Angriffe.



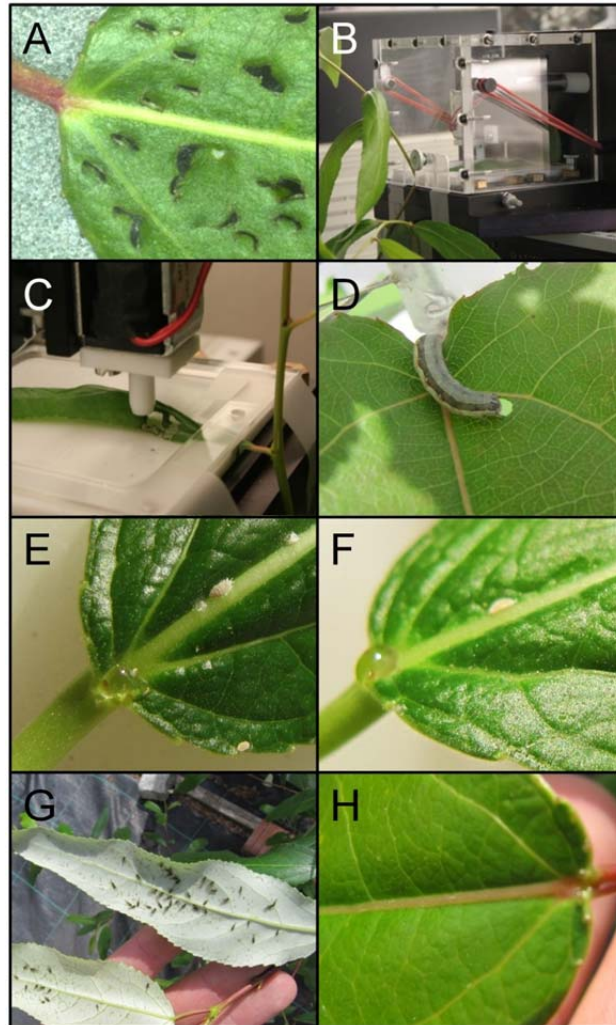
**Abbildung 3.1: Entwicklung neuer *Ptt*-EFN neben alten, toten Nektarien.**

Durch die Entwicklung neuer extrafloraler Nektarien wurde eine Fortsetzung der indirekten Abwehr durch extraflorale Nektarien ermöglicht. (A) zeigt die erste, holokrine Nektar-Sekretion, (B) tote Nektarien nach der Sekretion und (C) die Fortführung der Sekretion extrafloralen Nektars durch neugebildete Nektarien. Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Diese Neubildung von EFN konnte jedoch nur bei *Ptt*-Pflanzen beobachtet werden. Wie auch die erste, möglicherweise durch Stress oder Herbivorenbefall ausgelöste und nicht konstitutive Entwicklung von *Ptt*-Nektarien, deutete diese zweite Generation von Nektarien auf eine regulierbare Nektarien-Induktion bei *Ptt* hin. Um eine solche Induktion zu bestätigen, wurden sowohl Nektarien-freie als auch *Ptt*-Blätter mit Nektarien auf unterschiedlichste Weise behandelt, wobei jeweils Herbivorenbefall simuliert werden sollte.

Einfache Verwundung durch Nadelstiche (Abbildung 3.2 A) zeigte, im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (siehe Einleitung), auch nach sechs Tagen keine Veränderung der Nektarien-Aktivität. Weder wurden neue Nektarien gebildet, noch wurde Nektar von vorhandenen Nektarien sekretiert. Im Gegensatz zur punktuellen Verletzung konnte mit

Hilfe einer computergesteuerten mechanischen Raupe „MecWorm“ (Mithöfer et al., 2005) ein kontinuierlich andauernder Fraß simuliert werden, der räumlich und zeitlich einer natürlichen Verwundung durch einen Fraßfeind sehr nahe kam (Abbildung 3.2 B und C).



**Abbildung 3.2: Nektar-Sekretion an *Ptr*-Blättern ist Herbivoren-abhängig.**

Weder einfache, noch kontinuierliche mechanische Verwundung oder unterschiedliche Raupen waren in der Lage, Nektar-Sekretion zu induzieren (A - D). Befall mit saugenden Insekten führte dagegen zur Nektar-Produktion (E – H). Die einzelnen Bilder zeigen die mechanische Verwundung durch Nadelstiche (A), den Aufbau des computergesteuerten mechanischen Wurms „MecWorm“ (B), kontinuierliche Verwundung durch MecWorm (C), realen Herbivorenfraß, repräsentiert durch *Spodoptera exigua* (D), die Nektar-Sekretion durch Wollausbefall (E, F), an den Leitgefäßen auf der Unterseite des Blattes saugende „fliegende Blattläuse“ (G) und die an der Oberseite des Blattes von (G) festgestellte beginnende Nektar-Sekretion (H). Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Auch durch diese Methode konnte weder Nektarien- noch Nektar-Induktion ausgelöst werden. Dieser Befund ließ vermuten, dass eine einfache Verwundung nicht für eine Änderung der Nektarien-Aktivität ausreicht, sondern ein zusätzlicher Stimulus nötig war. Deshalb wurde zusätzlich zur kontinuierlichen Verletzung durch MecWorm Oralsekret von

*Spodoptera littoralis*, einer sich von vielen Pflanzenarten ernährende Raupe (polyphag), in die entstandenen Wunden perfundiert. Aber auch diese zusätzliche Stimulation durch Raupen-eigene Elicitoren zeigte keinerlei Wirkung auf die Nektarien oder Nektar-Produktion. Daraufhin wurden *Ptr*-Pflanzen unabhängig voneinander mit drei verschiedenen polyphagen Raupen konfrontiert, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar* (Abbildung 3.2 D). Alle drei Arten fraßen an *Ptr*-Blättern, jedoch konnten auch durch diese Verletzungen keine Nektarien- oder Nektar-Induktion festgestellt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei *Ptr* eine herbivore Verwundung im Allgemeinen keine indirekte Abwehr über extraflorale Nektarien initiiert. Interessanterweise zeigten jedoch Pflanzen, die Wollläusen (Pseudococcidae) bzw. fliegenden Blattläusen ausgesetzt waren, sekretierende extraflorale Nektarien (Abbildung 3.2 E, F, G und H). Insekten, die sich mit stechend-saugenden Organen von Phloemsaft ernähren, waren also im Gegensatz zu den getesteten Raupen in der Lage, den Abwehrmechanismus über extraflorale Nektarien zu aktivieren. Die Art der Herbivoren scheint demnach entscheidend für Regulierbarkeit bzw. Induktion von *Ptr*-Nektarien und/oder Nektar zu sein.

### **3.1.3. Flüchtige organische Verbindungen (VOCs)**

Flüchtige organische Verbindungen (VOCs, engl. volatile organic compounds) spielen wie bereits in der Einleitung beschrieben bei vielen Pflanzen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden und der Kommunikation mit benachbarten Pflanzen. An den Beispielen von Limabohne und *Macaranga tanarius* konnte zudem gezeigt werden, dass durch herbivore Verletzung induzierte VOCs an intakten Teilen der verletzten Pflanze selbst und auch an benachbarten Pflanzen die Bildung extrafloralen Nektars bewirkten (Heil et al., 2001; Kost and Heil, 2006). Diese Studien zeigten außerdem, dass die Freisetzung von VOCs und die damit verbundene Nektar-Sekretion an den Jasmonsäure-Signalweg (JA, engl. jasmonic acid) gekoppelt war. Die Annahme lag also durchaus nahe, dass VOCs als z.B. Repellent speziell in *Ptr* nicht nur die erste Barriere gegen Herbivoren übernehmen sondern auch, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Induktion von *Ptr*-EFN spielen könnten. Für die vorliegende Arbeit und eine genauere und statistische Untersuchung der vorläufigen Ergebnisse (siehe Einleitung) wurden die VOCs-Analysen an *Ptr*-Pflanzen ausgeweitet. Dazu wurden Pflanzen mit und ohne Nektarien durch

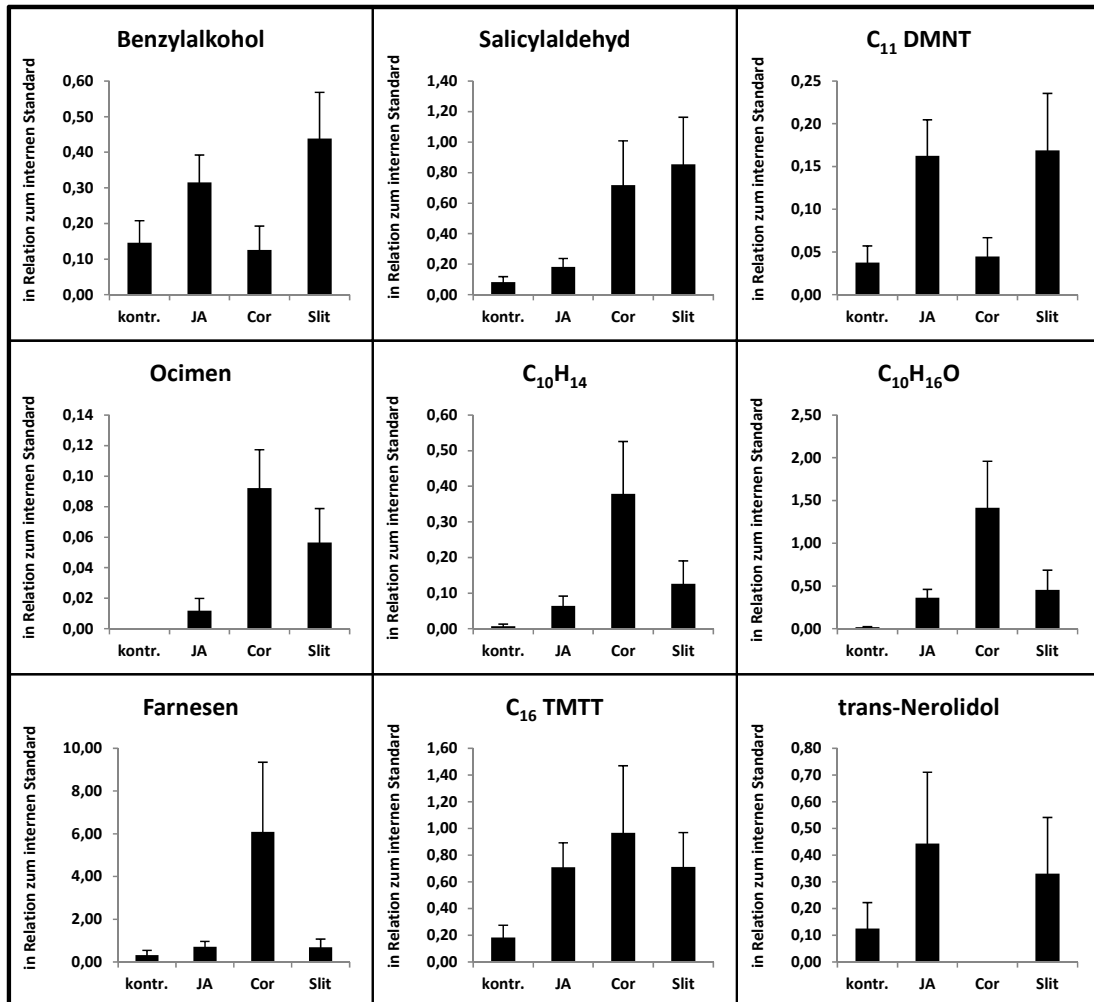


unterschiedliche Methoden behandelt bzw. verletzt, die nähere Umgebungsluft gesammelt und mittels GC/MS Technik auf potentielle VOCs untersucht.

Interessanterweise war bereits vor Versuchsbeginn auffällig, dass *Ptr* im Vergleich zu *Ptt* besonders im Frühjahr einen speziellen, etwas „strenger riechenden“ Duft verbreitete. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine stetige Freisetzung von VOCs bei *Ptr* sein. Jedoch zeigten die Untersuchungen von unbehandelten *Ptr*-Pflanzen keine spezielle Freisetzung von flüchtigen organischen Verbindungen (siehe auch Abbildung 3.3). Unterschiedliche Behandlungen sollten daraufhin klären, ob simulierter oder realer Herbivorenbefall bei *Ptr* überhaupt entsprechende VOCs freisetzt und, wenn ja, ob dieser Prozess ebenso wie in Limabohne und *Macaranga tanarius* an den Jasmonsäure-Signalweg gekoppelt ist.

Dazu wurden *Ptr*-Pflanzen zum einen durch einfache Nadelstiche oder kontinuierlich durch „MecWorm“ mechanisch verletzt. Ebenso wurden Pflanzen mit dem durch Verletzungen freigesetzten Hormon JA bzw. Coronalon, einem synthetisch hergestellten Analogon des Phytotoxins Coronathin, das eine ähnliche, jedoch intensivere Wirkung in Pflanzen hat wie JA behandelt. Denn Untersuchungen von Boland und Kollegen haben gezeigt, dass allein eine externe Applikation von JA zu einer Produktion und Abgabe von entsprechenden VOCs in Pflanzen führt (Boland et al., 1995; Schüler et al., 2001; Schüler et al., 2004; Svoboda and Boland, 2010). Erneut wurden polyphage Raupen von *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar* verwendet, um letztendlich reale herbivore Verwundung zu prüfen. Die Analyse der entsprechenden Duftspektren konnte dabei vorläufige Messungen von Dr. María Escalante Pérez bzw. die daraus resultierenden Tendenzen bestätigen (siehe Einleitung). So zeigte sich erneut, dass mechanische Verwundungen alleine nicht für die Freisetzung von, für einen Herbivorenbefall typische VOCs ausreichend war (Daten nicht gezeigt). Erst die Behandlungen der Pflanzen mit JA oder Coronalon bzw. realer Herbivorenbefall (hier gezeigt für *Spodoptera littoralis*) resultierte in eindeutigen erwarteten Duftprofilen (Abbildung 3.3). Benzylalkohol, Salicylaldehyd, 4,8-Dimethyl-1,3,7-Nonatrien (DMNT), (E)- $\beta$ -Ocimen, Farnesen, 4,8,12-Trimethyltridec-1,3,7,11-Tetraen (TMTT) und trans-Nerolidol waren dabei die primär freigesetzten VOCs. Diese Duftstoffe wurden bereits in verschiedenen Pflanzen als typische VOCs nach Herbivorenbefall identifiziert, wie Studien zu *Ptr* (Danner et al., 2011), aber auch Studien mit anderen Pflanzen wie Limabohne oder anderen Baumarten zeigten (Kost and Heil, 2008; Holopainen, 2011). Im Vergleich zu nicht behandelten Pflanzen (in der Abbildung als kontr. bezeichnet) konnte so deutlich gezeigt werden, dass erst nach Behandlung mit JA, Coronalon oder Verletzung durch

*Spodoptera littoralis* eine entsprechende Freisetzung der jeweiligen VOCs nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigte die Hypothese, dass *Ptr* auf Verwundung durch Herbivoren mit der Freisetzung typischer VOCs reagiert, und dass dieser Prozess wie bei Limabohne und *Macaranga tanarius* an den JA-Signalweg gekoppelt ist.



**Abbildung 3.3: Von *Ptr* freigesetzte VOCs nach simuliertem bzw. realem Herbivorenbefall.**

Behandlung mit JA, bzw. Coronalon oder reale Verwundung durch *Spodoptera littoralis* zeigte, mit wenigen Ausnahmen, eine erhöhte Freisetzung der für einen Herbivorenbefall typischen VOCs. C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O und C<sub>10</sub>H<sub>14</sub> stellen Abbauprodukte der katalytischen Oxidation von ursprünglich abgegebenem (E)- $\beta$ -Ocimen dar (Sonwa et al., 2007). Die gezeigten Werte stellen Mittelwert von jeweils Kontrolle (kontr.; n = 11); Jasmonsäure [1mM] (JA; n = 13), Coronalon (Cor; n = 9) und *Spodoptera littoralis* (Slit; n = 15) dar ( $\pm$  SF). N-Bromdecan wurde als interner Standard verwendet. Die Analysen mittels GC/MS-Methode wurden von der AG Prof. Dr. Wilhelm Boland (MPI für chemische Ökologie, Jena) durchgeführt. Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Wie bereits bei den Induktionsverfahren (siehe 3.1.2) konnte bei diesem Experiment allerdings auch nach vier Tagen keine Induktion von Nektarien oder Nektar an den behandelten *Ptr*-Pflanzen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Limabohne und *Macaranga tanarius* scheint demnach die Nektar-Induktion in *Ptr* nicht durch VOCs

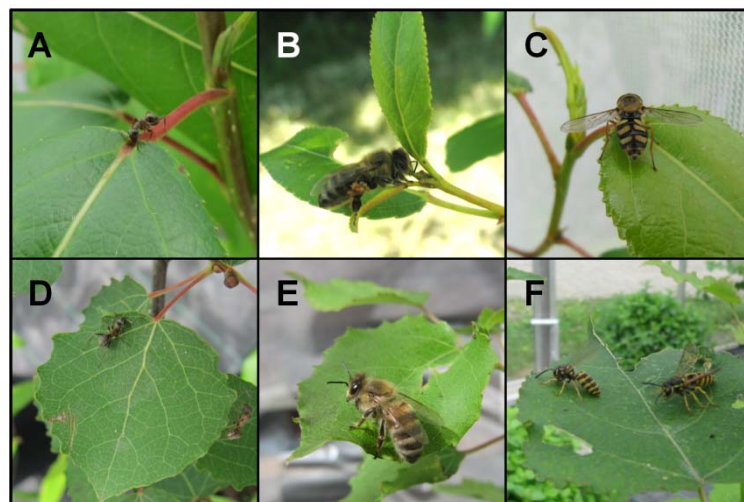
regulierbar und damit auch nicht an JA gekoppelt zu sein. Die durch saugende Insekten verursachte Sekretion von *Ptr*-Nektar muss daher durch einen anderen, JA unabhängigen Signalweg verursacht worden sein.

### 3.1.4. Nektar-Attraktivität und Nektarien-Effektivität

#### 3.1.4.1. „Besucher“

Für die Art der Nektarien-Besucher und damit für die Attraktivität ist die Zusammensetzung des Nektars von entscheidender Bedeutung. Nektarivore Besucher bevorzugen die unterschiedlichsten Nährstoffquellen. Beide hier untersuchten Pappelarten unterscheiden sich in der Kohlenhydrat-Zusammensetzung ihres Nektars. Während *Ptt* ein ausgeglichenes Verhältnis der Hauptzucker Glukose, Fruktose und Saccharose besitzt, dominieren bei *Ptr* die beiden Hexosen (siehe Einleitung). Nektar von *Ptr* sollte deshalb eher attraktiv auf Spezialisten wie z.B. Ameisen wirken, *Ptt*-Nektar eher auf Generalisten wie Bienen, Wespen etc. (siehe Einleitung).

Beobachtungen über den Zeitraum von vier Jahren zeigten verschiedenste Besucher an Pappeln des Botanischen Gartens der Universität Würzburg. Bei vielen angelockten Insekten konnte jedoch keine eindeutige Pappel/Nektar-Präferenz festgestellt werden (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Besucher extrafloraler Nektarien von *Ptr* und *Ptt*.**

Bilder (A – C) zeigen Besucher von *Ptr*, (D – F) von *Ptt*. Beide Pappeln wurden von Ameisen (A; D) und Honigbienen besucht (B; E). Schwebefliegen wurden dagegen nur von *Ptr* (C), Wespen nur von *Ptt* (F) angezogen. Abbildung modifiziert aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

An beiden Arten waren am häufigsten Ameisen der Gattung *Lasius emarginatus* (bestimmt von AG Professor Dr. Flavio Roces, Zoologie II, Universität Würzburg) zu finden, aber auch Bienen konnten an beiden Nektarien beobachtet werden. Wespen zeigten sich allerdings nur interessiert an *Ptt*-Nektar, Schwebfliegen nur an *Ptr*.

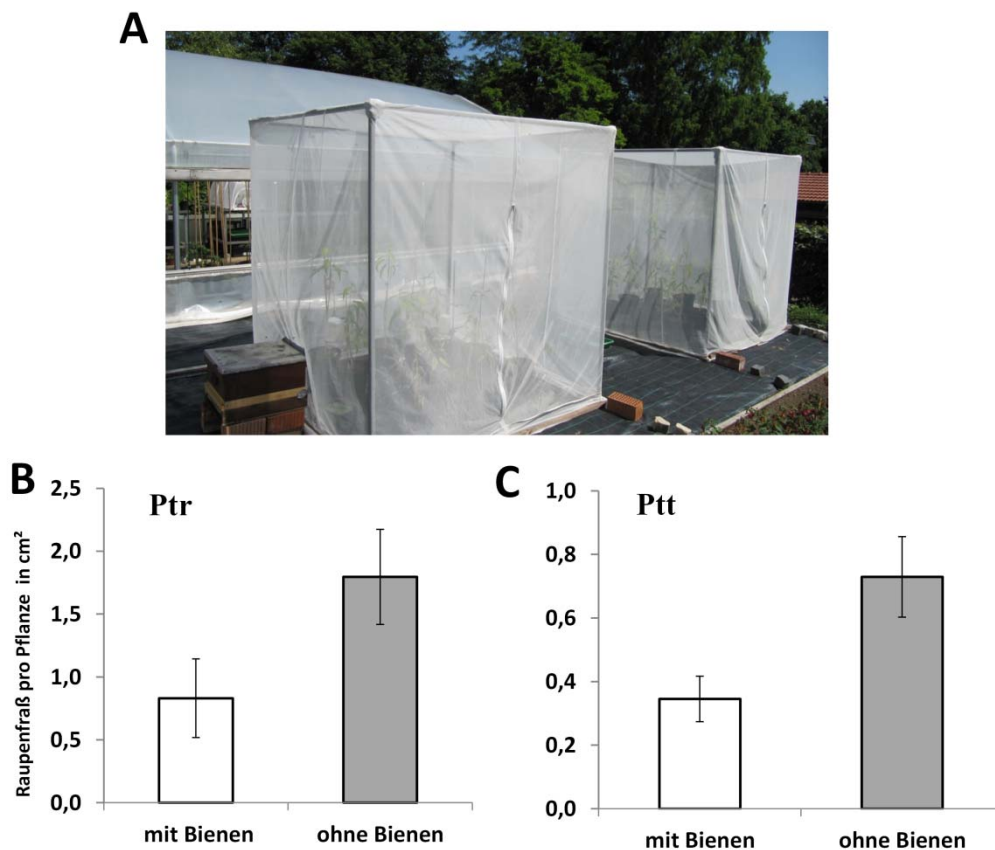
#### 3.1.4.2. **Effektivität extrafloraler Nektarien**

Die Beobachtung einer Vielzahl auch unterschiedlichster Besucher an extrafloralen Nektarien der Pappeln zeigte eindeutig, dass durch spezifische Rekrutierung von Feinden herbivorer Insekten ein Schutz vor Blattfraß möglich ist. Interaktionsstudien zwischen Pappel, Herbivoren und deren Feinden sollten dies bekräftigen. Zu den Fraßfeinden der Pappel zählen viele Insekten wie z.B. in unseren Breiten der Große oder Kleine Pappelbock. Generell erleiden Blätter befallener Bäume aber hauptsächlich Schaden durch Larven von Insekten. Viele Studien zwischen Pappel und Herbivoren wurden mit Larven einer Mottenart (*Malacosoma disstria*) durchgeführt, die vor allem in Nordamerika endemisch ist (Arimura et al., 2004; Ralph et al., 2006; Major and Constabel, 2008). Diese Raupen stellen folglich keine Option für Versuche im Freiland des Botanischen Gartens der Universität Würzburg dar.

Vorversuche mit fünf verschiedenen polyphagen Raupen (*Agrotis segetum*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar*) identifizierten *Spodoptera exigua* als die einzig geeignete Wahl hinsichtlich Fraß an *Ptr* bzw. *Ptt* und Abwehrverhalten gegen „Feinde“. Diese Raupenart zeigte zwar nur das zweitstärkste Fraßergebnis an den untersuchten Pappeln (Daten nicht gezeigt), ihr Abwehrverhalten aber war ausschlaggebend für ihre Wahl. Denn nicht alle Raupenarten besitzen neben eventuellen langen Abwehrhaaren spezielle winzige Sinneshärchen, mit denen sie in der Lage sind, Vibrationen der Luft und damit den Flügelschlag sich annähernder feindlicher Insekten zu erkennen (Tautz, 1977; Tautz and Markl, 1978). Als Reaktion auf die Wahrnehmung entsprechender Schallwellen unterbrechen solche Larven - die mögliche Gefahr erkannt - ihren Fraß oder stoppen diesen komplett. Parasitäre und karnivore Wespen stellen dabei für die meisten Raupen die gefährlichsten Feinde dar. Ihre von den Flügeln erzeugte Schallwellenfrequenz liegt zwischen 100 und 600Hz (Tautz, 1977). Einzig *Spodoptera exigua* Larven reagierten entsprechend bei der Konfrontation mit einer durch einen Schallwellengenerator künstlich erzeugten „Flügelschlagfrequenz“. Bienen erzeugen eine ähnliche Schallquelle wie Wespen und stimulieren deshalb dieselben Sinneshärchen (Markl and Tautz, 1975). Sie sind im Vergleich zu Wespen relativ leicht zu

domestizieren und werden von Pappeln angelockt (siehe 3.1.4.1). Da zudem der reduzierende Effekt durch die Anwesenheit von Honigbienen auf das Fraßverhalten von *Spodoptera exigua* Larven bereits in einer anderen Interaktionsstudie erfolgreich gezeigt werden konnte (Tautz and Rostas, 2008), wurden Bienen auch für die hier durchgeführte Interaktionsstudien verwendet.

Untersuchungen im Sommer 2012 zeigten sowohl für *Ptr* als auch *Ptt* eine Reduktion des Blattfraßes um die Hälfte, wenn Bienen in der näheren Umgebung der Pappeln anwesend waren. So wurde der Fraß bei Anwesenheit von Bienen pro Pflanze von 1,8 auf 0,8 cm<sup>2</sup> (bei *Ptr*) bzw. von 0,73 auf 0,35 cm<sup>2</sup> (bei *Ptt*) verringert (Abbildung 3.5). Die Anwesenheit von Bienen hatte somit einen erheblichen Einfluss auf das Fraßverhalten der Larven und damit auf die Gesundheit der Pappeln.



**Abbildung 3.5: Verringerter Fraßschaden an *Ptr* und *Ptt* durch *Spodoptera exigua* bei Anwesenheit von Bienen.**

Sowohl *Ptr* als auch *Ptt* zeigten einen um die Hälfte reduzierten Blattschaden durch Raupenfraß, wenn Bienen in der Nähe waren. (A) Gezeigt wird der Versuchsaufbau zweier Netzkäfige im Botanischen Garten der Universität Würzburg, zum einen mit angeschlossenen Bienenstock (links unten), zum anderen ohne Bienenstock. (B) zeigt den berechneten Fraßschaden an *Ptr*, (C) den an *Ptt*. (Mittelwert Blattschaden pro Pflanze  $\pm$  SF; n = 9 Pflanzen pro Käfig).

## 3.2. Nektarien-spezifische Genexpression

Die ursprünglichen Daten der genomweiten Expressionsanalyse (siehe Einleitung) wurden durchgeführt, um die entscheidende Rolle extrafloraler Nektarien bei der Verteidigung der Pappel gegen Herbivoren aufklären zu können. Im Zuge dieser Arbeit wurden dazu die bereits vorhandenen Microarrays von extrafloralen *Ptt*-Nektarien und *Ptt*-Blättern ohne Nektarien weiter ausgewertet und mittels quantitativer Realtime PCR (qPCR, *Ptt* und *Ptr*) näher analysiert. Zur übersichtlicheren Darstellung und Erklärung der meisten in diesem Ergebnisteil (3.2) behandelten Daten und Tabellen soll, wenn nicht anders erwähnt, die Tabellenbeschriftung bzw. die Methode der Datenerfassung nachfolgend erklärt werden.

Jedem untersuchten Transkript auf den Microarrays ist definitionsbedingt eine spezifische Affymetrix Identifikationsnummer zugeordnet. Diese wurde verwendet, um in der Genexpressions-Datenbank PLEXdb ([http://www.plexdb.org/modules/PD\\_probeset/annotation.php?genechip=Poplar](http://www.plexdb.org/modules/PD_probeset/annotation.php?genechip=Poplar)) zum einen die Zugangsnummer der korrespondierenden Sequenz (**Öffentliche ID**) für die öffentlich zugängliche molekularbiologische Datenbank NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/guide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide)) zu erhalten und zum anderen, um die Identifikationsnummer für das nächst homologe Gen in *Arabidopsis thaliana* (**AGI Code**, AGI, engl. Arabidopsis Genome Initiative) zu identifizieren. Mit Hilfe dieses AGI Codes und der Arabidopsis Datenbank TAIR (engl. The Arabidopsis Information Resource; [www.arabidopsis.org/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/index.jsp)) konnte für das untersuchte Pappel-Transkript eine funktionelle Zuordnung (**Annotation**) mit Bezug auf das nächst homologe Arabidopsis Gen getroffen werden. Der **logFC** (Logarithmus zur Basis 2 des Induktionsfaktors, engl. fold change, **FC**) gibt an, in wie weit das betrachtete Transkript differenziell zwischen extrafloralen Nektarien und Blatt exprimiert ist. Der **adj.P-val.** (adjusted P-value, engl. für angepasster P-Wert) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der das Transkript fälschlicherweise als differenziell eingestuft wurde.

### 3.2.1. Validierung der Microarray-Daten

Da die Auswertung der hier verwendeten Microarray-Daten aufgrund einer sich nicht eindeutig zuordnen lassenden Blattprobe auf 3 Proben (EFN) gegen nur 2 Proben (Blatt) basierte, mussten die daraus resultierenden Ergebnisse validiert werden. Dazu wurden verschiedene Transkripte mittels qPCR überprüft. Die daraus erhaltenen Werte wurden

dann mit den Expressionsverhältnissen der Microarrays abgeglichen. Dabei konnte, bis auf wenige Ausnahmen, eine Übereinstimmung von Microarrays und qPCR festgestellt werden (Tabelle 3.1). Dies zeigte, dass die Mikroarray-Daten trotz unzureichender Statistik für eine Einschätzung der differentiellen Expression zwischen Blatt und Nektarie ausreichend waren.

Öffentliche ID	AGI Code	Annotation	qPCR logFC	Array logFC
CV242633	At1g65890	AAE12 (Acyl Activating Enzyme 12)	6,4	6,0
BU825949	At4g36470	Carboxyl methyltransferase family protein	4,3	5,3
CV276911	At4g24340	Phosphorylase family protein	4,6	5,0
CV283544	At1g52340	ABA2 (ABA deficient 2); alcohol dehydrogenase	5,1	4,2
AJ744954.1	At1g51760	IAR3 (IAA-Alanine Resistent 3)	-0,6	1,2
XP_002326709	At1g32450	NRT1.5 (Nitrate Transporter 1.5)	0,6	1,1
CV246702	At1g47670	Amino acid transporter family protein	0,0	1,1
AJ777538	At2g42790	CSY3 (Citrate Synthase 3)	0,6	0,9
CK093044	At5g48930	HCT (quinate Hydroxycinnamoyl Transferase)	0,8	0,8
XP_002315752	At5g43860	ATCLH2; Chlorophyllase	-1,0	0,7
CV249255	At1g05260	RCI3 (Rare Cold Inducible gene 3)	-1,4	-0,4
CV242179	At2g05620	PGR5 (Proton Gradient Regulation 5); electron carrier	-4,8	-1,7
CV283317	At5g66190	FNR1 (Ferredoxin-NADP(+)oxidoreductase 1)	-4,7	-1,7
CA926076	At5g20630	GLP3, GER3 (Germin 3)	-8,4	-4,9

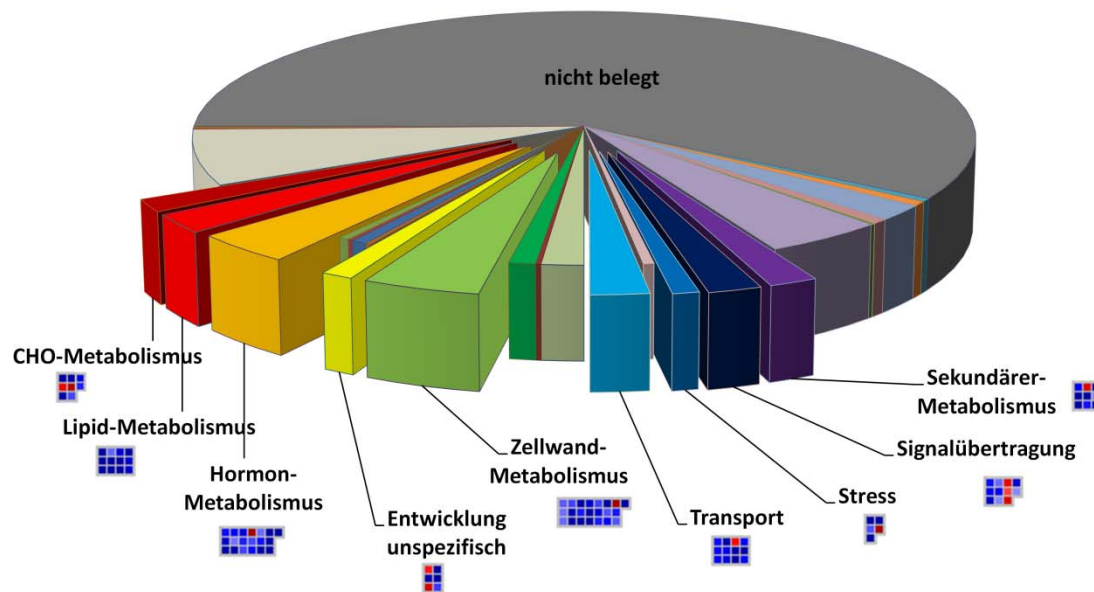
**Tabelle 3.1: Validierung der Microarray-Daten durch qPCR.**

Mit Hilfe von qPCR-Analysen konnte die differenzielle Microarray-Expression verschiedener Gene (Array logFC) verifiziert werden. Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.2.2. Top-500 der am stärksten differentiell exprimierten Gene

Aus ca. 56.000 auf dem Array vorhandenen und auswertbaren Pappel-Genen wurden die 500 am stärksten differentiell exprimierten identifiziert. Unter diesen waren 365 (73 %) induziert und 135 (27 %) reprimiert in Nektarien (Schwellenwert logFC  $\pm$  1,62). Mit Hilfe der Kategorisierungssoftware MapMan (Usadel et al., 2009) konnten diese 500 Gene in 27 Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 3.6). Neun der Genklassen, insgesamt 102 Gene, konnten in Zusammenhang mit Nektarien-Funktion, -Entwicklung und -Bildung eingestuft werden (CHO-, Lipid-, Hormon-, Zellwand- und Sekundärer- Metabolismus, Entwicklung

unspezifisch, Transport, Stress und Signalübertragung). Interessanterweise waren 90% dieser Gene in Nektarien induziert.



**Abbildung 3.6: Kategorisierung der 500 am stärksten differenziell exprimierten Gene, EFN vs. Blatt.**

Die 500 am stärksten differenziell zwischen *Ptt* extrafloralen Nektarien bzw. Blatt ohne Nektarien exprimierten Microarray-Gene wurden in MapMan 3.1.1 importiert und klassifiziert. Viele der Transkripte konnten nicht durch die Software zugeordnet werden (nicht belegt, hier fehlt eine eindeutige Annotierung). Von allen anderen 27 Gruppen sind diejenigen hervorgehoben, die mit der Funktion oder Entwicklung der Nektarien in Verbindung gebracht werden konnten. Der jeweiligen Kategorie sind die von MapMan importierten „Boxen“ hinzugefügt. Jedes einzelne Kästchen einer Box entspricht dabei einem zugeordneten Gen. Die farbliche Einstufung beschreibt den Grad der differentiellen Expression (blau = induziert, rot = reprimiert in Nektarien). Auffällig war, dass fast alle Gene in den hervorgehobenen Gruppen in EFN induziert sind. Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.2.2.1. Wichtige Genklassen

Auf einige der für Nektarien besonders wichtig erscheinenden Genklassen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

#### 3.2.2.1.1. Zellwand-Metabolismus

Enzyme des Zellwand-Metabolismus spielen bei der Bildung und Modifikation von Nektarien eine große Rolle. Der Hauptbestandteil von zum Beispiel *Populus tremuloides* Zellwänden ist Pektin (Mellerowicz et al., 2001). Transkripte von Pektin-Esterasen, Pektinasen und Pektin-Lyase konnten induziert in *Ptt*-EFN gefunden werden (Tabelle 3.2).



Ebenso konnten in Nektarien induzierte Transkripte von Enzymen identifiziert werden, die mit den anderen Hauptkomponenten pflanzlicher Zellwände in Verbindung gebracht werden können. Darunter eine endo-xyloglucan Transferase (Hemicellulose) sowie eine Cellulose Synthase (Tabelle 3.2).

Öffentliche ID	AGI Code	Annotation	FC	logFC	adj.P-val.
BP929963	At5g25610	RD22 (Responsive to Dessication 22)	22,9	4,5	5,4E-05
CV268088	At3g43270	Pectinesterase family protein	15,2	3,9	2,6E-05
CV281908	At3g19320	Leucine-rich repeat family protein	10,0	3,3	6,6E-05
CV230945	At3g61490	Polygalacturonase (pectinase) family protein	10,0	3,3	4,4E-05
CX176311	At3g61490	Polygalacturonase (pectinase) family protein	8,7	3,1	5,5E-05
CN519614	At3g23730	Endo-xyloglucan transferase	8,5	3,1	2,6E-05
DN502989	At3g19320	Leucine-rich repeat family protein	8,0	3,0	7,1E-05
CV281908	At3g19320	Leucine-rich repeat family protein	7,5	2,9	7,8E-05
CF227942	At4g24780	Pectate lyase family protein	6,6	2,7	2,9E-05
BU893810	At1g69530	ATEXPA1 (Arabidopsis thaliana Expansin A1)	6,3	2,7	3,7E-05
BU811740	At3g14310	ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)	5,3	2,4	8,2E-05
DN486441	At3g14310	ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)	4,9	2,3	3,3E-05
CX659087	At3g08900	RGP3 (Reversibly Glycosylated Polypeptide 3)	4,9	2,3	5,8E-05
CN520892	At3g23730	Endo-xyloglucan transferase	4,9	2,3	8,2E-05
AI165969	At4g24780	Pectate lyase family protein	4,2	2,1	5,1E-05
XP_002324379	At4g31590	ATCSLC05 (Cellulose Synthase-Like C5)	4,2	2,1	5,4E-05
CA927911	At3g14310	ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)	4,0	2,0	8,2E-05
XP_002326320	At2g26440	Pectinesterase family protein	3,9	2,0	8,2E-05
CV244899	At1g08200	AXS2 (UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 2)	3,8	1,9	5,8E-05
CV227643	At5g15490	UDP-glucose 6-dehydrogenase	3,6	1,9	8,3E-05
CV230306	At2g27860	AXS1 (UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase 1)	3,5	1,8	8,2E-05
XP_002314796	At1g23200	Pectinesterase family protein	0,1	-3,0	2,6E-05

**Tabelle 3.2: Klasse der dem Zellwand-Metabolismus zugeordneten besonders induzierten Gene.**

Aus den Top-500 am stärksten differenziell exprimierten Transkripten konnten 22 dem Zellwand-Metabolismus zugeordnet und entsprechend ihres Induktionsfaktor (FC) sortiert werden. Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Expansine lockern die Zellwand auf und ermöglichen deren Ausdehnung (Sampedro and Cosgrove, 2005). Ein Vertreter dieser Familie konnte ebenfalls induziert in Nektarien gefunden werden. UDP-D-Glucose ist ein Vorprodukt der Zellwand-Kohlenhydrate (Mellerowicz et al., 2001 und Referenzen darin). Drei Enzyme, die dabei Prozesse katalysieren, waren ebenfalls Teil dieser induzierten Gruppe an Transkripten. Auch finden sich zwei Leucin-reiche Proteine in dieser Liste der induzierten Gene (Tabelle 3.2).

#### 3.2.2.1.2. Hormon-Metabolismus

Hormone gehören in diversen Organismen zu den wichtigsten Signalmolekülen. In Pflanzen sind sie unverzichtbar bei der Steuerung von Wachstum und Entwicklung und spielen bei Schutzmechanismen wie der herbivoren Abwehr (siehe Einleitung) eine essentielle Rolle. Inzwischen sind bereits viele unterschiedliche Hormonklassen bekannt. Dazu zählen Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abscinsinsäure (ABA) und Ethylen, aber auch relativ neue Mitglieder, wie z.B. Brassinosteroide, Jasmonate oder Salicylate (Shan et al., 2012).

Unter den Top-500 Transkripten konnten 19 den entsprechenden Hormonklassen zugeordnet werden (Tabelle 3.3). Dabei wurden sechs Transkripte mit der Klasse der Auxine in Verbindung gebracht. Ein Beispiel ist das in *Ptt*-EFN deutlich induzierte DFL1 Gen, welches überexprimiert zu einem verminderten Wachstum in Licht führt (Nakazawa et al., 2001). Dieses Gen aus der Klasse der GH3 Gene gehört wie auch die Klasse der SAURs (ebenfalls induziert in Nektarien) zu den „early auxin response genes“ (Hagen and Guilfoyle, 2002). PIN Gene spielen eine entscheidende Rolle in der Verteilung und Homöostase von Auxin und damit auch von Zellteilung und polarem Wachstum (Blilou et al., 2005). Induziert in extrafloralen Nektarien von *Ptt* findet sich PIN5. Brassinosteroide (Steroidhormone) regulieren in der Pflanze eine Vielzahl an Prozessen wie Zellteilung und Zellexpansion, aber auch Leitgefäßdifferenzierung und allgemeine Reaktionen auf abiotische und biotische Stressfaktoren (Gudesblat and Russinova, 2011). Auch dieser Hormonklasse konnten drei in Nektarien induzierte Transkripte zugeordnet werden. Die übrigen 10 Transkripte der Hormongruppe teilen sich in mit Ethylen (3), Jasmonsäure (2) und Salicylsäure (5) assoziierte Gene auf. All diesen Hormonklassen wird eine Beteiligung an einer Pflanzenantwort auf Herbivoren- oder einen Pathogenbefall zugeschrieben (Kachroo and Kachroo, 2007).

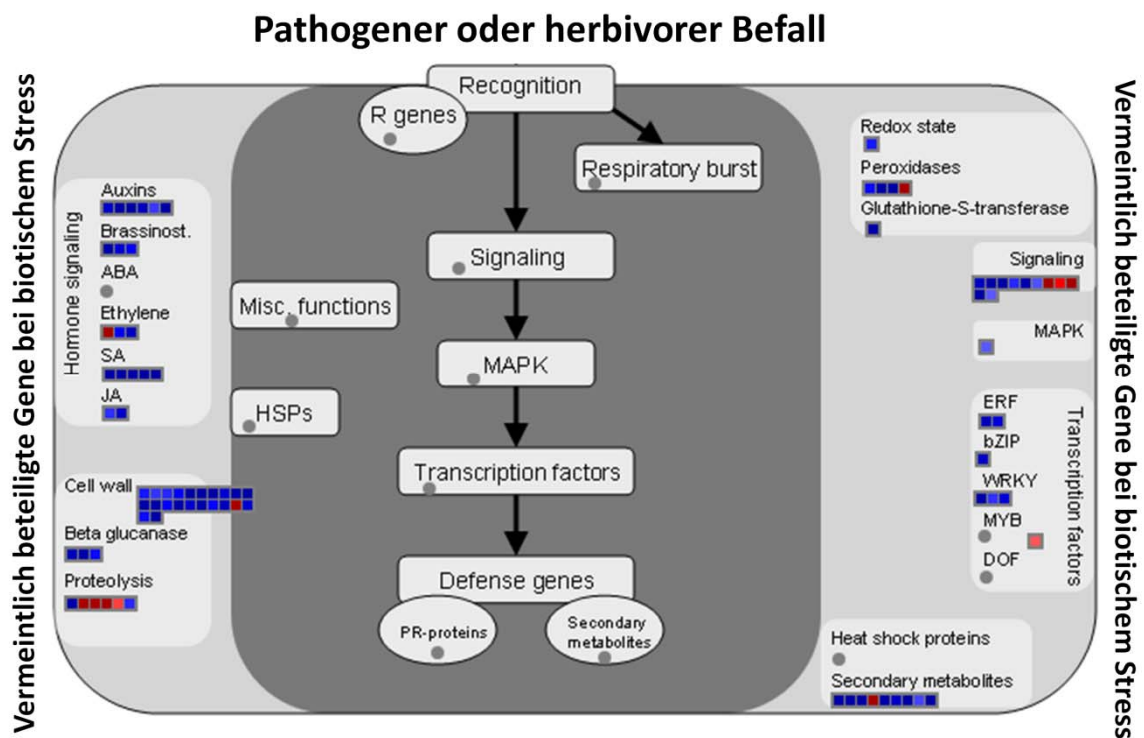
Öffentliche ID	AGI Code	Annotation	FC	logFC	adj.P-val.	Hor <sup>a</sup>
XP_002312924	At1g29430	Auxin-responsive family protein	3,4	1,8	6,5E-05	Aux
XP_002316954	At5g54510	DFL1/GH3.6 (Dwarf in Light 1)	15,7	4,0	3,3E-05	Aux
XP_002319398	At5g54510	DFL1/GH3.6 (Dwarf in Light 1)	10,7	3,4	4,9E-05	Aux
XP_002306218	At1g29510	SAUR68 (Small Auxin Upregulated 68)	5,2	2,4	3,9E-05	Aux
CV237921	At1g77690	Amino acid permease	5,1	2,3	8,2E-05	Aux
XP_002336658	At5g16530	PIN5 (PIN-formed 5); auxin:hydrogen symporter	6,7	2,8	4,4E-05	Aux
CK092098	At1g75080	BZR1 (Brassinazole-Resistant 1)	4,2	2,1	8,4E-05	Bra
CA823181	At3g19820	DWF1 (Diminuto 1); catalytic	6,3	2,7	5,5E-05	Bra
AJ778035	At3g19820	DWF1 (Diminuto 1); catalytic	4,8	2,3	5,6E-05	Bra
XP_002300561	At4g20880	ERT2 (Ethylene-Regulated nuclear protein)	5,2	2,4	7,4E-05	Eth
CX184416	At2g40940	ERS1 (Ethylene Response Sensor 1); receptor	4,1	2,0	6,4E-05	Eth
DN490862	At1g06620	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	0,1	-3,5	2,6E-05	Eth
BP933461	At5g42650	AOS (Allene Oxide Synthase)	5,0	2,3	8,2E-05	JA
CV262113	At1g55020	LOX1 (Lipoxygenase 1)	3,5	1,8	7,4E-05	JA
BU825949	At4g36470	BSMT1; S-adenosylmethionine-dep. methyltransferase	40,0	5,3	2,3E-05	SA
CV263317	At4g36470	BSMT1; S-adenosylmethionine-dep. methyltransferase	30,7	4,9	3,4E-05	SA
XP_002335942	At5g38020	BSMT1; S-adenosylmethionine-dep. methyltransferase	22,7	4,5	4,3E-05	SA
XP_002334262	At1g19640	JMT (Jasmonic acid carboxyl methyltransferase)	25,2	4,7	6,9E-05	SA
CA929119	At1g68040	Carboxyl methyltransferase family protein	15,9	4,0	2,6E-05	SA

**Tabelle 3.3: Klasse der dem Hormon-Metabolismus zugeordneten besonders induzierten Gene.**

Aus den Top-500 am stärksten differenziell exprimierten Transkripten konnten 19 dem Hormon-Metabolismus zugeordnet und nach Hormonklassen sortiert werden. <sup>a</sup> Entsprechende Hormonklasse, Auxin (Aux), Brassinosteroide (Bra), Ethylen (Eth), Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA). Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.2.2.1.3. Biotischer Stress

Um die Wichtigkeit extrafloraler Nektarien bei der Herbivoren-Abwehr zu unterstreichen, wurden die am stärksten in EFN induzierten bzw. reprimierten Transkripte auf Gene untersucht, die im Allgemeinen mit biotischem Stress in Verbindung gebracht werden. Dazu wurden die Top-500 Transkripte erneut mit Hilfe von MapMan und unter Verwendung eines Pfades, der Transkripte darstellt die mit biotischem Stress in Verbindung gebracht werden, analysiert. Knapp ein Fünftel der Gene (84 aus 500) konnten dabei den verschiedensten Klassen zugeordnet werden (Abbildung 3.7). Neben den bereits genauer betrachteten Klassen für Zellwand- und Hormon-Metabolismus traten auch Gene aus Gruppen wie sekundäre Metabolite, Transkriptionsfaktoren oder allgemein Signalweiterleitung in den Vordergrund. Wieder fiel auf, dass viele dieser Gene (86 %) induziert vorlagen, was die entscheidende Rolle der EFN bei biotischem Stress bekräftigt.



**Abbildung 3.7: An biotischem Stress beteiligte Genklassen sind in Nektarien hauptsächlich induziert.**

Die Top-500 Gene wurden mit Hilfe einer speziellen Pfadeinteilung (engl. pathway; biotic stress) in MapMan 3.1.1 analysiert. 84 Gene konnten dabei mit biotischem Stress in Verbindung gebracht werden, viele davon induziert in *Ptt*-EFN. Am häufigsten differentiell reguliert waren Zellwand- (engl. cell wall), Hormon-Metabolismus (engl. hormone signaling), sekundäre Metabolite (engl. secondary metabolites), Transkriptionsfaktoren (engl. transcription factors) und Signalweiterleitung (engl. signaling). Jedes einzelne Kästchen einer Box entspricht einem zugeordneten Gen. Die farbliche Einstufung beschreibt den Grad der differentiellen Expression (blau = induziert, rot = reprimiert in Nektarien). Abbildung aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.2.3. Ausweitung der differentiellen Genexpressionsanalyse

Im nächsten Schritt wurde die Transkriptomanalyse auf die weniger stark regulierten Transkripte der gesamten Microarrayliste (ca. 56.000 Gene) ausgeweitet und teilweise mittels qPCR validiert.

#### 3.2.3.1. Antimikrobielle Nektar-Proteine

Wie in der Einleitung beschrieben und in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt, sind EFN nicht nur wichtig für die Abwehr von Herbivoren, sondern bilden aufgrund der Sekretion von nährstoffreichem Nektar auch gleichzeitig eine Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen und Pilze. Erste Untersuchungen zeigten jedoch, dass *Ptr*-Nektar durch einen „Cocktail“ aus antimikrobiellen Proteinen, bestehend aus GDSL-Lipasen und PR-Proteinen, vor entsprechenden pathogenen Angreifern geschützt ist (siehe Einleitung). Da die Proteinanalyse aber nur für Nektar von *Ptr* durchgeführt worden war, sollten Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene klären, ob die in *Ptr*-Nektar identifizierten Proteine auch in *Ptt* eine ähnliche Rolle spielen. Hierbei wurden erneut isolierte extraflorale Nektarien mit Blättern ohne Nektarien verglichen.

qPCR Analysen von *Ptr* bestätigten zunächst, dass die Transkripte aller 15 im *Ptr*-Nektar identifizierten Proteine tatsächlich mehr oder weniger stark in extrafloralen Nektarien exprimiert wurden (Tabelle 3.4). Fünf der Transkripte (drei GDSL-Lipasen, ein PR-3 und ein PR-10 Protein) waren dabei in Nektarien nur in geringer Anzahl, im Blatt jedoch überhaupt nicht detektierbar. Die übrigen 10 Gene zeigten sich nahezu ausschließlich in Nektarien (rechnerisch ergaben sich bis zu 5.000fache Induktionen). Um einen Vergleich zu *Ptt* ziehen zu können, wurden *Ptt* Microarray-Daten analysiert. Sechs der Transkripte (alle fünf GDSL-Lipasen und das PR-10 Protein) wurden dabei als nicht auf dem Arraychip befindlich identifiziert und konnten deshalb nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Andere Transkripte waren entweder nicht (drei) bzw. nicht eindeutig reguliert (ein PR-4 Protein). Vier Transkripte waren leicht (2 bis 2,9fach), eines sogar stark induziert in *Ptt*-EFN (PR-5 Protein, 12,5fach induziert). Die Transkriptomanalyse von *Ptr*- und *Ptt*-Nektar-Proteinen bestätigte somit, dass eine hohe Ähnlichkeit zwischen beiden Nektar-Proteinzusammensetzungen besteht.

Protein ID <sup>a</sup>	Annotation <sup>b</sup>	<i>Ptr</i> qPCR <sup>c</sup>		<i>Ptt</i> Arrays	
		Nektarien	Blatt	FC	adj.P-val.
827727	GDSL lipase like	41814 ± 13912	8 ± 6	-	-
586261	GDSL lipase like	4 ± 1	nd	-	-
593152	GDSL lipase like	0.12 ± 0.04	nd	-	-
581173	GDSL lipase like	7 ± 4	nd	-	-
292112	GDSL lipase like	8905 ± 2224	nd	-	-
590536	Bet v I like protein; PR-10	1 ± 0.5	nd	-	-
290846	GHF 17; beta-1,3-glucanase; PR-2	8241 ± 2286	1565 ± 543	2	1,0E-02
652688	GHF 17; beta-1,3-glucanase; PR-2	2422 ± 698	17 ± 2	0,9	5,2E-01
746640	GHF 18; class III chitinase; PR-8	39949 ± 17514	471 ± 38	2,2	1,7E-02
717157	GHF 18; class V chitinase; PR-3	262 ± 85	nd	0,9	5,9E-01
826290	GHF 19; class IV chitinase; PR-3	0.06 ± 0,01	nd	2,4	1,1E-02
550049	SCP PR-1 like protein; PR-1	66 ± 1	0.02	2,9	6,8E-04
571046	Hevein-like protein; PR-4	61461 ± 13160	94 ± 24	1,5	2,5E-02
763978	Kunitz-type trypsin inhibitor; PR-6	1300 ± 189	1.9 ± 0.2	1,2	4,2E-01
669475	Thaumatococcus-like; PR-5	2048 ± 559	6 ± 1	12,5	3,3E-05

**Tabelle 3.4: *Ptr* und *Ptt* zeigen eine ähnliche Zusammensetzung antimikrobieller Nektar-Proteine.**

Für einen Vergleich der Expression von *Ptr*- und *Ptt*-Nektar-Proteinen auf transkriptioneller Ebene wurden qPCR- (*Ptr*) und Microarray-Analysen (*Ptt*) verwendet. *Ptr* und *Ptt* zeigten eine ähnliche Zusammensetzung und eine tendenziell induzierte Expression in EFN. <sup>a</sup> Die Protein ID beschreibt die Zugangsnummer [Poptrdraft...] mit der die korrespondierende Sequenz in der Pappeldatenbank JGI (engl. Joint Genome Institute; [http://genome.JGI-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Poptr1\\_1](http://genome.JGI-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Poptr1_1)) identifiziert werden kann. <sup>b</sup> Funktionelle Zuordnung entsprechend des NCBI Datenbankvergleichs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit der Zugangsnummer aus <sup>a</sup>; GHF, Glycosylhydrolase Familie. <sup>c</sup> Moleküle pro 10.000 Moleküle Aktin aus qPCR (Mittelwerte  $n = 3 \pm SF$ ); nd, nicht detektierbar. Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.2.3.2. Kohlenhydrat-Metabolismus

Nektar besteht neben möglichen antimikrobiellen Nektar-Proteinen (siehe oben), aber zum größten Teil aus Wasser und Kohlenhydraten. Entscheidend für die Nektar-Zusammensetzung und damit für die Funktion von extrafloralen Nektarien sind deshalb vor allem Gene, die dem Kohlenhydrat-Metabolismus und speziell dem Kohlenhydrat-Transport zugeordnet werden können. Kohlenhydrate werden hauptsächlich als Saccharose über das Phloem von Source-Gebieten (Blatt) zu Sink-Gebieten (z.B. extraflorale Nektarien) transportiert. Allgemein stehen Nektar-Komponenten, im Nektarienparenchym angekommen, dann aber meistens irgendwann vor einer symplastischen Barriere, die einen freien Fluss in die bzw. aus den sekretierenden Zellen der Nektarie verhindert (Vassilyev, 2010). Im besonderen Fall von *Ptt*, bei der eine symplastische Abgrenzung der Drüsenzellen bestätigt wurde (siehe Einleitung), muss also spätestens dort ein apoplastischer Schritt entsprechender Kohlenhydrate erfolgen.

Eine Analyse der Microarray-Daten (Tabelle 3.5) lieferte 16 Monosaccharidtransporter induziert in extrafloralen Nektarien (zwischen 2 und 3,9fach induziert).

Öffentliche ID	AGI Code	Annotation	FC	logFC	adj.P-val
<b>Hauptsächlicher Kohlenhydrat-Metabolismus</b>					
BU879414	At3g52600	ATCWINV2, Cell Wall Invertase	10,1	3,3	2,8E-04
CV260807	At3g05820	Alkaline/Neutral Invertase H	6,2	2,6	8,2E-05
BP928698	At4g02280	ATSUS3, Sucrose Synthase 3	4,8	2,3	3,7E-05
<b>Untergeordneter Kohlenhydrat-Metabolismus</b>					
BP933945	At2g19800	Myo-Inositol Oxygenase 2	75,5	6,2	2,8E-05
XP_002330589	At1g55740	Raffinose Synthase 1	21,0	4,4	4,1E-05
CV271186	At5g08370	Alpha-Galactosidase 2	4,2	2,1	6,4E-05
<b>Kohlenhydrat-Transport</b>					
CV267500	At5g16150	GLT1, Glucose Transporter 1	3,9	2,0	1,7E-04
CV265114	At2g43330	ATINT1, Inositol Transporter 1	3,4	1,8	1,5E-04
CA823118	At1g73220	ATOCT1, Organic Cation/Carnitine Transporter 1	2,8	1,5	2,0E-04
XP_002313809	At3g18830	ATPLT5, Polyol/Monosaccharid Transporter 5	2,7	1,4	4,3E-04
CV237054	At5g17010	Sugar Transporter Family Protein	2,5	1,3	2,2E-03
CB307011	At5g26340	STP13, Sugar Transport Protein 13	2,5	1,3	2,6E-03
XP_002310808	At1g75220	sugar/inositol transport protein	2,4	1,2	2,8E-04
XP_002308798	At4g16480	ATINT4, Inositol Transporter 4	2,3	1,2	2,6E-03
CK107634	At5g17010	Sugar Transporter Family Protein	2,2	1,1	1,6E-03
CV241535	At4g35300	TMT2, Tonoplast Monosaccharide Transporter 2	2,2	1,1	7,4E-03
CV272388	At5g41760	Nucleotide-Sugar Transporter Family Protein	2,2	1,1	9,3E-04
CA928662	At3g59360	ATUTR6, UDP-Galactose Transporter 6	2,1	1,1	2,4E-03
CV279380	At5g26340	STP13, Sugar Transport Protein 13	2,1	1,1	8,9E-04
BU866894	At5g59250	Sugar Transporter Family Protein	2,0	1,0	2,2E-03
XP_002329696	At1g73220	ATOCT1, Organic Cation/Carnitine Transporter 1	2,0	1,0	2,8E-03
XP_002324427	At1g67300	Hexose Transporter	2,0	1,0	4,6E-03
XP_002315798	At2g02860	ATSUC3, Sucrose Transporter 3	1,5	0,6	4,6E-03
XP_002311596	At2g02860	ATSUC3, Sucrose Transporter 3	1,5	0,6	9,7E-03

**Tabelle 3.5: Kohlenhydrat-Metabolismus und -Transport in extrafloralen *Ptt*-Nektarien.**

Für die Analyse des Kohlenhydrat-Metabolismus in *Ptt*-EFN wurden alle 56.000 in den Microarray-Daten identifizierten Transkripte in MapMan importiert. Die induzierten Transkripte der Kategorien Hauptsächlicher Kohlenhydrat-Metabolismus, Untergeordneter Kohlenhydrat-Metabolismus und Kohlenhydrat-Transport werden in dieser Tabelle zusammengefasst. Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle modifiziert aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Erst im nicht eindeutig induzierten Bereich (1,5fach induziert) konnten zwei Saccharosetransporter identifiziert werden. Da aber über das Phloem hauptsächlich Saccharose angeliefert wird und *Ptt*-Nektar eine ausgewogene Mischung aus Saccharose und Hexosen aufwies (siehe Einleitung), muss eine entsprechende Verarbeitung stattgefunden haben. Eine 10,1fach in Nektarien induzierte Zellwand- und eine 6,2fach induzierte neutrale Invertase könnten für eine entsprechende hydrolytische Spaltung von Saccharose direkt vor den Drüsenzellen oder im *Ptt*-Nektarienparenchym sprechen. Eine ebenfalls identifizierte 4,8fach induzierte Saccharosesynthase könnte außerdem die Rückbildung eines Teils der Saccharose belegen.

Es wurden auch einige dem untergeordneten Kohlenhydrat-Metabolismus zugehörige Transkripte als teilweise stark in Nektarien exprimiert identifiziert. Den induzierten Transkripten einer  $\alpha$ -Galactosidase (4,2fach), einer Raffinose Synthase (21fach) und einer Myo-Inositol Oxygenase (75,5fach) werden bei der Zellwand Gestaltung entscheidende Rollen zugeschrieben.

### 3.2.3.3. An Exocytose beteiligte Gene

Alle bisherigen Erkenntnisse, vor allem aber die kontinuierliche Nektar-Freisetzung ließen eine merokrine Sekretion in *Ptt* vermuten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um einen granulokrinen Typ handelt, wurde zusätzlich durch die in Ultrastrukturaufnahmen identifizierte hohe Anzahl an Vesikeln bekräftigt (siehe Einleitung). Zur Bestätigung dieses Sekretionstyps wurden deshalb die Microarray-Daten hinsichtlich von Zarsky und Kollegen 2009 beschriebenen, an exocytotischen Prozesse beteiligter Gene untersucht.

Dabei konnten mindestens 21 Transkripte identifiziert werden, die mit Vesikelbildung oder -transport in Verbindung gebracht werden können (Tabelle 3.6). Diese waren teilweise stark (fünf Gene, 7,9 bis 2fach induziert), andere schwächer (acht Gene, 1,9 bis 1,5fach induziert) und manche nicht eindeutig (acht Gene, 1,4 bis 0,5fach induziert) differenziell exprimiert. Sieben der 21 Gene konnten mit „multivesicular bodies“ (engl. für multivesikuläre Körper, MVB), einer speziellen Art des vesikulären Transports, die bereits durch Ultrastrukturaufnahmen vermutet wurde (siehe Einleitung), assoziiert werden. Dabei fielen vor allem zwei zur PEP12 Klasse gehörende SNARE Proteine auf, deren Transkripte in Nektarien relativ stark bzw. leicht induziert (4,0 bzw. 1,8fach) waren. Solche SNARE Proteine sind entscheidend an der Zielfindung, aber auch an der Membranfusionierung von Vesikeln beteiligt (Bassham et al., 2008). Neben den bereits erwähnten konnten zwei



weitere unregulierte SNARE Proteine und drei ebenfalls nicht bzw. leicht induzierte RabF-GTPasen Transkripte den MVB zugeordnet werden (Tabelle 3.6).

Öffentliche ID	AGI Code	Annotation	FC	Log FC	adj.P-val.	Typ <sup>a</sup>	Klasse <sup>b</sup>
DN496417	At3g46060	GTP-binding protein ara-3	1,4	0,5	3,4E-02	RabE/ Rab8 (1)	TGN
BU893135	At5g59840	GTP-binding protein ara-3	2,2	1,1	1,3E-03	RabE/ Rab8 (2)	TGN
CV241725	At1g53050	Ser/Thr kinase activity	1,7	0,8	1,4E-02	RabA	TGN
CF120135	At4g39080	Vacuolar proton ATPase subunit	1,9	1,0	3,6E-03	VHA-a1	TGN
XP_002327686	At2g18250	Pantetheine-phosphate adenylyltransferase	0,5	-0,9	1,2E-03	SNARE (1)	TGN/ MVB
CK093245	At1g08560	Syntaxin SYP111 (KNOLLE)	1,3	0,4	1,1E-01	SNARE (2)	TGN/ MVB
CK092620	At5g46860	Syntaxin SYP22 (VAM3)	4,0	2,0	1,6E-04	PEP12 (1)	MVB
CF936851	At5g46860	Syntaxin SYP22 (VAM3)	1,8	0,8	3,6E-03	PEP12 (2)	MVB
CV277800	At4g19640	GTP-binding protein	1,1	0,1	7,9E-01	RabF (1)	MVB
CV240653	At5g45130	Ras-related GTP-binding protein RHA1	1,1	0,1	5,2E-01	RabF (3)	MVB
CX178052	At5g45130	Ras-related GTP-binding protein RHA1	1,5	0,6	7,2E-02	RabF (2)	MVB
BP932273	At5g06140	Sorting nexin-like protein	0,7	-0,5	1,8E-02	SNX1	RE
CV275482	At3g62290	ADP-ribosylation factor-like protein	2,0	1,0	4,3E-03	Arf1 (1)	VF
CK088579	At3g62290	ADP-ribosylation factor-like protein	1,7	0,8	1,7E-03	Arf1 (2)	VF
BU824735	At1g60500	Dynamin family protein, GTP-binding	7,9	3,0	5,0E-05	Dynamin (1)	VF
CK090501	At4g33650	Dynamin-like protein ADL2	1,9	0,9	8,7E-03	Dynamin (2)	VF
XP_002314626	At1g59820	Chromaffin granule ATPase II homolog	1,1	0,1	6,2E-01	Ala3 (1)	VF
XP_002339708	At1g59820	Chromaffin granule ATPase II homolog	1,8	0,8	5,1E-03	Ala3 (2)	VF
BU810775	At1g17500	P-type ATPase	2,2	1,1	1,4E-03	Ala3 (3)	VF
CV278073	At1g32580	Plastid protein	1,0	0,1	8,9E-01	DAG	VF
XP_002306120	At4g39170	SEC14 - like protein	1,9	0,9	1,1E-03	SEC14	VF

**Tabelle 3.6: Identifizierte, an Exocytose beteiligte Gene deuten auf granulokrine Sekretion in *Ptt*-Nektarien hin.**

Die Microarray-Daten wurden hinsichtlich Genen untersucht, die nach Zarsky und Kollegen (2009) an exocytotischen Prozessen beteiligt sind. Dabei konnten für die unterschiedlichsten Prozesse bzw. Arten verschiedene Transkripte identifiziert werden. <sup>a</sup> Typ = Proteintyp, Abkürzungen nach Zarsky et al. 2009. <sup>b</sup> Proteinklasse; TGN, trans-Golgi Netzwerk; MVB, multivesicular body (engl. für multivesikuläre Körper); RE, recycelndes Endosom; VF, vesicle formation (engl. für Vesikelbildung). Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

Vier weitere Gene der Klassen RabE/Rab8, RabA und VHA-a1 konnten größtenteils als leicht induziert identifiziert werden und mit dem trans-Golgi Netzwerk (TGN) in Verbindung gebracht werden (Tabelle 3.6). Die meisten Transkripte (neun) konnten jedoch im Zusammenhang mit Vesikelbildung (VF, für engl. vesicle formation) und -transport zur Plasmamembran gefunden werden. So zeigte ein Dynamin-assoziiertes Gen einen Induktionsfaktor von 7,9. Diese Klasse von Proteinen wird als essentiell für eine Abtrennung der Vesikel von Membranen beschrieben (Bashkirov et al., 2008). Ala3-ATPasen, Arf1-GTPasen oder SEC14-ähnlichen Proteine sind dafür bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle bei der grundlegenden Vesikelbildung spielen (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Poulsen et al., 2008; Bankaitis et al., 2010).

Um granulokrine Sekretion in *Ptr* ausschließen zu können und damit die vermutete holokrine Sekretion (siehe Einleitung) zu bekräftigen, wurden die in *Ptt* identifizierten, an einer Exocytose beteiligten Gene mit Hilfe von qPCR in *Ptr* analysiert. Keines der an einer Exocytose beteiligten Gene zeigte eine eindeutige Induktion (Tabelle 3.7). Eine Sekretion basierend auf Vesikeltransport konnte daher ausgeschlossen werden.

Typ <sup>a</sup>	Klasse <sup>b</sup>	FC <i>Ptt</i> Array	FC <i>Ptr</i> qPCR
RabE/Rab8 (1)	TGN	1,4	0,3
RabE/Rab8 (2)	TGN	2,2	0,6
RabA	TGN	1,7	0,5
VHA-a1	TGN	1,9	0,9
SNARE (1)	TGN/MVB	0,5	1,4
SNARE (2)	TGN/MVB	1,3	0,2
PEP12 (1)	MVB	4,0	0,2
PEP12 (2)	MVB	1,8	0,7
RabF (1)	MVB	1,1	0,6
RabF (2)	MVB	1,5	0,9
RabF (3)	MVB	1,1	0,7
SNX1	RE	0,7	0,6
Arf1 (1)	VF	2,0	0,5
Arf1 (2)	VF	1,7	0,5
Dynamamin (1)	VF	7,9	0,6
Dynamamin (2)	VF	1,9	0,7
Ala3 (1)	VF	1,1	0,3
Ala3 (2)	VF	1,8	0,4
Ala3 (3)	VF	2,2	0,3
DAG	VF	1,0	0,6
SEC14	VF	1,9	1,2

**Tabelle 3.7: *Ptr*-EFN-Sekretion erfolgt nicht über Exocytose.**

Die in *Ptt* identifizierten, an Exocytose beteiligten Gene (siehe Tabelle 3.6) wurden durch qPCR-Analysen in *Ptr*- Nektarien bzw. –Blättern untersucht. Keines der Gene war in *Ptr*- EFN induziert. <sup>a</sup> Typ = Proteintyp, Abkürzungen nach Zarsky et al. (2009). <sup>b</sup> Proteinklasse; TGN, trans-Golgi Netzwerk; MVB, multivesicular body (engl. für multivesikuläre Körper); RE, recycelndes Endosom; VF, vesicle formation (engl. für Vesikelbildung). Zusätzliche Tabellenerklärung siehe Seite 76. Tabelle aus Escalante-Pérez et al. 2012a.

### 3.3. Ekkrine Sekretion

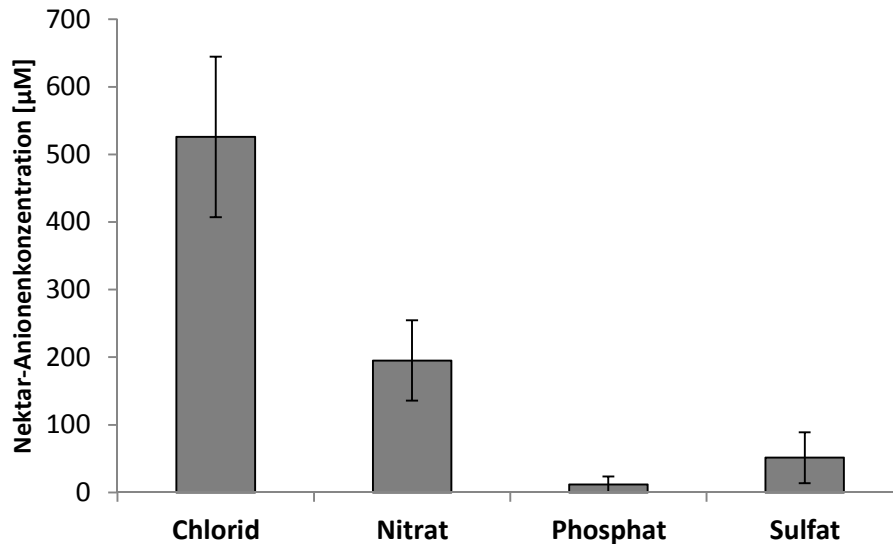
Studien an dem Korblütengewächs *Echinacea purpurea* zeigten, dass deren florale Nektarien sehr wahrscheinlich sowohl granulokrin als auch ekkrin sekretieren, also beide merokrine Sekretionstypen gleichzeitig in einer Pflanze erfolgen können (Wist and Davis, 2006). Eine granulokrine Sekretion in *Ptt*-Nektarien konnte in der vorliegenden Arbeit bereits bestätigt werden. Ob und wie *Ptt*-Nektar auch ekkrin sekretiert werden kann, sollten folgende Untersuchungen zeigen.

### 3.3.1. Voraussetzungen für ekkrine Sekretion

#### 3.3.1.1. Nektar-Anionenzusammensetzung

Für eine ekkrine, kontinuierliche Nektar-Sekretion müssen Nektarien in der Lage sein, ohne Zerstörung von Zellen eine wässrige Lösung außerhalb der Drüsen zu präsentieren. Um Wasser von einem Ort an einen anderen Ort zu „zwingen“, macht sich die Pflanze im Allgemeinen das Wasserpotential zu Nutze. In Nektarien muss dafür entsprechend außerhalb der Drüsenzellen ein höheres osmotisches Potential erzeugt werden, so dass dem osmotischen Gefälle entsprechend Wasser nachfließt. Ionenkanäle mit ihren hohen Transportraten könnten dabei relativ schnell und flexibel osmotisch aktive Substanzen aus den Nektarien-Drüsenzellen transportieren. Der dadurch bedingte Nachstrom von Wasser würde infolge dessen den Transport weiterer Komponenten wie Zucker oder Aminosäuren und schließlich die Komplettierung des Nektars ermöglichen. Solche initialen, durch Ionen gesteuerte Prozesse sind in vielen Bereichen der Pflanzenphysiologie von entscheidender Bedeutung. So leiten z.B. Anionenkanäle in *Arabidopsis thaliana* durch Chlorid, Malat, aber auch Nitrat, die osmotisch geregelte Öffnung bzw. den Schluss der Stomata ein (Geiger et al., 2011). Da die Nektar-Anionenzusammensetzung entscheidende Hinweise auf osmotisch gesteuerte Sekretion in *Ptt*-EFN liefern könnte, wurden erste Nektar-Analysen von María Escalante-Pérez ausgeweitet.

Dabei konnten Chlorid (526  $\mu\text{M}$ ) und Nitrat (195  $\mu\text{M}$ ) als dominierende Nektar-Anionen festgestellt werden (Abbildung 3.8). Sulfat (51  $\mu\text{M}$ ) und Phosphat (12  $\mu\text{M}$ ) spielten eine eher untergeordnete Rolle. Die eindeutige Dominanz von Chlorid und Nitrat deutete deshalb auf eine, durch entsprechende Chlorid bzw. Nitrat transportierende Anionenkanäle initiierte ekkrine Sekretion in *Ptt*-EFN hin.



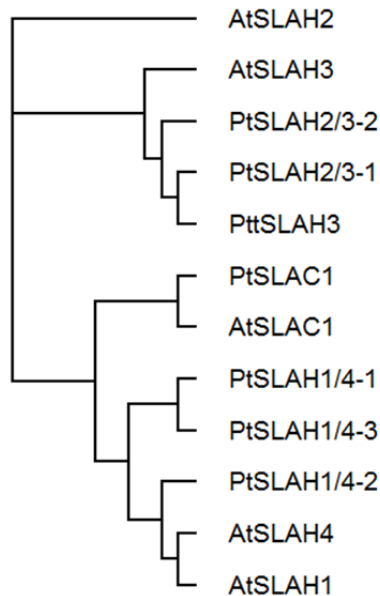
**Abbildung 3.8: Chlorid und Nitrat dominieren die *Ptt*-Nektar Anionenzusammensetzung.**

Die anorganische Anionen-Konzentration von *Ptt*-Nektar wurde durch Ionenchromatographie (durchgeführt von Dr. Judy Simmons, Professur für Baumphysiologie Universität Freiburg) bestimmt. Gezeigt werden Absolutwerte der einzelnen Anionen. Mittelwert  $\pm$  SF,  $n = 5$  *Ptt*-Nektarproben.

### 3.3.1.2. Das Transportprotein

Die gleichen Transportproteine, die in *Arabidopsis* durch den Transport von Chlorid und Nitrat an der Initiierung der Stomataregulierung beteiligt sind, könnten auch für die osmotisch regulierte, ekkrine Sekretion in *Ptt*-EFN verantwortlich sein. In *Arabidopsis* Schließzellen sind dies Vertreter der S-Typ-Anionenkanal-Familie, SLAC (engl. slow activated anion channel) (Geiger et al., 2011). Die Suche nach einem entsprechenden Kandidaten für ekkrine Sekretion wurde deshalb auf die Familie der SLAC-Orthologen in Pappel eingegrenzt.

Analysen des *Populus trichocarpa* Genoms ergaben dabei sechs mögliche Kandidaten-Sequenzen, die homolog zu unterschiedlichen Mitgliedern der *Arabidopsis*-SLAC-Familie waren. Eine dieser Sequenzen zeigte hohe Homologie zu SLAC1 (PtSLAC1), zwei zu SLAH2 bzw. SLAH3 (PtSLAH2/3 1 und 2) und drei zu SLAH1 bzw. SLAH4 (PtSLAH1/4 1 bis 3) (Abbildung 3.9). Daraufhin wurden unter Zuhilfenahme der *Ptt*-Microarray-Daten alle Pappel-SLAC-Kandidaten hinsichtlich ihrer Expression in *Ptt*-EFN/Blatt untersucht. Nur PtSLAH2/3-1 (aus zwei cDNA Fragmenten kombinierte Sequenz, siehe Anhang 7.6) zeigte dabei eine leichte Induktion in extrafloralen Nektarien (1,5 bzw. 1,2fach). Alle anderen Transkripte waren entweder nicht reguliert oder sogar leicht reprimiert in EFN (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf PtSLAH2/3-1.



**Abbildung 3.9: Kladogramm aller SLAC-Homologen aus Arabidopsis und Pappel.**

Das hier gezeigte Kladogramm verdeutlicht die nicht gewichteten Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Arabidopsis-SLAC1 (AtSLAC1), seinen vier Homologen (SLAHs, engl. slow activated anion channel homologs) und den sechs orthologen Teilsequenzen aus Pappel. Die Analyse der Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten ergab eine zu AtSLAC1 homologe (PtSLAC1), zwei nicht eindeutig AtSLAH2 oder AtSLAH3 zuzuordnende homologe (PtSLAH2/3-1; PtSLAH2/3-2) und drei nicht eindeutig AtSLAH1 oder AtSLAH4 zuzuordnende homologe Teilsequenzen (PtSLAH1/4-1, PtSLAH1/4-2; PtSLAH1/4-3). PtSLAH2/3-1 wurde verwendet um den orthologen Kanal von *Ptt* zu klonieren, der daraufhin als PttSLAH3 bezeichnet wurde. PtSLAC1 = gw1.I.9288.1; PtSLAH2/3-1 = eugene3.01220013 + eugene3.01220012, siehe auch 7.6; PtSLAH2/3-2 = grail3.0031008101; PtSLAH1/4-1 = gw1.II.2771.1; PtSLAH1/4-2 = gw1.XI.1349.1; PtSLAH1/4-3 = gw1.X.1168.1; gw1.I.9288.1 etc. entsprechen den Pappel-Identifikationsnummern der einzelnen Teilsequenzen in der Pappeldatenbank JGI (engl. Joint Genome Institute, [http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Poptr1\\_1](http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Poptr1_1)); At = *Arabidopsis thaliana*; Pt = *Populus trichocarpa*, Ptt = *Populus tremula* x *P. tremuloides*.

### 3.3.2. PttSLAH3

#### 3.3.2.1. Identifizierung und Sequenzcharakterisierung

Da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen zwar das gesamte Genom von *Populus trichocarpa* sequenziert, aber noch nicht vollständig annotiert war und darüber hinaus die N- und C-Termini der SLAC/SLAH-Kanäle generell erhebliche Divergenz aufweisen, konnte für die Klonierung keine eindeutig vollständige kodierende Sequenz (CDS, engl. coding sequence, für kodierende Sequenz) für PtSLAH2/3-1 identifiziert werden. Da Start- sowie Stopp-Codon auch nach Analyse der Datenbank „JGI“ (engl. Joint Genome Institute) und entsprechenden Chromosomensequenzen (scaffold 122) nicht zugeordnet werden konnten, musste die CDS mit Hilfe der SMART-RACE-Technik vervollständigt werden.

Dabei konnten sowohl Start- als auch Stopp-Codon und somit die 1701 Basenpaar lange CDS des *Ptt*-Kanals bestimmt werden. Ein Vergleich der Proteinsequenz mit allen anderen SLAC/SLAH-Kanälen bestätigte, dass es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um den SLAH3-Kanal aus *Ptt* handelt (Abbildung 3.9). Außerdem konnte im Vergleich mit AtSLAH3 gezeigt werden, dass eine sehr hohe Homologie im mittleren Bereich und weniger homologe N- und C-Termini bestehen (Abbildung 3.10).

AtSLAH3	1	MEEKPNYVIQVEEELPTLLRKATTE	MVGF	DN	YK	NG	HP	PF	H	S	S	R	F	H	P	S	H	A	S	T	T	T	L	N	G	Q																																		
PttSLAH3	1	-----	MG	S	D	T	A	F	E	N	Q	T	E	S	Q	--	E	L	H	L	O	R	K	H	S	V	Y	I	S	L	P	P	C	P	L	A																								
AtSLAH3	61	E	T	S	R	S	I	D	T	M	E	A	H	H	N	Y	N	E	T	T	P	W	T	H	Q	R	K	P	S	I	S	M	P	T	S	P	N	V	L	M	I	S	D	P	T	H	S	L	S	S	E	N	H	K	N	S	G	S	T	G
PttSLAH3	37	E	S	K	K	A	E	K	V	L	F	K	E	D	-----	G	E	K	T	F	V	Y	G	N	D	S	S	A	A	S	---	K	I	V	D	T	P	P																						
AtSLAH3	121	K	S	V	K	F	L	S	Q	P	M	T	K	V	S	S	L	V	I	E	S	G	N	G	D	D	R	R	Q	S	H	D	N	H	H	H	L	H	R	Q	H	S	G	H	E	N	O	N	O	A	A	N	K	L	K	D	N			
PttSLAH3	74	K	O	V	K	E	H	P	Q	P	M	A	K	G	T	A	A	E	V	A	L	D	V	P	N	-----	H	P	N	H	P	S	L	K	L	K	D	K																						
<b>potentielle Phosphorylierungsstellen <i>A.th.</i></b>																																																												
AtSLAH3	181	R	Y	S	F	K	T	A	S	G	K	L	E	R	Q	T	R	K	P	A	S	V	E	P	E	A	P	N	N	N	Q	N	L	N	T	N	E	A	M	P	V	D	R	Y	D	A	L	E	G	P	E	L	T	L	R	P				
PttSLAH3	113	R	Y	S	F	K	T	A	S	G	K	L	E	R	Q	T	N	L	R	V	R	P	R	E	D	S	T	E	K	T	A	G	A	K	A	E	K	D	A	L	P	V	D	R	Y	D	A	L	E	G	P	E	L	T	L	R	P			
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p>N-Terminus</p> <p>←</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>TR</p> <p>→</p> </div> </div>																																																												
AtSLAH3	241	Q	E	I	V	L	P	N	D	K	K	W	P	F	L	R	Y	P	I	S	T	F	G	M	C	L	G	V	S	S	Q	A	I	M	W	K	T	L	A	T	A	E	P	T	K	F	L	H	V	P	L	W	I	N	O	G	L	W	F	
PttSLAH3	173	S	E	I	V	L	P	D	S	T	W	P	F	L	R	F	P	I	S	S	F	G	I	C	L	G	V	S	S	Q	A	I	M	W	K	T	L	A	T	S	A	S	T	K	F	L	H	S	D	V	N	L	V	L	W	C				
AtSLAH3	301	I	S	V	A	L	L	T	I	A	T	I	Y	L	L	K	I	L	L	F	E	A	V	R	R	E	Y	H	P	I	R	N	N	F	F	A	P	I	S	L	L	F	L	A	L	G	V	P	P	S	I	T	D	L	P					
PttSLAH3	233	I	A	V	A	L	V	V	I	T	G	S	I	Y	L	L	K	M	I	L	F	E	A	V	R	R	E	Y	C	H	P	I	R	N	N	F	F	A	P	I	A	L	L	F	L	A	L	G	V	P	P	S	A	E	D	L	H			
AtSLAH3	361	H	F	L	W	V	L	M	S	P	F	L	E	L	K	I	Y	Q	W	M	S	G	Q	R	L	S	R	V	A	N	P	T	N	H	L	S	V	V	G	N	F	V	G	A	L	L	G	A	S	M	G	L	R	E	G					
PttSLAH3	293	A	A	L	W	V	L	M	S	P	F	L	E	L	K	I	Y	Q	W	M	S	G	Q	R	L	S	K	V	A	N	P	T	N	H	L	S	V	V	G	N	F	V	G	A	L	L	G	A	S	M	G	L	R	E	G					
AtSLAH3	421	P	I	F	F	A	V	G	A	H	Y	V	L	F	V	T	L	Y	Q	R	L	P	T	N	C	H	I	P	K	D	L	H	P	V	F	L	F	V	A	A	P	S	V	A	S	M	A	W	A	K	I	T	G	S	F	D	Y			
PttSLAH3	353	P	I	F	F	A	V	G	A	H	Y	V	L	F	V	T	L	Y	Q	R	L	P	T	N	C	H	I	P	K	D	L	H	P	V	F	L	F	V	A	A	P	S	V	A	S	M	A	W	A	K	I	T	G	S	F	D	Y			
AtSLAH3	481	G	S	K	V	C	V	F	T	A	F	L	Y	F	S	L	A	V	R	N	F	F	R	G	E	K	F	S	L	S	W	W	A	Y	T	F	P	M	T	G	A	A	I	A	T	I	R	Y	A	T	V	W	K	S	T	M	T	Q	L	
PttSLAH3	413	G	S	R	I	P	Y	F	T	A	F	L	Y	F	S	L	A	V	R	N	F	F	R	G	E	K	F	S	L	S	W	W	A	Y	T	F	P	M	T	G	A	A	I	A	T	I	R	Y	S	N	E	V	T	N	V	T	Q	V		
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p>TR</p> <p>←</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>C-Terminus</p> <p>→</p> </div> </div>																																																												
AtSLAH3	541	M	C	V	L	C	A	T	A	T	L	V	F	F	A	L	V	T	I	H	A	F	V	L	R	D	L	F	P	N	D	A	I	A	I	S	N	R	P	R	P	K	O	N	S	O	H	R	W	L	D	Q	L	R	N	V				
PttSLAH3	473	L	A	V	I	F	S	A	V	S	T	L	T	V	S	A	L	L	V	S	T	I	H	A	F	V	L	R	D	L	F	P	N	D	A	I	A	I	S	N	R	K	P	R	O	H	H	O	R	K	W	F	D	L	R	R	G			
AtSLAH3	601	S	S	E	N	-	I	E	N	L	K	F	T	D	S	S	S	Q	S	N	D	V	E	A	C	N	G	K	-	Q	E	S	D	S	S	-																								
PttSLAH3	532	S	D	E	K	E	T	E	H	V	L	K	F	T	N	S	D	G	K	D	I	E	S	S	L	H	P	T	T	S	-	S	D	S	S	H	-																							

**Abbildung 3.10: Vergleich von Arabidopsis- und Pappel-SLAH3.**

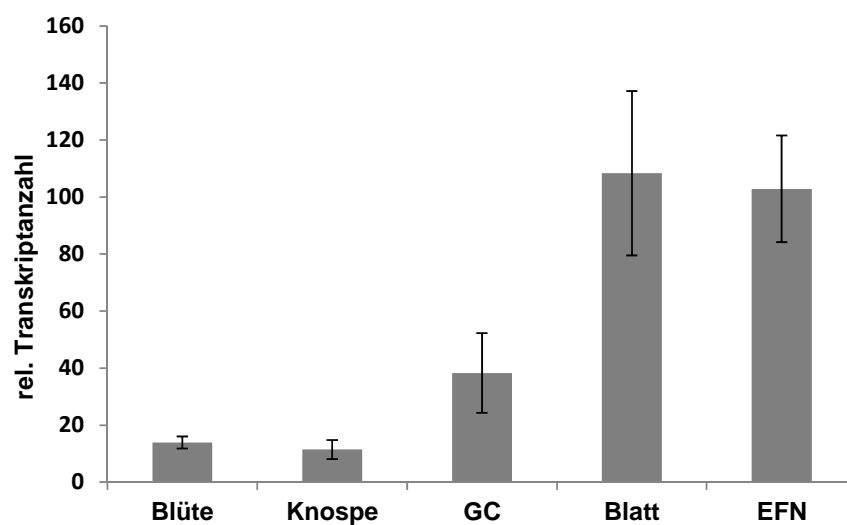
Die Aminosäuresequenzen von PttSLAH3 und AtSLAH3 wurden mit den Programmen CLUSTALW und BOXSHADE 3.21 verglichen. Es zeigte sich eine hohe Homologie im transmembranen Bereich (TR) und weniger homologe N- bzw. C-Termini. In einem relativ hoch konservierten Bereich des PttSLAH3-N-Terminus konnten dieselben vier potentiellen Phosphorylierungsstellen (rote Kästchen) identifiziert werden wie in AtSLAH3. Die strukturellen Charakteristika von AtSLAH3 wurden übernommen von Geiger et al. 2011. (CLUSTALW = <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>; BOXSHADE = [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

Durch bereits vorhandene Strukturanalysen von AtSLAH3 (Geiger et al., 2011) konnte dieser mittlere sehr homologe Bereich der transmembranen Region zugeordnet werden. Interessanter Weise konnte aber auch im eher weniger homologen N-Terminus ein sehr konservierter Bereich exakt dort gefunden werden, wo für die Aktivierung des Arabidopsis-Kanal entscheidende Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten. In Abschnitt 3.3.2.3.7 soll auf diese Tatsache noch genauer eingegangen werden.

All diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die identifizierte Gensequenz dem SLAH3-Anionenkanal in *Populus tremula* x *P. tremuloides* entspricht (PttSLAH3, siehe auch Anhang 7.6), und dass sich beide Kanäle (AtSLAH3 und PttSLAH3) in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften stark ähneln.

### 3.3.2.2. Lokalisierung von PttSLAH3 in *Populus tremula* x *P. tremuloides*

Ob PttSLAH3 überhaupt als Initiator der ekkrinen Nektar-Sekretion in extrafloralen Nektarien in Frage kam, sollte die Lokalisation des Proteins in den speziellen Drüsenzellen klären. Zu allererst und um die allgemeine Bedeutung von PttSLAH3 in der Pappel einordnen zu können, wurden verschiedenen Pappelgewebe mit Hilfe der qPCR analysiert. Dabei konnte die durch Microarray-Daten erwartete schwache Induktion in extrafloralen Nektarien nicht vollständig bestätigt werden. Jedoch zeigte keines der anderen getesteten Gewebe (Blüte, Knospe oder Schließzellen) eine ähnlich starke PttSLAH3-Expression wie EFN und Blatt (Abbildung 3.11).



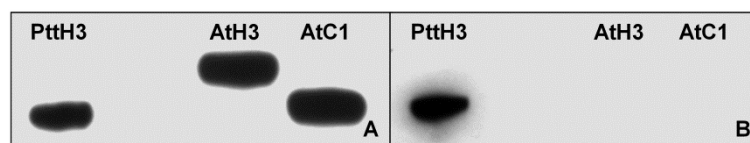
**Abbildung 3.11: PttSLAH3-Expression in verschiedenen Pappelgeweben.**

Durch qPCR mit PttSLAH3-spezifischen Primern konnte dieser hauptsächlich in extrafloralen Nektarien und im Blatt nachgewiesen werden. Schließzellen zeigten eine geringere Expression, in Blüten und Knospen war der Kanal kaum nachweisbar. GC = guard cell, engl. für Schließzelle ( $n \geq 3$ , Mittelwert  $\pm$  SF).



Während PttSLAH3 in Pappel-Blüten und -Knospen kaum eine Rolle zu spielen scheint, konnte in Schließzellen eine leicht erhöhte Expression festgestellt werden. Das Verhältnis PttSLAH3 von Blatt zu Schließzellen ähnelte dabei dem in Arabidopsis festgestellten (Geiger et al., 2011). Die starke Expression in extrafloralen Nektarien bestätigte aber auch die Vermutung, dass dem Anionenkanal dort eine große Bedeutung zukommt.

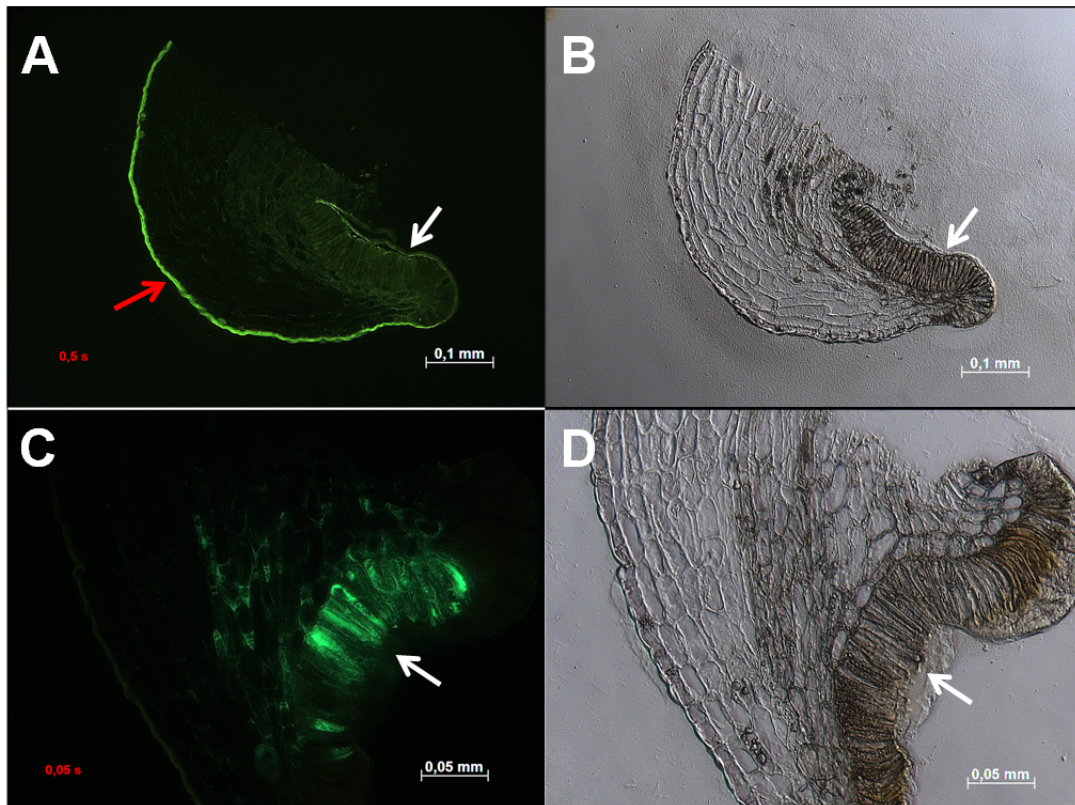
Um den Kanal *in situ* lokalisieren zu können, wurden Immunlokalisationsstudien mit einem PttSLAH3-spezifischem Antikörper durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass sich in der gesamten SLAC/SLAH-Familie die N-Termini am stärksten unterscheiden und um eventuelle Kreuzreaktionen mit anderen Anionenkanälen der Pappel-SLAC/SLAH-Familie ausschließen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die ersten 17 Aminosäuren von PttSLAH3 hergestellt und verwendet. Spezifitätstest mit in *E. coli* heterolog exprimierten PttSLAH3-, AtSLAH3- und AtSLAC1-N-Termini (AtSLAH3- und AtSLAC1-N-Terminus wurden bereitgestellt von Dr. Sönke Scherzer, AG Dietmar Geiger, J-v-S-Institut) zeigten, dass der Antikörper spezifisch an den Pappel-N-Terminus bindet (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12: PttSLAH3-Antikörper Spezifität.**

Über einen Western Blot aufgetrennte und auf eine Membran transferierte N-Termini von PttSLAH3 (PttH3), AtSLAH3 (AtH3) und AtSLAC1 (AtC1) wurden entweder mit His- oder PttSLAH3 spezifischem Antikörper markiert. (A) Die Inkubation mit His-spezifischem Antikörper zeigte für alle drei Proteine die erwarteten Signale. (B) Der spezifische PttSLAH3-Antikörper dagegen markierte nur den Pappel-SLAH3-N-Terminus.

*In situ* Immunlokalisationsstudien (durchgeführt von Dr. Andrea Olbrich, Zentrum für Holzwirtschaft, Universität Hamburg) zeigten vorwiegende Lokalisation von PttSLAH3 in sekretorischen Drüsenzellen der extrafloralen Nektarien (Abbildung 3.13 C). Die Analyse von unbehandelten Nektarien zeigte erst bei sehr langer Anregung schwache Autofluoreszenz der Kutikula. Dieser Befund belegte nicht nur das sehr starke Signal des spezifischen Antikörpers, der bereits bei kurzen Belichtungszeiten so stark fluoreszierte, dass die Kutikula nicht sichtbar war, sondern zeigte auch, dass sich direkt vor den sekretierenden Drüsenzellen keine Kutikula befand (Abbildung 3.13 A).



**Abbildung 3.13: *In situ* Immunlokalisation belegt die vorwiegende Expression von PttSLAH3 in den sekretorischen Drüsenzellen von *Ptt*-EFN.**

Für die Markierung von PttSLAH3 *in situ* wurden Längsschnitte von *Ptt* extrafloralen Nektarien immunhistologisch untersucht. (A) zeigt die Kontrolle ohne PttSLAH3-spezifischen Antikörper mit der Autofluoreszenz der Nektarienkutikula (roter Pfeil) nach einer Belichtung von 0,5 s. Vor den sekretierenden Drüsenzellen befindet sich keine Kutikula (weißer Pfeil). (B) ist die entsprechende lichtmikroskopische Aufnahme zu (A). (C) Die Immunmarkierung mit PttSLAH3-spezifischem Antikörper zeigte starke PttSLAH3-Immunfluoreszenz vorwiegend in der sekretorischen Zellschicht der Nektarie (weißer Pfeil) bereits nach einer Belichtungszeit von 0,05 s. (D) zeigt die entsprechende lichtmikroskopische Aufnahme zu (C). Aufnahmen von Andrea Olbrich, Zentrum für Holzwirtschaft, Universität Hamburg).

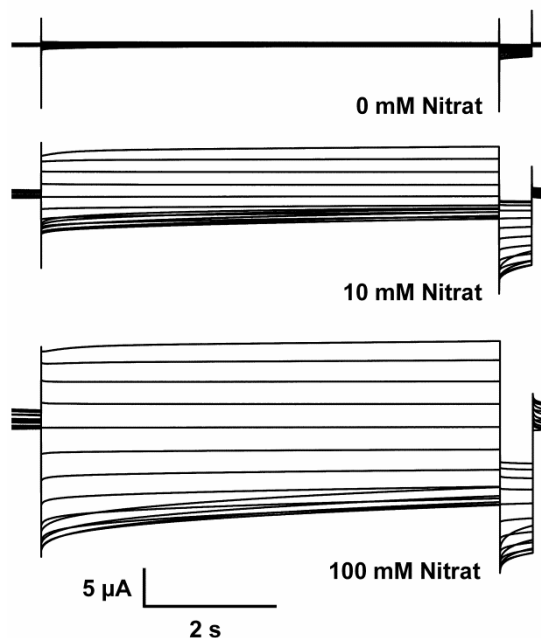
Um nun der Hypothese nachzugehen, dass PttSLAH3 als Initiator einer ekkrinen Sekretion in *Ptt* in Frage kommt, wurde im nächsten Schritt die Funktion von PttSLAH3 mit der des AtSLAH3 verglichen.

### 3.3.2.3. Elektrophysiologische Charakterisierung

Für eine genaue Analyse von PttSLAH3 und einen Vergleich mit dem Arabidopsis-Ortholog wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Entsprechende cRNAs wurden dazu in *Xenopus* Oozyten injiziert (2.6.2) und mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (DEVC) elektrophysiologisch charakterisiert.

### 3.3.2.3.1. Kanalaktivierung

Für Arabidopsis-SLAH3 ist bekannt, dass die Aktivität des Kanals abhängig von der Verfügbarkeit von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) auf der extrazellulären Seite der Membran und einer zusätzlichen Phosphorylierung durch Calcium-abhängige Kinasen ist (Geiger et al., 2011). Im Gegensatz zu AtSLAH3 zeigte PttSLAH3 aber bereits ohne eine koexprimierte Kinase makroskopische Anionenströme in Anwesenheit von Nitrat in der Badlösung (Abbildung 3.14). Bei niedrigen Nitratkonzentrationen im physiologischen Bereich konnte außerdem eine für S-Typ-Anionenkanäle typische langsame Deaktivierung der Anionenausströme bei negativen Membranpotentialen festgestellt werden (Abbildung 3.14, 10 mM).



#### **Abbildung 3.14: Nitrat-abhängige Aktivierung von PttSLAH3.**

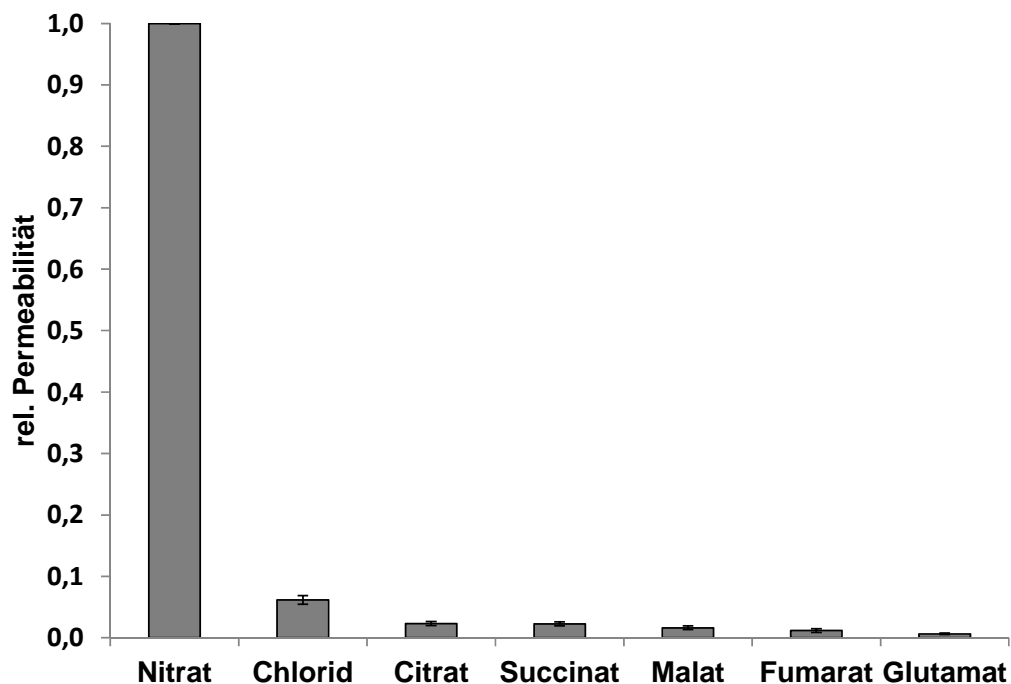
Die Abbildung zeigt Anionenströme gemessen über die gesamte Oozytenmembran, unter Verwendung von Standard-Messlösungen ohne (0 mM), mit 10 mM und mit 100 mM Nitrat und dem Standardpulsprotokoll. Erst nach externer Zugabe von Nitrat zeigte PttSLAH3 makroskopische, Konzentrations-abhängige S-Typ-Anionenströme. Bei niedrigen Nitratkonzentrationen im physiologischen Bereich (10 mM) ist bei stark negativen Membranpotentialen eine fast komplette Deaktivierung erkennbar. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Oozyte.

Abgesehen von der Phosphorylierungs-unabhängigen Aktivierung zeigte PttSLAH3 dieselben Nitrat-abhängigen Stromantworten wie AtSLAH3. Daraufhin wurde untersucht in welchen anderen elektrophysiologischen Eigenschaften beide Kanäle übereinstimmen bzw. wo sie sich unterscheiden.

### 3.3.2.3.2. Selektivität und Permeabilität

Es konnte gezeigt werden, dass AtSLAH3 eine 20fach höhere Permeabilität für Nitrat im Vergleich zu Chlorid (Cl<sup>-</sup>) besitzt (Geiger et al., 2011). Für die Untersuchung der Anionenpermeabilität von PttSLAH3 wurden deshalb Anionen unterschiedlichster Spezifität in der externen Badlösung verwendet und die Umkehrpotentiale ( $U_{rev}$ ) im Stromklemmenmodus des Messverstärkers aufgezeichnet (siehe auch 2.6.4.4.1).  $U_{rev}$  entspricht derjenigen Spannung, bei der kein Netto-Strom über die Oozytenmembran fließt. Mit den ermittelten  $U_{rev}$  und einer umgestellten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (2.6.4.4.2) konnte daraufhin die relative Permeabilität von PttSLAH3 für unterschiedliche Anionen relativ zu Nitrat bestimmt werden.

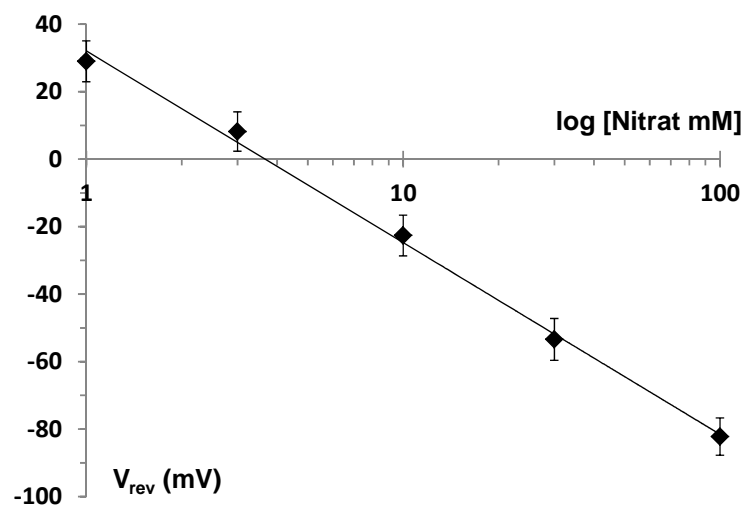
Ähnlich wie bei AtSLAH3 konnte für den Pappel-Kanal eine 17fach höhere relative Permeabilität für Nitrat (20fach Arabidopsis) im Vergleich zu Chlorid berechnet werden (Abbildung 3.15). Alle anderen getesteten Anionen wie Citrat, Succinat, Malat, Fumarat und Glutamat wurden nicht von PttSLAH3 transportiert.



**Abbildung 3.15: Nitrat-Selektivität von PttSLAH3.**

Die berechneten relativen Permeabilitätswerte resultierten aus den aufgezeichneten Umkehrpotentialen für unterschiedliche Anionen in Relation zu Nitrat (Nitrat = 1). PttSLAH3 zeigte dabei die höchste Präferenz für Nitrat gefolgt von einer deutlich schwächeren Leitfähigkeit für Chlorid. Es wurden Standardlösungen mit variierender Anionenspezies (50 mM) verwendet. (n = 5, Mittelwert ± SA).

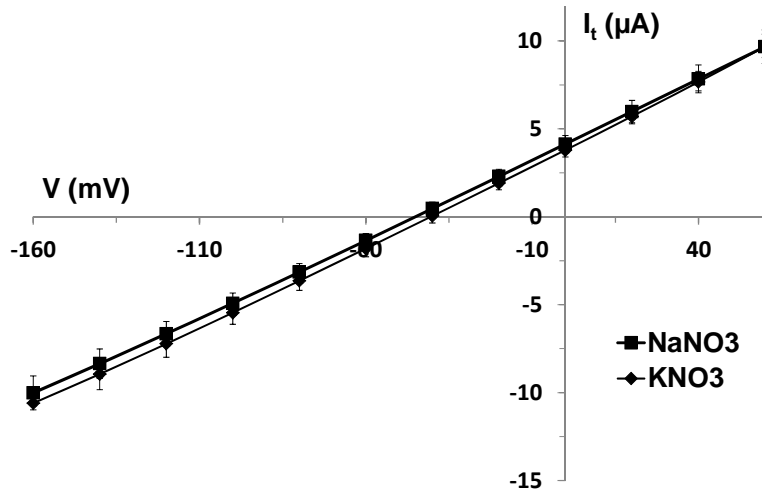
Für eine genauere Betrachtung der Nitratpermeabilität des Kanals wurden zusätzliche Messungen mit verschiedenen konzentrierten  $\text{NO}_3^-$  Badlösungen (1, 3, 10, 30 und 100 mM) durchgeführt. Wie man es für einen Anionen-selektiven Kanal erwartet, führte eine Erhöhung der externen Nitratkonzentration zur Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Membranspannungen (Abbildung 3.16). Außerdem konnte ähnlich wie für AtSLAH3 bei einer 10fachen Konzentrationsveränderung eine Veränderung des Umkehrpotentials von 57 mV festgestellt werden, was für einwertige Anionen der theoretischen Berechnung durch die Nernst-Gleichung (bei Standardbedingungen) sehr nahe kommt.



**Abbildung 3.16: Nitratpermeabilität mit annähernd Nernst'schem Verhalten.**

Die Umkehrspannungen wurden in Standardlösungen mit unterschiedlichen Nitratkonzentrationen (1, 3, 10, 30 und 100 mM) bestimmt und gegen die logarithmische Nitratkonzentration aufgetragen. Eine Nitraterhöhung in der externen Badlösung verschob das Umkehrpotential zu negativeren Membranpotentialen. Eine 10fache Veränderung der Konzentration führte zu einer Verschiebung von 57 mV. ( $n = 5$ , Mittelwert  $\pm$  SF).

PttSLAH3 zeigte demnach eine sehr ähnliche Anionenpermeabilität wie AtSLAH3. Im Gegensatz zur strikten Anionenabhängigkeit wies der Arabidopsis-Kanal keine Abhängigkeit von der Natur des Kations in der Badkammer auf. Um dies auch für den Pappel-Orthologen zu prüfen, wurde die externe 100 mM Natriumnitrat Standardbadlösung durch eine 100 mM Kaliumnitrat Standardlösung ausgetauscht. Der Vergleich der aufgezeichneten instantanen Ströme ( $I_t$ ) zeigte keine eindeutige Veränderung der Nitrat-induzierten makroskopischen PttSLAH3 Ströme (Abbildung 3.17). Der Pappel-Kanal scheint also wie AtSLAH3 unbeeinflusst von der Art des Kations in der Badlösung.



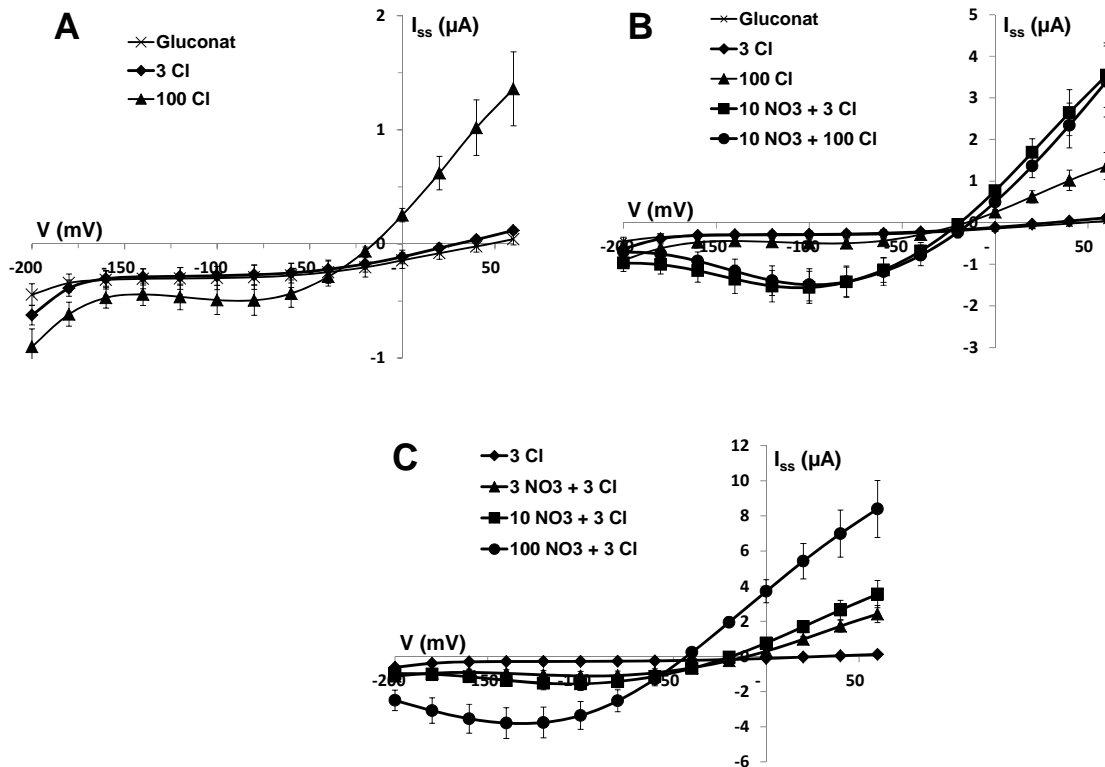
**Abbildung 3.17: Kationen-Unabhängigkeit.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden als Antwort auf Spannungssprünge (Standardpulsprotokoll) aufgezeichnet und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Die Experimente wurden mit 100 mM Natrium- bzw. Kaliumnitrat-haltigen Standardlösungen durchgeführt. ( $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  SA).

### 3.3.2.3.3. Genauere Betrachtung der externen Anionen-abhängigen Aktivierung

Da externes Nitrat entscheidend für die Aktivierung von PttSLAH3 ist, der Pappel-Kanal neben der hohen Nitrat- auch eine schwache Chlorid-Leitfähigkeit aufwies, sollte genauer untersucht werden, welche Rolle diese beiden Anionen für die Aktivität, Aktivierung bzw. Permeabilität des Kanals spielen. Dafür wurden Messungen mit unterschiedlichen Kombinationen von Nitrat bzw. Chlorid-Konzentrationen durchgeführt und die daraus resultierenden Kanalströme aufgezeichnet (Abbildung 3.18). Dabei konnte festgestellt werden, dass allein eine hohe, nicht mehr physiologische externe  $\text{Cl}^-$  Konzentration (100 mM) ausreichte, um einen schwachen Anionen-Einstrom und einen sehr geringen Ausstrom zu vermitteln. Außerdem führte eine Veränderung der externen Chlorid-Konzentration von 3 mM (keine Stromantwort) auf 100 mM zu einer leichten Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Membranspannungen (Abbildung 3.18 A). Der Kanal zeigte also auch ohne vorherige Nitrataktivierung bei entsprechend hoher Chlorid-Konzentration eine geringe Permeabilität für Chlorid, was die Analysen zur Anionenselektivität bestätigte (siehe 3.3.2.2). Die Anwesenheit wesentlich geringerer Konzentrationen externen Nitrats (hier gezeigt für 10 mM) hatte dagegen im Vergleich zu 100 mM Chlorid eine deutlich stärkere Stromantwort zur Folge, was sich besonders in einem höheren Anionen-Ausstrom bemerkbar machte. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass eine Veränderung der  $\text{Cl}^-$  Konzentration (von 3 mM auf 100 mM) in Anwesenheit von Nitrat weder einen Einfluss auf die gemessene Stromstärke noch auf das

Umkehrpotential hatte (Abbildung 3.18 B). Die in Nitrat-freien Medien eindeutig sichtbare Permeabilität von  $\text{Cl}^-$  hatte folglich in Anwesenheit von Nitrat keinen entscheidenden Einfluss mehr auf das Umkehrpotential. Eine stetige Erhöhung der Nitratkonzentration resultierte jedoch wie bereits erwähnt (siehe 3.3.2.3.1) in einer stärkeren Aktivierung des Kanals und verschob das Umkehrpotential zu negativeren Membranspannungen (Abbildung 3.18 C).

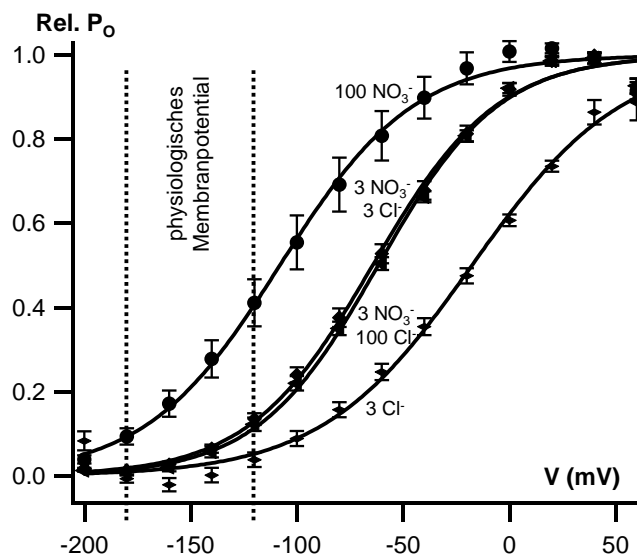


**Abbildung 3.18: Chlorid-, Nitrat- und Spannungsabhängigkeit von PttSLAH3.**

Zur Bestimmung der Aktivierung von PttSLAH3 durch Nitrat und der Permeabilität des Kanals für Chlorid wurden die Oozyten mit unterschiedlichen Kombinationen von  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$  perfundiert. Die Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ ), die mit dem Standardpulsprotokoll aufgenommen wurden, sind als Funktion der applizierten Spannung aufgetragen. (A) Die Erhöhung der  $\text{Cl}^-$  Konzentration führte zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Membranpotentialen. Die Anionen-Ein- bzw. Ausströme waren dabei relativ gering. (B) Die Anwesenheit von Nitrat (hier für 10 mM gezeigt) führte zu gesteigerter Kanalaktivität. Eine Erhöhung der  $\text{Cl}^-$  Konzentration hatte dagegen keinen Einfluss auf die Verschiebung des Umkehrpotentials ( $U_{rev}$ ) bzw. die Aktivität des Kanals. (C) Die Erhöhung der Nitratkonzentration führte zu einer stetig ansteigenden Aktivität und einer Verschiebung des  $U_{rev}$  zu negativeren, physiologischen Membranspannungen. 3 Cl = 3 mM Chlorid; 100 Cl = 100 mM Chlorid; 3  $\text{NO}_3$  = 3 mM Nitrat; 10  $\text{NO}_3$  = 10 mM Nitrat und 100  $\text{NO}_3$  = 100 mM Nitrat. ( $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  SA).

Die Betrachtung der relativen Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_O$ ) des Kanals bestätigte diese Erkenntnisse (Abbildung 3.19). Während in einer Nitrat-freien externen Umgebung (3 mM  $\text{Cl}^-$ ) die spannungsabhängige Aktivierung von PttSLAH3 zu depolarisierenden

Membranpotentialen verschoben war, resultierte bereits eine geringe Zugabe von Nitrat (3 mM) in einer Verschiebung der Aktivierungsschwelle zu negativeren, physiologischen Membranpotentialen. Die halb-maximale Aktivierungsspannung ( $U_{1/2}$ ) wurde dabei von  $-23 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$  (3 mM  $\text{Cl}^-$ ) auf  $-59 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$  (3 mM  $\text{NO}_3^- + 3 \text{ mM Cl}^-$ ) verschoben. Eine Chlorid-Konzentrationsveränderung hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die relative Offenwahrscheinlichkeit und damit auch nicht auf die Kanalaktivität ( $U_{1/2}$  3 mM  $\text{NO}_3^- + 3 \text{ mM Cl}^- = -59 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ ;  $U_{1/2}$  3 mM  $\text{NO}_3^- + 100 \text{ mM Cl}^- = -55 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$ ). Nur eine Steigerung der Nitratkonzentration (hier für 100 mM Nitrat gezeigt) resultierte in einer noch stärkeren Verschiebung der rel.  $P_o$  zu physiologischen Membranspannungen ( $U_{1/2}$  100 mM  $\text{NO}_3^- = -113 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ ).



**Abbildung 3.19: Relative Offenwahrscheinlichkeit (rel.  $P_o$ ) von PttSLAH3.**

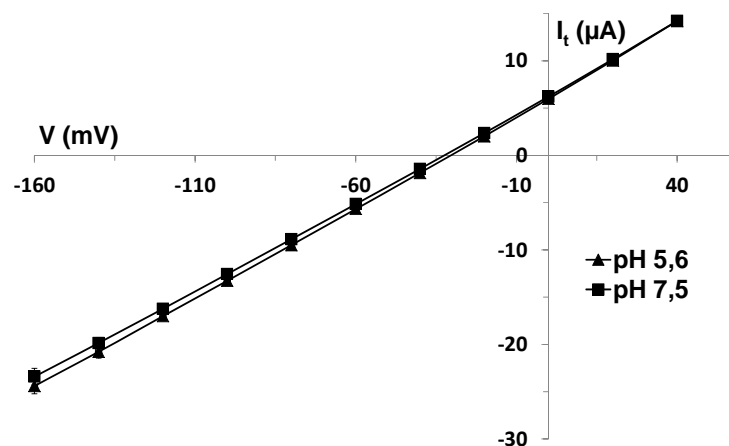
Die relative Offenwahrscheinlichkeit des Kanals wurde unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Medien wie in Abbildung 3.18 ermittelt. Dazu wurden die instantanen Folgepulsströme ( $I_{\text{tail}}$ ) bei  $-120 \text{ mV}$  aufgezeichnet und mit einer Boltzmann-Gleichung gefittet. Die rel. Offenwahrscheinlichkeit wurde auf die maximale Stromamplitude normiert, die durch den Boltzmann-Fit der Daten jeder einzelnen Zelle erhalten wurde. Eine Nitratkonzentrationserhöhung verschob die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals zu physiologischen Membranpotentialen, während eine  $\text{Cl}^-$  Konzentrationsveränderung in Anwesenheit von Nitrat keinen Einfluss auf die relative Offenwahrscheinlichkeit hatte.  $100 \text{ NO}_3^- = 100 \text{ mM Nitrat}$ ;  $3 \text{ NO}_3^- 3 \text{ Cl}^- = 3 \text{ mM Nitrat} + 3 \text{ mM Chlorid}$ ;  $3 \text{ NO}_3^- 100 \text{ Cl}^- = 3 \text{ mM Nitrat} + 100 \text{ mM Chlorid}$ ;  $3 \text{ Cl}^- = 3 \text{ mM Chlorid}$ . ( $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  SF).

#### 3.3.2.3.4. Zytosolische Acidifizierung aktiviert PttSLAH3

Mae1, ein aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammendes, der SLAC/SLAH-Familie in Arabidopsis nahe verwandtes Protein (Negi et al., 2008) wurde als Protonen-gekoppelter Malattransporter charakterisiert (Camarasa et al., 2001). Um auszuschließen, dass



PttSLAH3 ebenfalls durch einen Protonengradienten angetrieben wird, wurde die Aktivität des Pappel-Kanals auf pH-Abhängigkeit hin untersucht. Eine Veränderung der externen Protonenkonzentration durch die Verwendung zweier verschiedener Standard Nitrat-Badlösungen (pH 5,6 bzw. pH 7,5) hatte dabei, wie beim Arabidopsis-Ortholog, keinen Einfluss auf die Kanalaktivität und das Umkehrpotential (Abbildung 3.20). Es ist also keine Permeabilität für Protonen oder eine Energetisierung des Anionentransports durch  $H^+$  erkennbar.

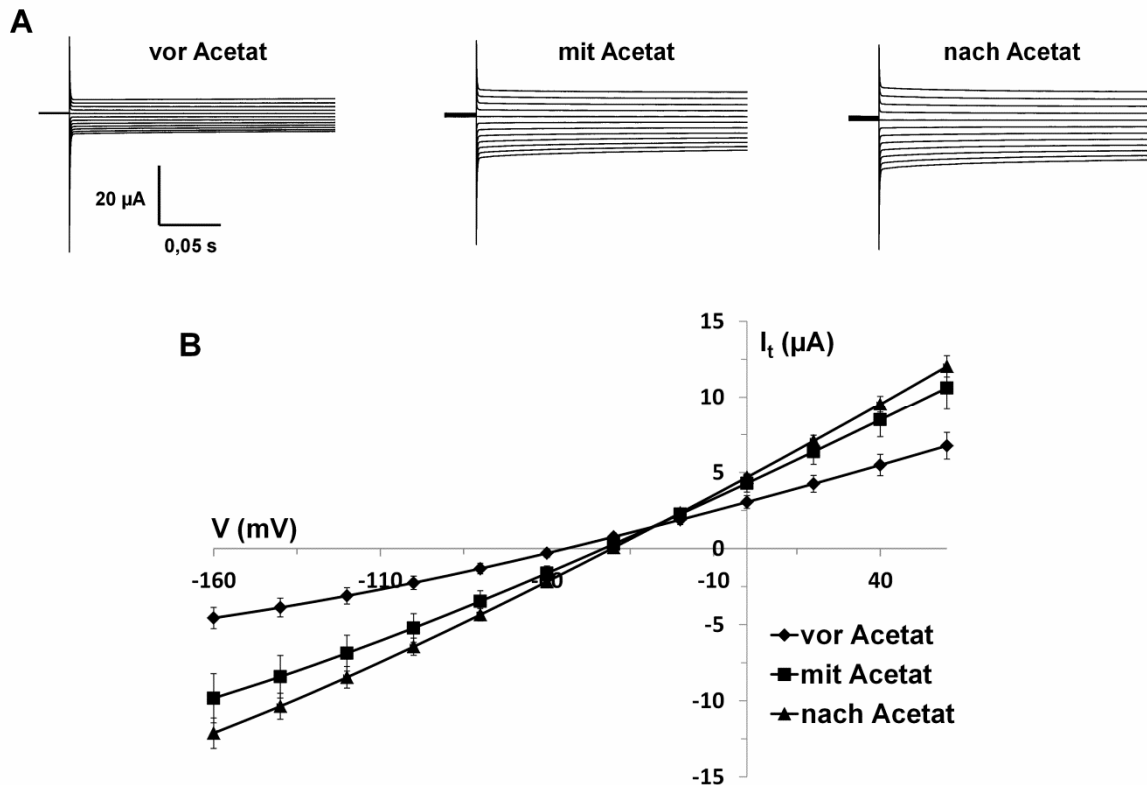


**Abbildung 3.20: PttSLAH3-Aktivität und -Permeabilität sind unabhängig vom externen pH.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und gegen die angelegte Spannung aufgetragen. Die Experimente wurden mit 100 mM  $NO_3^-$  Standardlösungen und einem pH-Wert von 5,6 bzw. 7,5 durchgeführt. ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SA).

Im Gegensatz zur Unempfindlichkeit gegenüber der externen Protonenkonzentration konnte Tobias Maierhofer (AG Prof. Dr. Hedrich, J-v-S-Institut) feststellen, dass die Zugabe von Acetat in die externe Messlösung AtSLAH3 auch in Abwesenheit einer aktivierenden Kinase aktiviert (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation). Acetat in protonierter Form überquert die Plasmamembran von Oozyten und dissoziiert im Zytosol der Zelle. So wird die zytosolische Seite der Membran angesäuert (Roos and Boron, 1981; Tsai et al., 1995). Wie die aufgezeichneten Stromspuren bzw. dazugehörige Strom-Spannungskurven zeigen, hatte solch eine zytosolische Acidifizierung im Gegensatz zur externen pH-Änderung eine deutliche Aktivitätssteigerung auch von PttSLAH3 zur Folge (Abbildung 3.21). So bewirkte eine interne Acidifizierung durch 10 mM Acetat in der externen Badlösung eine deutliche Steigerung der Kanalaktivität. Diese im Vergleich zur externen Ansäuerung festgestellte Aktivitätsänderung deutete darauf hin, dass es in

zytosolischen Domänen von PttSLAH3 pH-sensitive „Schalter“ geben muss, die Einfluss auf die Aktivität des Kanals haben.



**Abbildung 3.21: Gesteigerte Kanalaktivität nach zytosolischer Acidifizierung.**

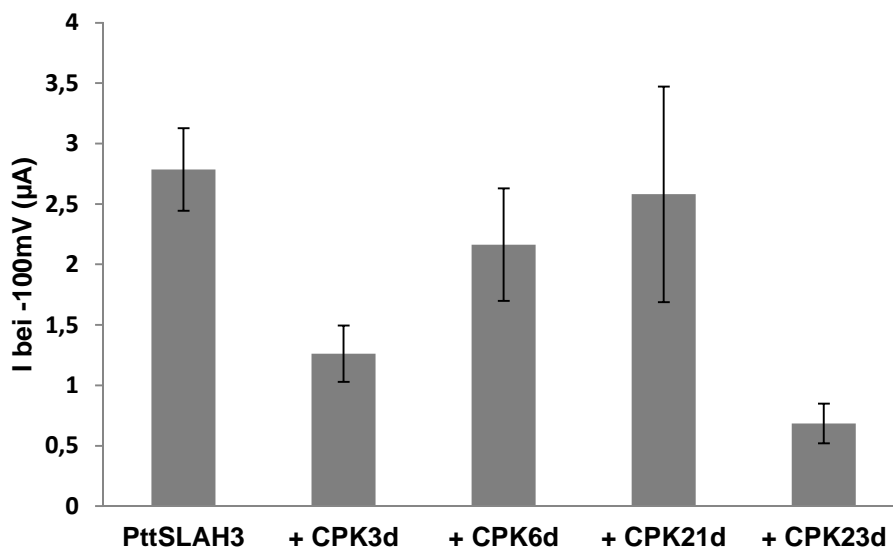
(A) Ganzzellströme wurden in Standard-Messlösungen vor Acetat ( $100 \text{ mM NO}_3^-$ ), mit Acetat ( $90 \text{ mM NO}_3^-$  und  $10 \text{ mM Acetat}$ ) und nach Acetat ( $100 \text{ mM NO}_3^-$ ) Gabe und unter Verwendung des Standardpulsprotokolls aufgezeichnet. Die Abbildungen zeigen instantane Ströme einer repräsentativen Oozyte. (B) Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden gegen die angelegte Spannung aufgetragen. ( $n = 5$ , Mittelwert  $\pm$  SA).

### 3.3.2.3.5. Aktivitätsvergleich nach Koexpression mit verschiedenen Kinasen

Bisher konnte nur ein signifikanter Unterschied zwischen AtSLAH3 und PttSLAH3 festgestellt werden. Während der Arabidopsis-Kanal erst durch die Koexpression und Phosphorylierung durch eine Kinase aktiviert wird, zeigte PttSLAH3 eine konstitutive Aktivität auch in der Abwesenheit von Kinasen (siehe auch 3.3.2.3.1). Um zu testen, ob PttSLAH3 bereits seine vollständige Aktivität erreichte, oder ob eine weitere Steigerung der Anionenströme durch eine Koexpression von Kinasen möglich ist, wurden ausgewählte Arabidopsis- und Pappel-Kinasen mit PttSLAH3 koexprimiert.

Arabidopsis CDPKs: Proteine der CDPK Familie (engl. calcium-dependent protein kinases) gehören zur Gruppe der Calcium-abhängigen Kinasen. In Arabidopsis als CPKs

bezeichnet konnten einzelnen Mitgliedern dieser 34 Serin/Threonin Kinasen umfassenden Familie eine Aktivierung von AtSLAH3 und anderen SLAC/SLAH-Kanälen nachgewiesen werden (Geiger et al., 2011). Da während der Experimente mit Oozyten keine Steigerung der zytosolischen Calcium-Konzentration zu erwarten ist und weil einzelne CPKs unterschiedliche Calcium-Abhängigkeiten aufweisen, musste für einen Vergleich der Kanalaktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kinasen deren vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Aktivierung garantiert werden. Es wurde gezeigt, dass durch Deletion der autoinhibitorischen Domäne und der Calcium-Bindedomäne (EF-Hände) CPKs eine Calcium-unabhängig konstitutive Aktivität erlangen (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994; Vitart et al., 2000). Ausgewählte, entsprechend deletierte Arabidopsis CPKs (CPK3d, CPK6d, CPK21d und CPK23d; CPKd = Deletionsmutante; bereitgestellt von AG Dietmar Geiger, J-v-S-Institut), deren Koexpression mit AtSLAH3 eine deutliche Kanalaktivität zur Folge hatten (Maierhofer, 2012), wurden deshalb für Untersuchungen mit PttSLAH3 koexprimiert. Jedoch war keine der getesteten Kinasen in der Lage, die Pappel-Kanalaktivität zu steigern (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Arabidopsis CPKs.**

Instantane Ströme ( $I_i$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Keine der getesteten Deletionsmutanten der Arabidopsis-CPK-Familie konnte die Aktivität des Pappel-Kanals steigern. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. ( $n \geq 3$ , Mittelwert  $\pm$  SF).

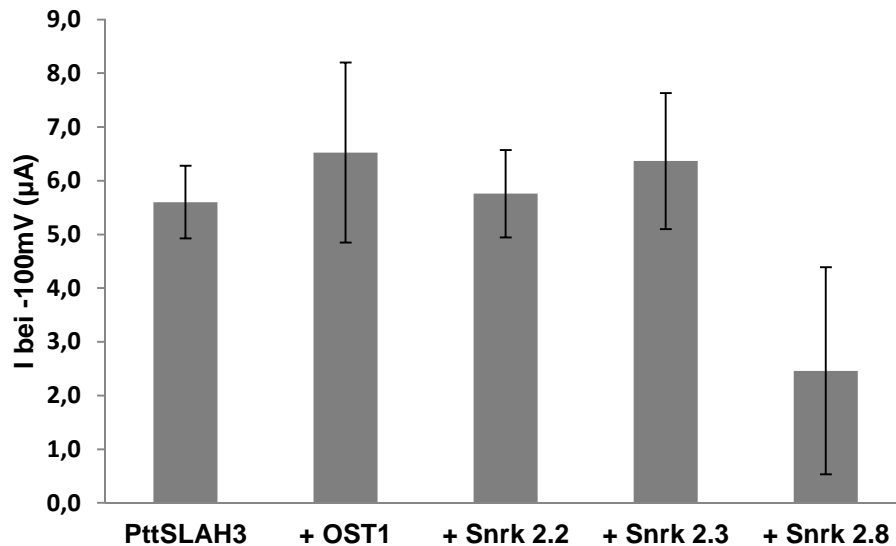
Im Gegenteil, nach Koexpression mit entsprechenden Kinasen wurde teilweise auch eine unterschiedlich starke Hemmung der Kanalaktivität festgestellt. Dabei zeigte die

Koexpression von PttSLAH3 mit CPK21d gefolgt von CPK6d den geringsten Unterschied zum Kanal ohne Kinase.

Zur Untersuchung der möglichen Interaktion des Anionenkanals mit einer Kinase wurde zusätzlich die BiFC-Technik (BiFC, engl. bimolecular fluorescence complementation) verwendet (siehe auch 2.6.3). Sie ermöglicht es, die Bindung bzw. die räumliche Nähe zweier Proteine optisch zu bestätigen. Dabei wurde die C-terminale Hälfte eines YFPs (engl. yellow fluorescence protein) an den C-Terminus von PttSLAH3 gekoppelt. Die andere Hälfte (N-terminale Hälfte YFP) wurde an das C-terminale Ende der entsprechenden Kinase fusioniert. Bei erfolgreicher Kolo-kalisation beider Proteine kann daraufhin YFP-Fluoreszenz detektiert werden. Dabei konnte nur für CPK21d und CPK6d ein YFP Signal und damit eine räumliche Nähe bzw. Interaktion von Kanal und Kinase nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten Interaktionsstudien zwischen AtSLAH3 und CPKs für dieselben beiden Kinasen, CPK21d und CPK6d, das stärkste YFP-Signal (Maierhofer, 2012).

Arabidopsis SnRKs: Auch Calcium-unabhängigen Kinasen der SnRK Familie (engl. sucrose non-fermenting-1 related kinases) wurde bereits eine Beteiligung an der Phosphorylierung von Anionenkanälen nachgewiesen (Li et al., 2000). So konnte für AtSLAC1 gezeigt werden, dass insbesondere SnRK 2.6 (auch OST1 genannt) physikalisch mit dem Anionenkanal interagiert und zur Aktivierung führt (Geiger et al., 2009). AtSLAH3 konnte dagegen von keiner der getesteten koexprimierten SnRKs (SnRK 2.2, SnRK 2.3, OST1 und SnRK 2.8) aktiviert werden (Maierhofer, 2012).

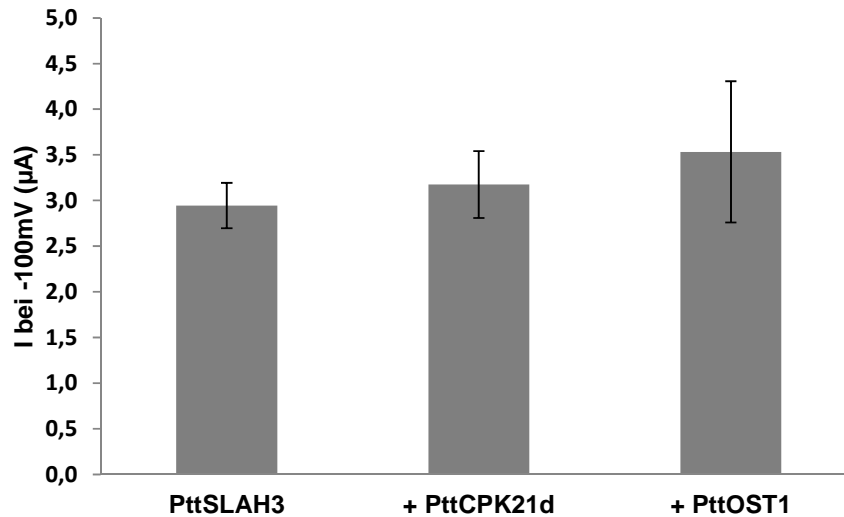
Diese vier Arabidopsis SnRKs wurden daraufhin mit PttSLAH3 koexprimiert. Wie schon bei den untersuchten Arabidopsis CPKs konnte aber auch hier keine gesteigerte Aktivität von PttSLAH3 beobachtet werden (Abbildung 3.23). Darüber hinaus zeigte keine der Kanal-Kinase-Kombinationen unter Verwendung der BiFC-Technik ein YFP-Signal (Daten nicht gezeigt). Keine der getesteten Arabidopsis-Kinasen (CPK und SnRK) war demnach in der Lage, die Aktivität von PttSLAH3 zu steigern.



**Abbildung 3.23: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Arabidopsis SnRKs.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Keine der getesteten Calcium-unabhängigen Kinasen aus Arabidopsis konnte die Aktivität des Pappel-Kanals steigern. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. (n = 3, Mittelwert  $\pm$  SA).

Pappel-Kinasen: Um eine Inkompatibilität der Arabidopsis Kinasen mit PttSLAH3 ausschließen zu können, sollte jeweils ein Vertreter beider Klassen (CPKs/SnRKs) aus *Populus tremula x P. tremuloides* getestet werden. Am besten geeignet dafür erschienen CPK21 und OST1, die in Arabidopsis-SLAH3 bzw. -SLAC1 besonders stark aktivierten. Mit Hilfe der Sequenzen von AtCPK21 (At4g04720), AtOST1 (At4g33950) und der Datenbank Phytozome ([http://www.phytozome.net/search.php?show=text&method=Org\\_Ptrichocarpa](http://www.phytozome.net/search.php?show=text&method=Org_Ptrichocarpa)) konnten entsprechende orthologe Kinasen identifiziert werden (PtCPK21 = POPTR\_0021s00750 und PtOST1 = POPTR\_0009s11010). Unter Verwendung der entsprechenden USER-Primer (7.5.1) konnten dann sowohl die Calcium-unabhängige Deletionsmutante PttCPK21d (CDS Deletionsmutante siehe 7.6), als auch PttOST1 aus *Ptt* kloniert und mit PttSLAH3 koexprimiert werden. Jedoch konnte auch keine der beiden Pappel-Kinasen PttSLAH3 zusätzlich aktivieren (Abbildung 3.24). Auch konnte für beide Kinasen kein BiFC-Signal und somit keine Interaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei keiner der getesteten Arabidopsis oder Pappel-Kinasen konnte demnach für PttSLAH3 eine gesteigerte Aktivierung durch die Koexpression von Proteinkinasen festgestellt werden. Es stellte sich deshalb die Frage, ob bereits eine vollständige Phosphorylierung von PttSLAH3 durch endogene Kinasen der Oozyten von *Xenopus laevis* vorlag.

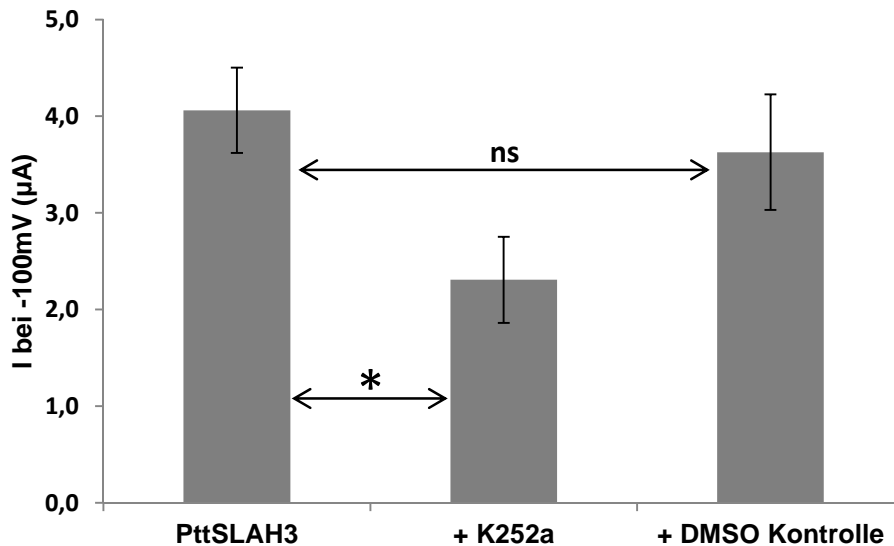


**Abbildung 3.24: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Pappel CPK21 oder OST1.** Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Weder die Deletionsmutante der „Calcium-abhängigen“ PttCPK21 noch die Calcium-unabhängige PttOST1 Kinase waren in der Lage, die Aktivität des Pappel-Kanals zu steigern. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. ( $n \geq 4$ , Mittelwert  $\pm$  SF).

#### 3.3.2.3.6. Auswirkung eines Kinaseinhibitors auf die Aktivität von PttSLAH3

Zur Klärung, ob PttSLAH3 durch konstitutiv aktive Oozyten-endogene Kinasen bereits vollständig phosphoryliert vorlag, sollte die Verwendung des unspezifischen Kinaseinhibitors K252a beitragen (Stoelzle et al., 2003; Ligaba et al., 2009). Für eine effektive Inhibierung ist dabei entscheidend, dass der Inhibitor über längere Zeit einwirkt, damit ständig vorkommende De- und Re-Phosphorylierungen des Proteins verhindert bzw. eingeschränkt werden.

Mit PttSLAH3 injizierte Oozyten wurden deshalb bereits ein bis drei Stunden vor der Messung in K252a Lösung (10  $\mu\text{M}$  K252a/DMSO in ND96) inkubiert. Die Messungen der so behandelten Oozyten (+ K252a) zeigte eine signifikant reduzierte PttSLAH3-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Oozyten (PttSLAH3) (Abbildung 3.25). Dies deutete darauf hin, dass PttSLAH3 durch endogene Oozyten-Kinasen phosphoryliert und deshalb in *Xenopus*-Oozyten konstitutiv aktiv vorlag.



**Abbildung 3.25: PttSLAH3-Aktivitätsminderung durch Kinaseinhibitor K252a.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Vorinkubation (1-3 Stunden) von PttSLAH3-exprimierenden Oozyten in 10  $\mu\text{M}$  K252a-ND96 Lösung (K252a gelöst in DMSO) verminderte die Aktivität des Kanals eindeutig. Positivkontrolle, Oozyten inkubiert in 10  $\mu\text{M}$  DMSO-ND96 Lösung. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. ( $n \geq 29$ , Mittelwert  $\pm$  SF; Student t-Test:  $*P = 0,00696$ ; ns = nicht signifikant).

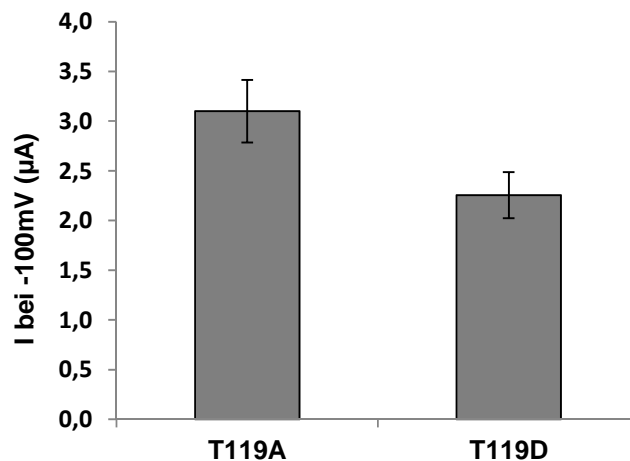
#### 3.3.2.3.7. PttSLAH3-Phosphorylierungsstellen

Die im Gegensatz zu AtSLAH3 endogene Phosphorylierung von PttSLAH3 durch Oocytenkinasen hatte möglicherweise ihren Ursprung in der teilweise unterschiedlichen Aminosäuresequenz der beiden Proteine. Wie bereits beschrieben (3.3.2.1) unterscheiden sich Pappel- und Arabidopsis-SLAH3 hauptsächlich in ihren N- und C-terminalen Bereichen. Andererseits konnte ein relativ kleiner Bereich im N-Terminus von AtSLAH3 (AA 176 - 197) stark konserviert auch in PttSLAH3 (AA 108 - 129) gefunden werden. Genau in diesem Abschnitt von AtSLAH3 wurden die vier putativen Phosphorylierungsstellen, Serin<sup>184</sup>, Threonin<sup>187</sup>, Serin<sup>189</sup> und Threonin<sup>197</sup> als Ziel der AtCPK21-Phosphorylierung identifiziert (Geiger et al., 2011). Alle vier Aminosäuren fanden sich an homologer Position in PttSLAH3 (Serin<sup>116</sup>, Threonin<sup>119</sup>, Serin<sup>121</sup> und Threonin<sup>129</sup>) (siehe auch Abbildung 3.10). Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass eine dieser vier Phosphorylierungsstellen der Grund für eine differenzielle Aktivierung der beiden SLAH3-Kanäle ist.

In AtSLAH3 konnte zudem Threonin<sup>187</sup> durch Mutationsstudien als die wohl entscheidende Stelle für eine phosphoryliert gesteuerte Aktivierung des Kanals identifiziert werden (Geiger et al., 2011). Dazu wurden alle vier entscheidenden Serine und Threonine von AtSLAH3 zu Aspartat mutiert, um an entsprechender Stelle des Proteins eine

Phosphorylierung nachzuahmen. Die zusätzliche Carboxygruppe des Aspartats bzw. deren negative Ladung imitiert dabei die ebenfalls negativ geladene Phosphatgruppe. In AtSLAH3 führte dabei nur die Mutation von Threonin<sup>187</sup> (T187D; Threonin 187 Aspartat) zur Aktivierung ohne koexprimierte Kinase, vergleichbar mit der von dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen PttSLAH3-Wildtyp. In PttSLAH3 entspricht Threonin<sup>119</sup> dieser entscheidenden Phosphorylierungsstelle von AtSLAH3. Um deren Relevanz auch im Pappel-Kanal untersuchen zu können, wurde auch hier zu Aspartat (T119D) bzw. Alanin (T119A) mutiert. Alanin kann im Gegensatz zu Threonin nicht phosphoryliert werden. Bei gleicher entscheidender Rolle von Threonin<sup>119</sup> in PttSLAH3 wie Threonin<sup>187</sup> im Arabidopsis-Ortholog sollte die Mutante T119A weder exo- noch endogen aktivierbar sein. T119D hingegen sollte durch die Mutation nicht beeinflussbar sein und konstitutiv aktiviert vorliegen wie der Wildtyp.

Die Charakterisierung mittels DEVC und alleiniger Nitratzugabe zeigte jedoch für beide Mutanten makroskopische Anionenströme ähnlich dem PttSLAH3-Wildtyp-Kanal (Abbildung 3.26). Damit war offensichtlich, dass Threonin<sup>119</sup> in PttSLAH3 nicht die gleiche entscheidende Bedeutung für die Aktivierung des Kanals besaß wie Threonin<sup>187</sup> in AtSLAH3.



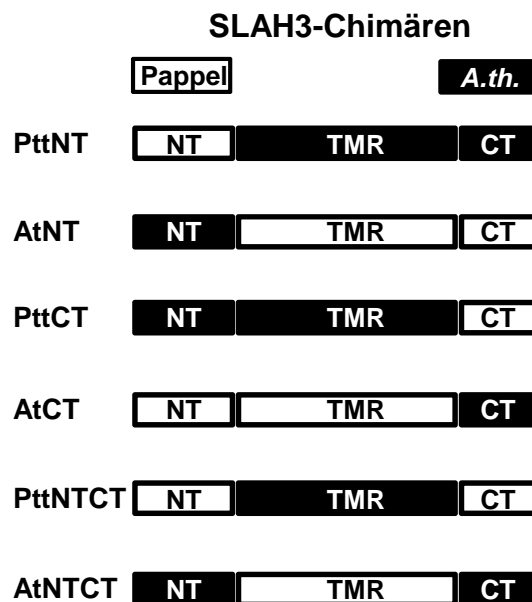
**Abbildung 3.26: Threonin<sup>119</sup> besitzt in PttSLAH3 nicht die entscheidende Kanal-aktivierende Bedeutung wie in Arabidopsis.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Die nicht mehr phosphorylierbare Alanin T119A Mutante bzw. die durch Aspartat simulierte phosphorylierte T119D Mutante von PttSLAH3 zeigten beide makroskopische Anionenströme. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. S = Serin; D = Aspartat, T = Threonin, A = Alanin. ( $n \geq 4$ , Mittelwert  $\pm$  SF).



3.3.2.3.8. SLAH3-Chimären

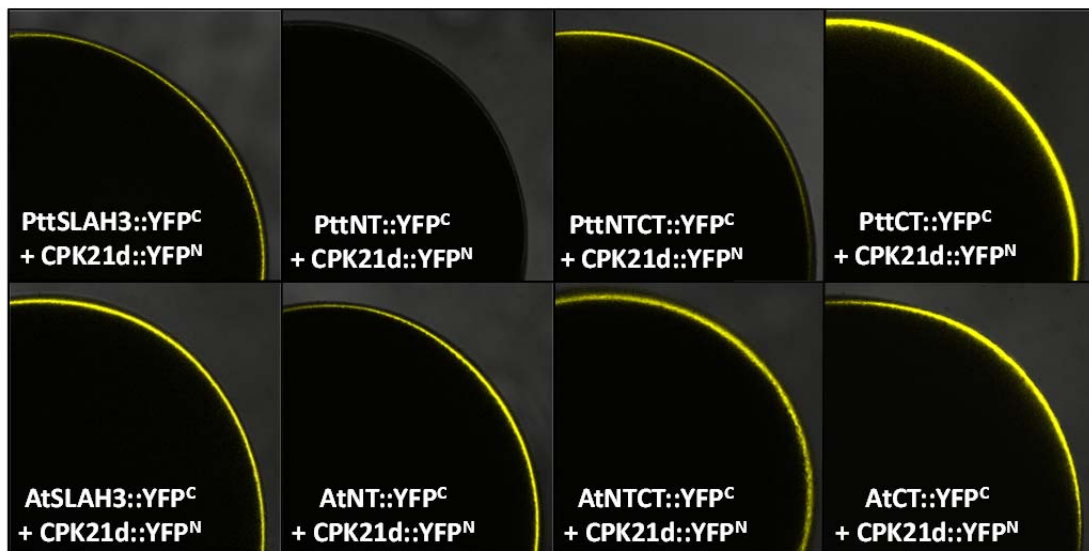
Für die Funktion von AtSLAH3 erwies sich Threonin<sup>187</sup> als entscheidende Phosphorylierungsstelle (Geiger et al., 2011). Obwohl an gleicher Stelle im N-Terminus von PttSLAH3 eine entsprechende Aminosäure (Threonin<sup>119</sup>) identifiziert werden konnte, waren endogene Oozytenkinasen nur in der Lage PttSLAH3, aber nicht AtSLAH3 zu phosphorylieren. Wie bereits erwähnt zeigten Aminosäuresequenz-Vergleiche von Arabidopsis- und Pappel-SLAH3 (3.3.2.1), dass sowohl N- als auch C-Terminus beider Kanäle sich am stärksten voneinander unterscheiden. Deshalb stellte sich die Frage, ob einer der beiden Bereiche alleine oder beide gemeinsam entscheidend für die unterschiedliche Aktivierbarkeit der Kanäle in Oozyten waren. Um diese Frage beantworten zu können, wurden Chimären mit verschiedenen Kombinationen aus Arabidopsis- und Pappel-SLAH3 hergestellt. Dafür wurden homologe Bereiche am Übergang von N- und C-Terminus zur transmembranen Region ausgewählt und sechs verschiedene Chimären erzeugt, bei denen entweder jeweils nur der N- oder C-Terminus ausgetauscht wurde oder beide Termini (Abbildung 3.27). Durch BiFC- und DEVC-Methoden konnten daraufhin deren unterschiedliche Interaktion und Aktivierbarkeit mit/durch AtCPK21 analysiert werden.



**Abbildung 3.27: SLAH3-Chimären.**

Die Abbildung zeigt verwendete Arabidopsis- und Pappel-SLAH3-Chimären. PttNT = N-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNT = N-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttNTCT = N- und C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNTCT = N- und C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttCT = C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtCT = C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel. NT = N-Terminus; TMR = Transmembranregion; CT = C-Terminus.

Für die BiFC-Studien wurde die C-terminale Hälfte eines YFPs an den jeweiligen C-Terminus der entsprechenden SLAH3-Chimäre gekoppelt, das N-terminale YFP an das C-terminale Ende der AtCPK21d (konstitutiv aktive Deletionsmutante der Kinase, siehe auch 3.3.2.3.5). Interessanterweise konnten für fast alle untersuchten Kombinationen ein ungefähr gleich starkes YFP-Signal festgestellt werden (Abbildung 3.28). Dabei zeigte lediglich PttNT, also die Kombination aus Pappel-N-Terminus und restlichem AtSLAH3-Kanal keine Interaktion mit AtCPK21d. Es entstand außerdem der Eindruck, dass das stärkste BiFC-Fluoreszenzsignal von AtCPK21d mit PttCT (Ptt C-Terminus, Rest von Arabidopsis) bzw. AtSLAH3-Wildtyp ausging, also dann, wenn sowohl der N-Terminus als auch die Transmembrandomäne vom Arabidopsis-Kanal stammten.



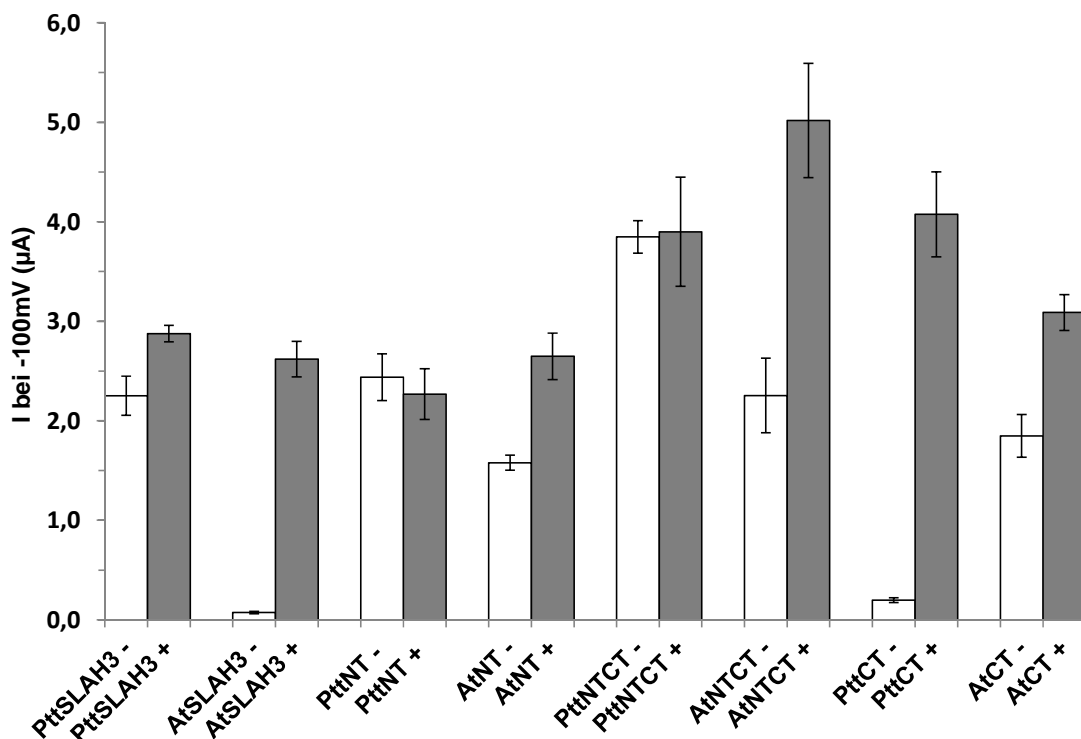
**Abbildung 3.28: BiFC-basierende Interaktion von SLAH3-Chimären und AtCPK21d.**

Für Interaktionsstudien zwischen Pappel/Arabidopsis-SLAH3-Chimären und AtCPK21 wurde die Kinase (AtCPK21 Deletionsmutante) mit der N-terminalen Hälfte des YFPs fusioniert. Die Chimären bzw. beide Wildtyp-Kanäle wurden mit der C-terminalen Hälfte des YFPs fusioniert und jeweils mit CPK21d::YFP<sup>N</sup> in Oozyten koexprimiert. Bei einer physikalischen Interaktion beider Proteine konnte daraufhin eine YFP-Fluoreszenz detektiert werden. Bis auf PttNT zeigten alle Chimären ein BiFC-Signal und damit eine Interaktion mit der Kinase. PttSLAH3 = Pappel Wildtyp; AtSLAH3 = Arabidopsis Wildtyp; PttNT = N-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNT = N-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttNTCT = N- und C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNTCT = N- und C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttCT = C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtCT = C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel. Die Bilder zeigen ein Viertel eines optischen Querschnitts repräsentativer Oozyten.

Die BiFC-Interaktionsstudien zeigten, dass fast alle Chimären-Kombinationen bzw. Kanäle (bis auf PttNT) in der Lage waren, mit AtCPK21d eine Interaktion einzugehen. Die Analyse der jeweiligen Kanäle mit Hilfe der DEVC-Methode ließ allerdings erkennen,

dass diese Interaktionen mit der Kinase nicht gleichbedeutend mit einer generellen Aktivitätssteigerung waren.

Beide Wildtyp-Kanäle zeigten in Nitrat-haltiger Messlösung die erwartete Kanalaktivität (Abbildung 3.29). Während PttSLAH3 unabhängig von der Kinase aktiv war, konnte AtSLAH3 nur in Verbindung mit AtCPK21d aktiviert werden. Die einzige Chimäre, die neben dem Arabidopsis Wildtyp ebenfalls eine koexprimierte Kinase zur Aktivierung benötigte war PttCT (Pappel-C-Terminus, Rest AtSLAH3). Interessanterweise korrelierte diese Kinase-Abhängigkeit des AtSLAH3 und des PttCT mit der zuvor bei den BiFC-Experimenten festgestellten optisch stärksten Intensität des Interaktionssignals.



**Abbildung 3.29: Kanalaktivität von Pappel- und Arabidopsis-SLAH3-Chimären mit und ohne koexprimierte AtCPK21d.**

Instantane Ströme ( $I_t$ ) aller Arabidopsis- und Pappel-SLAH3-Chimären und beider Wildtyp-Kanäle mit und ohne koexprimierter AtCPK21d wurden mit dem Standardpulsprotokoll aufgezeichnet und entsprechende Ströme bei -100 mV untereinander verglichen (multipliziert mit -1). Alle Kanäle, bis auf AtSLAH3-Wildtyp und die Chimäre PttCT zeigten ohne koexprimierte Kinase makroskopische Anionenströme, einzelne aber zumindest eine Regulierbarkeit der Kanalaktivität durch AtCPK21d. Die Experimente wurden mit 100 mM  $\text{NO}_3^-$  Standardlösung durchgeführt. PttSLAH3 = Pappel-Wildtyp; AtSLAH3 = Arabidopsis-Wildtyp; PttNT = N-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNT = N-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttNTCT = N- und C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtNTCT = N- und C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel; PttCT = C-Terminus Pappel, Rest Arabidopsis; AtCT = C-Terminus Arabidopsis, Rest Pappel. (-) ohne koexprimierte AtCPK21d, (+) mit koexprimierter AtCPK21d. ( $n \geq 5$ , Mittelwert  $\pm$  SF).

Es scheint also, dass ausschließlich der Arabidopsis N-Terminus in Verbindung mit der eigenen transmembranen Domäne die Interaktion mit Oozyten-endogenen Kinasen unterbindet und dadurch eine koexprimierte Kinase für die Aktivierung des Kanals benötigt wird. Alle Chimären mit Pappel-N-Terminus (PttNT, PttNTCT, AtCT) oder Pappel-Transmembranregion (AtNT, AtNTCT, AtCT) zeigten auch ohne AtCPK21d Kanalaktivität. Interessanterweise zeigten aber nur drei dieser Chimären eine eindeutig AtCPK21d-abhängige Steigerung der Kanalaktivität (AtNT, AtNTCT und AtCT). Deren Gemeinsamkeit war die transmembrane Region des Pappel-Kanals in Verbindung mit mindestens einem Arabidopsis Terminus.

Alle Erkenntnisse über die AtCPK21-Kanal-Interaktion sowie die Aktivitätsunterschiede einzelner Chimären in Abhängigkeit von der Kinase wurden für einen besseren Überblick in Abbildung 3.30 zusammengefasst.

	SLAH3/ Chimäre			BiFC	Aktivität	
	Pappel		A.th.		ohne	mit Kinase
PttWT	NT	TMR	CT	++	++	++
AtWT	NT	TMR	CT	+++	—	++
PttNT	NT	TMR	CT	—	++	++
AtNT	NT	TMR	CT	++	+	++
PttNTCT	NT	TMR	CT	++	+++	+++
AtNTCT	NT	TMR	CT	++	++	+++
PttCT	NT	TMR	CT	+++	—	+++
AtCT	NT	TMR	CT	++	+	+++

**Abbildung 3.30: Interaktion (BiFC) und Aktivität (DEVC) von Pappel- und Arabidopsis-SLAH3-Chimären im Zusammenhang mit AtCPK21d.**

Die Abbildung zeigt beide Wildtyp-Kanäle und alle sechs Chimären. Daneben aufgelistet werden dazugehörige Interaktionsstärke der BiFC-Reaktionen mit AtCPK21d (interpretiert aus Abbildung 3.28) und die Kinase-abhängige Kanalaktivitäten (abgeleitet von den Daten aus Abbildung 3.29). NT = N-Terminus, TMR = transmembrane Region, CT = C-Terminus; weiße Kästchen = Pappeldomänen, schwarze Kästchen = Arabidopsisdomänen. Kanalaktivität abgeleitet nach Abbildung 3.29; Instantane Ströme bei -100mV in  $\mu\text{A}$ : - = 0 bis 1; + = 1 bis 2; ++ = 2 bis 3; +++ > 3.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass sowohl Pappel-SLAH3-N-Terminus als auch die Pappel-Transmembranregion alleine bereits ausreichen, um die entsprechende Chimäre ohne koexprimierte Kinase nur durch externes Nitrat zu aktivieren. Alle Kanäle mit Pappel-N-Terminus (bis auf AtCT) zeigten sogar eine AtCPK21d-unabhängige Aktivität. Alle Kanäle mit Arabidopsis N-Terminus konnten als abhängig von der Kinase festgestellt werden. Die beiden Kanäle (AtWildtyp, PttCT), die sowohl N-Terminus als auch Transmembranregion von Arabidopsis besaßen, benötigten als einzige – unabhängig von der Natur des C-Terminus – die Phosphorylierung durch AtCPK21d, um aktiv zu sein.

Abschließend kann festgehalten werden, dass PttSLAH3 sowohl aufgrund seiner Lokalisation in den sekretorischen Zellen der extrafloralen Nektarien als auch aufgrund seiner elektrophysiologischen Eigenschaften ein geeigneter Kandidat für die Initiierung einer ekkrinen Sekretion in *Populus tremula x P. tremuloides* ist.

## 4. Diskussion

### 4.1. Funktion extrafloraler Nektarien von *Ptr* und *Ptt*

Die Anzahl der Studien über extraflorale Nektarien und deren essentielle Funktion bei der Abwehr von Herbivoren, aber auch die Anzahl an Pflanzenarten für die extraflorale Nektarien beschrieben wurden, stieg seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts stetig an (z.B. Bentley, 1977; Heil et al., 2001; Linsenmair et al., 2001; Almeida and Figueiredo, 2003; Heil and McKey, 2003; Mathews et al., 2007; Radhika et al., 2008; Heil, 2011; Gonzalez-Teuber et al., 2012; Weber and Keeler, 2012; Escalante-Pérez and Heil, 2012a). Auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pflanzenfamilie der Pappeln wurden in den letzten Jahren verschiedene Studien veröffentlicht, die sich zum einen allgemein mit der Abwehrstrategie gegen Herbivoren (Arimura et al., 2004; Lawrence et al., 2006; Ralph et al., 2006), im Speziellen aber auch mit extrafloralen Nektarien und ihrer Rolle bei der anti-herbivoren Strategie (Wooley et al., 2007) beschäftigt haben. Deshalb galt es grundsätzlich zu klären, welche Funktion EFN in den beiden hier untersuchten Pappeln *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *P. tremuloides* haben bzw. wie essentiell sie für einen Schutz gegen Herbivoren sind.

#### 4.1.1. Nektarien-Präsenz

Wie bereits erwähnt zeigten Studien an *Populus tremuloides*, dass vor allem junge Bäume und neue Blätter eine hohe extraflorale Nektarien-Dichte aufweisen (Wooley et al., 2007). Dies ist nachvollziehbar, da speziell diese Triebe bzw. Blätter wichtig für eine möglichst hohe Photosyntheserate gleich zu Beginn der Wachstumsperiode sind und ein Verlust selbiger entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der betroffenen Pflanze hat. Aber gerade diese Bereiche der Pflanze sind aufgrund ihres hohen Nährstoffgehalts und ihres relativ verwundbaren, weil noch im Wachstum befindlichen und damit Zellteilungs-aktiven Aufbaus auch besonders interessant für Herbivoren. Ein geeigneter Schutz der jungen Pflanzenteile, wie er zum Beispiel im Fall von *Populus tremuloides* durch eine höhere Dichte an EFN beschrieben wurde, erscheint deshalb wichtig.

Auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pappeln, *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* zeigten sich grundsätzlich an den meisten jungen

Blättern besonders im Frühjahr extraflorale Nektarien. Wie viele Blätter zu Beginn der Wachstumsperiode EFN präsentierten, schien dabei hauptsächlich von Umweltfaktoren bzw. den klimatischen Bedingungen während des Winters abhängig zu sein. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an Blättern mit Nektarien nach Wintern mit konstanteren Temperaturbedingungen, d.h. mit weniger Kältestress, geringer war als nach Jahren, bei denen sich häufiger Kälte- und Wärmeperioden abwechselten. Untersuchungen an floralen Nektarien von mediterranen Lippenblütlern zeigten, dass jahreszeitlich- und damit Klima-bedingte Anpassungen der Nektar-Sekretion und sogar der Nektar-Morphologie existieren (Petanidou et al., 2000). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich das Sekretionsvolumen, aber auch die Größe der Nektarien an die im Sommer herrschenden erhöhten Temperaturen und den damit verbundenen erhöhten Wasserverlust anpassen bzw. diese reduziert wurden. Es ist also durchaus möglich, dass die unterschiedliche extraflorale Nektarien-Dichte der beiden in dieser Arbeit untersuchten Pappeln aufgrund von klimatischen Bedingungen erfolgte und es deshalb zu den beobachteten Nektarien-reicheren oder -ärmeren Frühjahren kam.

Interessanterweise konnten im Frühjahr, im Gegensatz zu *Ptt*, nur bei *Populus trichocarpa* auch komplett Nektarien-freie Pflanzen festgestellt werden. Dies war allerdings wiederum nur nach Temperatur-konstanten Wintern der Fall und bestätigte, dass vorgestresste Pappeln im Frühjahr mehr Energie in den Schutz durch EFN investieren als nicht gestresste. Außerdem deutete die komplette Abwesenheit von EFN an *Ptr*-Pflanzen darauf hin, dass *Ptr* im Gegensatz zu *Populus tremula* x *P. tremuloides* keinen konstitutiven Schutz durch extraflorale Nektarien besitzt.

#### **4.1.2. Nektarien/Nektar-Induktion in *Ptr***

Ungeschützte junge *Ptr*-Triebe/Blätter müssen demnach entweder über eine andere Abwehrstrategie gegen herbivore Feinde verfügen, oder die Möglichkeit besitzen, durch eine relativ schnelle Induktion von extrafloralen Nektarien auf einen Herbivorenangriff zu reagieren. Eine Studie an *Populus tremuloides* zeigte zum Beispiel, dass diese Pappelart eine direkte Abwehrmaßnahme gegen Herbivoren besitzt. So konnten vermehrt phytochemische Abwehrstoffe wie phenolische Glykoside oder Tannine identifiziert werden, die für eine eindeutige Reduktion von Fraßschäden verantwortlich gemacht wurden (Osier et al., 2000; Donaldson and Lindroth, 2007). Eine indirekte Abwehrmaßnahme durch Induktion von EFN besitzt zwar einerseits nicht dasselbe große

Wirkspektrum wie ein generelles chemisches Signal, kann aber sehr spezifisch und effektiv gegen einzelne Herbivoren eingesetzt werden (Mondor and Addicott, 2003; Katayama and Suzuki, 2004). So scheint es durchaus plausibel, dass *Ptr*-Pflanzen, im Gegensatz zu *Ptt*, eine steuerbare und dadurch energieeffizientere Regulation von extrafloralen Nektarien bzw. Nektar und dadurch eine optimalere Kosten-Nutzen-Strategie entwickelt haben.

Erste Hinweise auf die Induzierbarkeit von EFN in *Populus trichocarpa* basieren auf Untersuchungen von María Escalante Pérez, bei denen innerhalb von 24 h nach mechanischer Verwundung extraflorale Nektarien gebildet wurden (siehe Einleitung). Aber vor allem die in der vorliegenden Arbeit entdeckte zweite Generation neu gebildeter EFN neben bereits verbrauchten, abgestorbenen Nektarien (Abbildung 3.1) ließ eine gezielte Induktion von EFN bei wiederholtem Herbivorenbefall vermuten.

Im Gegensatz zu den ursprünglichen Untersuchungen konnte allerdings durch keine der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Verwundungen bzw. Behandlungen eine Induktion von Nektarien und/oder Nektar erreicht bzw. bestätigt werden (siehe auch 3.1.2 und 3.1.3). Einfache Verwundungen, wie sie zum Beispiel bei *Vicia faba* ausreichen - dort wurde durch einmalige mechanische Verletzung von Blättern die Gesamtanzahl extrafloraler Nektarien gesteigert (Mondor and Addicott, 2003) - genügten genauso wenig wie kontinuierliche mechanische Verletzungen (MecWorm) oder die zusätzliche Applikation von Raupenlarven-Oralsekret (*Spodoptera littoralis*), die in Limabohne zu einer entsprechenden Abwehrreaktion gegen Herbivoren führten (Maffei et al., 2004; Mithöfer et al., 2005). Auch die reale herbivore Verwundung durch drei verschiedene Raupen (*Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis* und *Lymantria dispar*), mittels derer bereits in anderen Studien Herbivoren-Abwehrreaktionen von Pflanzen gezeigt werden konnten (Lawrence et al., 2006; Wu and Baldwin, 2010), zeigte weder Nektarien-Bildung noch Nektar-Sekretion. Dies könnte daran liegen, dass die verwendeten Raupen zwar als polyphag - als sich von vielen verschiedenen Pflanzen ernährend beschrieben werden -, aber sie nicht als typische Pappel-Herbivoren gelten. Eine Herbivoren-Typ-abhängige Regulation von *Ptr*-Nektarien/Nektar ist deshalb sehr wahrscheinlich und würde auch zu der Theorie einer optimalen Kosten/Nutzen-Abwehrstrategie passen. Zukünftige Untersuchungen mit Pappel-typischen Herbivoren könnten deshalb klären, ob nur spezifische Herbivoren für eine Nektarien/Nektar-Induktion in *Ptr* verantwortlich sind.

Um eingrenzen zu können, welche spezifischen Signale bzw. Reize der Induktion von EFN in *Populus trichocarpa* zu Grunde liegen, wurden Untersuchungen mit Substanzen wie Jasmonsäure (JA) und Coronalon durchgeführt, die bei anderen Pflanzen extrafloralen



Nektarfluss auslösen (Escalante-Pérez and Heil, 2012a und Referenzen darin). JA ist Bestandteil des octadecanoiden Signalweges, der nach Verwundung einer Pflanze angeschaltet wird. Coronalon ist das synthetisch hergestellte Analogon des Phytotoxins Coronathin, welchem in Pflanzen dieselbe Wirkung wie JA zugesprochen wird (Schüler et al., 2001; Schüler et al., 2004; Svoboda and Boland, 2010). Jedoch zeigten weder mit JA noch mit Coronalon behandelte *Ptr*-Pflanzen eine Nektarien/Nektar-Induktion.

Behandlung von Limabohne oder *Macaranga tanarius* mit JA führten außerdem dazu, dass flüchtige organische Verbindungen (VOCs) wie nach einer realen herbivoren Verletzung freigesetzt wurden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass diese flüchtigen Verbindungen letztlich mit dafür verantwortlich waren, dass extrafloraler Nektarfluss ausgelöst wurde (Heil et al., 2001; Kost and Heil, 2006, 2008). Die gleichen bzw. ähnlichen typischen VOCs konnten auch in anderen Pflanzenspezies (Arimura et al., 2000; Holopainen, 2011; War et al., 2011), unter anderem auch in *Ptr* (Danner et al., 2011) nach herbivorem Befall nachgewiesen werden. So zeigten auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Ptr*-Pflanzen eine solche Reaktion. Sowohl nach der Behandlung mit JA, mit Coronalon oder auch nach realer herbivorer Verwundung durch polyphage Raupen, konnten die für eine herbivore Verletzung typischen VOCs identifiziert werden (Abbildung 3.3). Im Gegensatz zu Limabohne, *Macaranga tanarius* oder auch *Ricinus communis* (Radhika et al., 2008) resultierte die Freisetzung entsprechender VOCs bei *Ptr* nicht in einer Nektarien- oder Nektar-Induktion. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass in *Ptr* als Reaktion auf eine herbivore Verwundung typische VOCs freigesetzt werden, dies auch über JA reguliert wird, aber die Nektarien/Nektar-Induktion nicht über den Jasmonsäure-Signalweg erfolgt.

Im Gegensatz zu Blatt-fressenden Insekten waren stechend-saugende Insekten in der Lage, die Nektar-Sekretion in *Ptr* auszulösen (Abbildung 3.2). Für eine Induktion entsprechender/n Nektarien/Nektars in *Ptr* scheinen demnach nicht allgemeine herbivore, sondern ganz spezifische Signale bzw. Reize verantwortlich zu sein. Von Blattläusen ist bekannt, dass sie durch ihren „Angriff“ den Jasmonsäure-, aber auch den Salicylsäure-(SA)-Signalweg der Wirtspflanze anschalten können. Welcher von beiden für die Abwehr von Phloem-saugenden Insekten entscheidend ist, scheint dabei von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich zu sein und hängt ebenfalls von der Blattlausart ab (Louis et al., 2012). Da die für diese Arbeit durchgeführten Studien mit JA und Coronalon weder zu einer Nektarien- noch zu einer Nektar-Produktion führten, ist anzunehmen, dass die Induktion von extrafloralen Nektarien/Nektar in *Ptr* nicht nur über einen JA-unabhängigen, sondern über den Salicylsäure-Signalweg reguliert wird. Zukünftige Untersuchungen mit

Salicylsäure-behandelten *Populus trichocarpa*-Pflanzen könnten daher dazu beitragen, die Induktion bzw. Regulierung von *Ptr*-extrafloralen Nektarien weiter aufzuklären.

### 4.1.3. Effektivität extrafloraler Nektarien

Die Effektivität von extrafloralen Nektarien hängt maßgeblich von der Anzahl und der Art der angelockten Besucher ab. Ameisen gehören zum Beispiel zu den wenigen Besuchern, für die bereits ein generell positiver Effekt auf die Minderung des Herbivorendrucks bei verschiedenen Pflanzen beschrieben wurde (Chamberlain and Holland, 2009). Ameisen der Gattung *Lasius emarginatus* stellten bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten EFN von *Ptr* und *Ptt* die am häufigsten beobachteten Besucher dar. Aufgrund der unterschiedlichen Kohlenhydratzusammensetzung der *Ptr*- und *Ptt*-Nektare (siehe Einleitung und 3.1.4.1) wurde eine Differenzierung der Besucher in Spezialisten wie Fliegen oder bestimmte Ameisenarten bei *Ptr* und Generalisten wie Bienen oder Wespen bei *Ptt* vermutet. Obwohl wie erwartet Schwebfliegen, die eher zu den Nektar-Spezialisten gezählt werden, nur bei *Ptr* und Wespen entsprechend nur bei *Ptt* beobachtet werden konnten, ließ sich diese Hypothese allerdings nicht eindeutig bestätigen, da sowohl an *Ptr* als auch an *Ptt* die gleiche Art von Ameisen und Bienen zu den Besuchern zählten (Abbildung 3.4). Die unterschiedliche Nektar-Kohlenhydratzusammensetzung scheint demnach zumindest für die hier untersuchten Pappelarten nicht entscheidend für die Art der angelockten Besucher zu sein. Ein Grund hierfür könnte der besondere Standort der untersuchten *Ptr*- und *Ptt*-Pflanzen im botanischen Garten der Universität Würzburg sein. Die Vielzahl an verschiedenen blühenden und Nektar-präsentierenden Pflanzen in unmittelbarer Umgebung könnte dafür verantwortlich sein, dass sich Besucher „verirren“ und dadurch auch Insekten an EFN beobachtet werden konnten, deren Nektar eigentlich nicht die bevorzugte Zusammensetzung besaß.

Um die Effektivität von extrafloralen Nektarien der untersuchten Pappeln genauer analysieren zu können, wurden Interaktionsstudien zwischen Pappeln, Herbivoren und Feinden der Herbivoren durchgeführt. Dabei wurden Bienen als potentielle „Feinde“ von Herbivoren eingesetzt, da diese zum einen relativ leicht zu domestizieren sind und zum anderen sowohl an *Ptr*- als auch an *Ptt*-EFN beobachtet werden konnten. Außerdem beschrieb bereits Trelease 1881, dass Bienen häufig an extrafloralen Nektarien einiger Pappelarten beobachtet werden konnten. Auch wenn Bienen nicht direkt als Feinde von

Herbivoren gelten, zeigten Studien an Sojabohne und Paprika, dass allein deren Anwesenheit eine Reduktion des Herbivorenfraß zur Folge hatte (Tautz and Rostas, 2008). Dabei konnte unter Verwendung von Bienen und Raupen der Art *Spodoptera exigua* derselbe Raupen-beeinflussende Effekt demonstriert werden, der bereits auch in Verbindung mit Wespen und Schmetterlingsraupen der Art *Barathra brassicae* beschrieben worden war (Tautz and Markl, 1978). Beide Raupenarten besitzen spezifische Sinneshärchen, die ihnen durch Detektion der Flügelschlagfrequenz ein Frühwarnsystem vor möglichen Feinden verschaffen, wobei sie aber unfähig sind, zwischen Wespen und Bienen zu unterscheiden.

Die Interaktionsstudien zwischen Pappel, *Spodoptera exigua* Larven und Bienen zeigten sowohl für *Ptr* als auch *Ptt*, dass auch in diesem Fall allein durch die Anwesenheit der angelockten Bienen eine Reduktion des Fraßschadens um ca. die Hälfte erreicht wurde (Abbildung 3.5). Betrachtet man die Vielfalt an Besuchern, die durch extrafloralen Nektar angelockt werden und den eindeutig verminderten herbivoren Schaden der Interaktionsstudien, kann abschließend festgestellt werden, dass beide untersuchten Pappeln in der Lage sind, mit Hilfe ihrer extrafloralen Nektarien einem Angriff durch Herbivoren vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken.

## **4.2. Transkriptionelle Regulation der Produktion und Sekretion von extrafloralem *Ptr*- und *Ptt*- Nektar**

Bisher existieren nur wenige Studien über die transkriptionelle Regulation von Nektarien-Entwicklung, Nektar-Produktion und -Sekretion. Außerdem befasst sich die Mehrzahl dieser Studien speziell mit einzelnen Aspekten des Kohlenhydratmetabolismus (Escalante-Pérez and Heil, 2012b und Referenzen darin). Dagegen wurde bereits eine Vielzahl entsprechender Studien veröffentlicht, die sich mit der Antwort auf herbivoren Stress beschäftigen. Hierzu gehören Untersuchungen an *Populus trichocarpa x deltoides*, bei denen nach Fraß durch die Raupenart *Malacosoma disstria* Gene der induzierten Pflanzenabwehr identifiziert werden konnten, die vorwiegend dem octadecanoiden (JA)- und Ethylen-Signalweg zuzuordnen waren (Ralph et al., 2006). Der für die vorliegende Arbeit durchgeführte transkriptionelle Vergleich von extrafloralen Nektarien und Blättern ohne Nektarien der beiden Pappeln *Ptr* und *Ptt* sollte übergreifend nicht nur neue und tiefere Einblicke in die Aufgaben und Funktionen extrafloraler Nektarien bei der

Herbivoren-Abwehr ermöglichen, sondern auch Erkenntnisse über die Art und Weise der spezifischen Nektar-Sekretion bringen.

Eine zunächst allgemeine Analyse der 500 am stärksten differenziell exprimierten Gene zwischen Blatt und EFN in *Ptt* zeigte, dass Transkripte, die in Zusammenhang mit Nektarien-Funktion bzw. Nektarien-Entwicklung gebracht werden können, zu 90 % induziert in EFN vorlagen (Abbildung 3.6). Die dazugehörigen Genklassen deuteten nicht nur auf eine hohe Stoffwechselaktivität in EFN hin, sondern zeigten gleichzeitig, wie entscheidend Signalerfassung, Weiterleitung und Verarbeitung in diesen Organen ist. Betrachtet man speziell Gene, die vor allem mit biotischem Stress in Verbindung gebracht werden können (Abbildung 3.7) zeigte sich erneut, dass fast alle (86 %) beteiligten Transkripte in extrafloralen Nektarien induziert vorlagen. Die Beteiligung so vieler Gene an Erkennung, Verarbeitung und Antwort auf biotischen Stress bekräftigte die Relevanz und die Funktion extrafloraler Nektarien bei der Abwehr von Herbivoren.

#### 4.2.1. Hormonelle Regulation

Phytohormone gehören zu den wichtigsten Botenstoffe im Bereich Pflanzenwachstum, Pflanzenentwicklung und allgemeiner Abwehrmechanismen. Daher stellte sich die Frage, welche Rolle sie bei der Steuerung der extrafloralen Nektarien-Bildung sowie Nektar-Sekretion spielen. Es existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Hormonklassen, die alle mehr oder weniger wichtig im Zusammenhang mit extrafloralen Nektarien erscheinen (Shan et al., 2012). Speziell Jasmonsäure, aber auch Salicylsäure, Auxine, Ethylen, Cytokinine, Brassinosteroide, Gibberelline und ABA sind bekannt dafür, wichtig für die pflanzliche Reaktion auf herbivore Angreifer zu sein (Erb et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnten *Ptt*-EFN-Transkripte mit fast all diesen Hormonen in Verbindung gebracht werden (Tabelle 3.3). Beide identifizierten Transkripte des Jasmonsäure-Metabolismus, eine Allenoxydsynthase und eine Lipoxygenase, spielen eine Rolle bei der Synthese von Jasmonsäure. Gene aus dieser Familie konnten auch nach mechanischer und realer herbivorer Verletzung von *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* Pflanzen durch die Larven von *Lymantria dispar* induziert gefunden werden (Lawrence et al., 2006). Auch wenn die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, dass die Induktion von *Ptt*-Nektarien und -Nektar nicht durch JA induziert wird (siehe auch 3.1.2), scheint dieses Hormon trotzdem eine wichtige Funktion in EFN zu übernehmen. Dies deckt sich mit der durch JA ausgelösten VOCs-Freisetzung von *Ptt*-Pflanzen (siehe auch

Abbildung 3.3). Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass eine Kombination aus JA und anderen Signalen für die Nektarien/Nektar-Induktion in *Ptr* verantwortlich ist. Sechs der in *Ptt*-Nektarien induzierten Transkripte gehören zum Auxin-Metabolismus. Die korrekte Verteilung dieses Phytohormons ist entscheidend für ein normales Wachstums bzw. eine normale Entwicklung der Pflanze. Knockout-Mutationen bzw. Überexpression beteiligter Gene führen nicht selten zu einem stark veränderten Phänotyp (Nakazawa et al., 2001). Die „early auxin response genes“, zu denen die in den EFN-Microarrays identifizierten SAUR-Gene oder GH3-Gene gehören, sind an den ersten Schritten der Auxin-vermittelten Signalkaskade beteiligt (Hagen and Guilfoyle, 2002). Sie könnten deshalb ebenso von Bedeutung für die Regulation der Nektarien-Entwicklung bzw. Induktion sein. Genen der GH3-Klasse wird in Arabidopsis auch eine duale Regulationsrolle zugesprochen. Sie regulieren während eines pathogenen Befalls nicht nur den Auxin-, sondern auch den Salicylsäure-Signalweg (Zhang et al., 2007). Diese duale Funktion deutet erneut darauf hin, dass die Kombination mehrerer Signalwege für die Nektar-Induktion verantwortlich ist. Dabei könnten auch einige dem SA-Metabolismus zugeordnete Gene entscheidend sein. Drei besonders stark induzierte Transkripte (BSMT1) kodieren Methyltransferasen, die die Methylierung von Salicylsäure katalysieren, einem wichtigen Schritt bei der Abwehr von Herbivoren (Chen et al., 2003). JA, Auxin und SA scheinen demnach wichtige Rollen in der EFN-Physiologie einzunehmen.

#### **4.2.2. Nektar-Produktion und -Sekretion**

Viele Bereiche der Nektar-Produktion und -Sekretion, wie zum Beispiel die Anpassung von Nektar-Spezifität oder Sekretionsvolumen an die Präferenzen bzw. Konsumrate von Besuchern oder auch die Resorption von nicht benötigtem Nektar, konnten bereits beobachtet werden (Heil, 2011 und Referenzen darin). Die molekularen Mechanismen, die diesen Prozessen zu Grunde liegen, sind allerdings bisher größtenteils unbekannt. Erste Einblicke hierzu stammen hauptsächlich von floralen *Arabidopsis thaliana* und *Brassica rapa* Nektarien (Kram et al., 2009; Hampton et al., 2010). Die Transkriptomanalyse der *Ptr*- und *Ptt*-EFN ist daher ein erster Schritt zur Aufklärung unterschiedlicher Sekretionswege extrafloraler Nektarien.

#### 4.2.2.1. *Populus tremula x tremuloides*

Grundsätzlich zeigte die transkriptionelle Analyse von *Ptt*-EFN mehrere mögliche Nektar-Produktions- bzw. Sekretions-Varianten auf.

Die Analyse der Gene, die dem Kohlenhydrat-Metabolismus zugehörig waren (Tabelle 3.5), gab dabei Hinweise auf die Produktion des spezifischen *Ptt*-Nektars. So deuten die in EFN stark induzierten Invertasen an, dass im Apoplasten der extrafloralen Nektarien eine Spaltung von Saccharose in Glukose und Fruktose stattfindet, wofür auch die Vielzahl induzierter Monosaccharidtransporter spricht. Die Nektar produzierenden Zellen stellen demnach zusätzlich starke Verbraucher dar, was einen geregelten Nachschub von Saccharose über das Phloem ermöglicht. Die stark induzierte Saccharosesynthese könnte des Weiteren für die Rückbildung eines Teils der Saccharose innerhalb der sekretorischen Zellen verantwortlich sein. Die Produktion des spezifischen *Ptt*-Nektars mit seinem ausgewogenen Verhältnis von Einfach- zu Mehrfachzuckern scheint folglich so abzulaufen, dass zunächst Saccharose aus dem Phloem ins Nektarienparenchym transportiert, diese im Apoplasten gespalten, die entstandenen Monosaccharide über Hexosetransporter in die sekretierenden Zellen gebracht und dort teilweise zu Saccharose re-synthetisiert werden. Dass ein Saccharose-spaltender Prozess zu Beginn der Nektar-Produktion wichtig sein kann, bestätigten Studien der Zellwand-Invertase CWIN4 (engl. cellwall invertase 4) in Arabidopsis, die als essentiell für die Sekretion floralen Nektars beschrieben wurde (Ruhlmann et al., 2010).

Die eigentliche Sekretion von *Ptt*-Nektar wurde bereits als granulokrin bestimmt. Sowohl die besondere Nektarienstruktur mit ihrer speziellen, einschichtigen epidermalen Zellschicht ohne Kutikula, die vielen Vesikel, die in den Drüsenzellen identifiziert werden konnten, als auch die kontinuierliche stattfindende Nektar-Sekretion führten zu dieser Vermutung (siehe Einleitung). Die transkriptionelle Analyse der EFN bestätigte dies, denn es konnten gleich mehrere Indizien gefunden werden, die für granulokrine Sekretion in *Ptt*-EFN sprechen. Bei dieser Art von Sekretion wird Nektar, eingeschlossen in Vesikeln, über die Membran transportiert. Dafür ist ein besonders aktiver Zellwand-Metabolismus erforderlich, der die Produktion, Abspaltung und Fusion von Membranvesikeln ermöglicht. Da Zellwände hauptsächlich aus den Kohlenhydraten Pektin, Hemicellulose und Cellulose aufgebaut sind, ist anzunehmen, dass deren Modifikation für diese Art der Sekretion entscheidend ist. Pektin kann durch eine Vielzahl an Enzymen (Pektin-Esterasen, Pektinasen, Pektin-Lyasen) modifiziert werden (Mellerowicz et al., 2001). Viele dieser Gene konnten in *Ptt*-Nektarien induziert gefunden werden (Tabelle 3.2). Die ebenfalls

induzierten endo-xyloglucan Transferase (Hemicellulose) und Cellulose-Synthase zeigen außerdem, dass auch Gene für die Modifikation der beiden anderen Hauptkomponenten der Zellwand beteiligt sind. Daneben konnten zwei Leucin-reiche Protein-Transkripte identifiziert werden. Ihnen wird in den unterschiedlichsten Organismen eine Vielzahl an Protein-Protein-Erkennungsreaktionen zugeschrieben, wobei sie besonders bei pflanzlichen Abwehrmechanismen oder auch bei exocytotischen Vorgängen involviert zu sein scheinen (Kobe and Deisenhofer, 1995). All diese in Nektarien stark induzierten Zellwand-Metabolismus-Gene stehen für eine hohe Flexibilität der Nektarienzellen und deuten auf granulokrine Sekretion in *Ptt*-EFN hin.

Ein weiterer wichtiger Hinweis hierfür fand sich in 21 in EFN induzierten Genen, die mit vesikulären Vorgängen in Verbindung gebracht werden (Tabelle 3.6). Interessanterweise konnten dabei auch einige Gene gefunden werden, die nicht nur mit einfachem Transport über Vesikel, sondern auch mit dem speziellen Massentransport von Vesikeln in sog. „multivesicular bodies“ (MVB) assoziiert werden (Zarsky et al., 2009). In anderen Pflanzen sind solche MVB in Zusammenhang mit Zellvermehrung, Zelldifferenzierung, aber auch mit Prozessen bei abiotischem und biotischen Stress gebracht worden (An et al., 2007 und Referenzen darin). Dass MVBs auch in den sekretorischen Zellen der *Ptt*-EFN identifiziert wurden (siehe Einleitung), deckt sich demnach mit den transkriptionellen Befunden. Granulokrine Sekretion in *Ptt*-Nektarien ist also sehr wahrscheinlich.

#### 4.2.2.2. *Populus trichocarpa*

Auch für extraflorale Nektarien von *Populus trichocarpa* wurden bereits Vermutungen über die Art der Sekretion angestellt. Die Sekretion relativ großer Mengen an Nektar innerhalb kurzer Zeit, das damit einhergehende Absterben der EFN und die dadurch bedingte Neubildung vor erneuter Sekretion (siehe Einleitung und Abbildung 3.1) deuteten zusammengenommen auf holokrine Sekretion hin. Auch wenn bisher keine Marker-Gene für holokrine Sekretion bekannt sind, konnte durch die transkriptionelle Analyse der *Ptr*-EFN nahezu ausgeschlossen werden, dass in dieser Pappel-Nektar über Vesikel transportiert wird. Alle entsprechenden Gene, die in *Ptt* induziert vorlagen, zeigten in *Ptr* die entgegengesetzte Tendenz (Tabelle 3.7). Folglich ist in *Populus trichocarpa*, wie bereits der unterschiedliche Nektarienaufbau und das unterschiedliche Sekretionsverhalten vermuten ließen, eher der holokrine als der granulokrine Sekretionstyp wahrscheinlich.

### 4.2.3. Antimikrobieller Schutz durch extrafloralen Nektar

Im Hinblick auf die Nektar-Funktion im Allgemeinen gibt es inzwischen mehrere Studien die beschreiben, welche Nektar-Komponenten für mutualistische Tiere attraktiv sein könnten. Seit längerem ist außerdem bekannt, dass floraler Nektar auch antimikrobielle Proteine enthält (Escalante-Pérez and Heil, 2012b und Referenzen darin). Deren Präsenz im Nektar ist sinnvoll, da jede Pflanzenpore/-drüse auch immer eine potentielle Eintrittspforte für Mikroben darstellt. Deshalb wurde auch extrafloraler Nektar von *Ptr* und *Ptt* diesbezüglich untersucht.

Genaue Aussagen über antimikrobielle Nektar-Proteine konnten bisher nur für *Ptr* getroffen werden (siehe Einleitung), da mit den relativ geringen sekretierten Mengen an *Ptt*-Nektar bis jetzt keine direkte Proteinanalyse durchgeführt werden konnte. So wurde in den *Ptt*-Microarrays und –mittels qPCR – in *Ptr* nach Transkripten gesucht, die der Proteinanalyse entsprachen. In beiden Pappelarten wurden etliche solcher Transkripte stark induziert in EFN gefunden (Tabelle 3.4). Besonders interessant ist, dass eines der PR-Proteine, ein Thaumatin-ähnliches Protein sowohl in *Ptr* als auch in *Ptt* besonders stark induziert war. Diese Proteinfamilie spielt in vielen Pflanzen eine entscheidende Rolle bei der allgemeinen biotischen und abiotischen Stressabwehr, besitzt hauptsächlich aber eine fungizide Wirkung (van Loon et al., 2006). In *Populus trichocarpa* konnten genomweite Analysen zeigen, dass dort 55 verschiedene Thaumatin-ähnliche Proteine existieren, weit mehr als z.B. in *Arabidopsis* (Zhao and Su, 2010). Es scheint demnach logisch, dass speziell diese Art von antimikrobiellem Protein auch im extrafloralen Nektar von *Ptr* und *Ptt* wichtig ist.

Da die meisten Transkripte sowohl in *Ptr* als auch *Ptt*, teilweise sogar sehr stark induziert in EFN gefunden werden konnten (Tabelle 3.4), kann außerdem davon ausgegangen werden, dass in den beiden hier untersuchten Pappeln antimikrobielle Proteine hauptsächlich direkt in den extrafloralen Nektarien synthetisiert werden.

### 4.3. Ekkrine Sekretion in *Ptt*

Für den Sonnenhut *Echinacea purpurea* wurde beschrieben, dass sehr wahrscheinlich beide merokrine Sekretionsunterarten, sowohl granulokrine als auch ekkrine Sekretion, in den floralen Nektarien dieser Pflanze vorkommen (Wist and Davis, 2006). Für die extrafloralen Nektarien von *Ptt* konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Hinweise für eine parallel mögliche ekkrine Sekretion gefunden werden.



### 4.3.1. Initiale Abgabe anorganischer Anionen

Es existieren nur wenige Belege für ekkrine Sekretion in Pflanzen (Fahn, 1988; Wist and Davis, 2006; Vassilyev, 2010 und Referenzen darin; Naidoo et al., 2012). Die Mehrzahl basiert dabei auf strukturellen Erkenntnissen. Vassilyev (2010) beschreibt ekkrine Sekretion als den aktiven Transport von Nektar-Kohlenhydraten über die Plasmamembran in den Apoplasten von sekretorischen Zellen, wobei der durch den osmotisch bedingten Nachstrom von Wasser erzeugte Druck final zu einem Massenfluss von Nektar aus den Nektarien führt. Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls auf eine ekkrine Sekretion in *Ptt*-EFN hin, die allerdings nicht auf einem initialen Transport von Zuckern, sondern eher auf dem von anorganischen Anionen basiert. Die hierfür durchgeführte Analyse der *Ptt*-Nektar-Anionenzusammensetzung ergab vergleichsweise hohe Konzentrationen von Chlorid und Nitrat in sekretiertem Nektar (Abbildung 3.8). Die Dominanz dieser beiden Anionen deutete auf ihre Beteiligung an einer osmotisch gesteuerten Sekretion hin und es stellte sich daher die Frage nach möglichen Transportproteinen. Ähnlich wie in Arabidopsis, wo die Stomataregulierung ebenfalls über einen solchen initialen Anionentransport und mit Hilfe von Proteinen der S-Typ-Anionenkanalfamilie SLAC/SLAH verwirklicht wird (Geiger et al., 2011), könnte also auch bei der extrafloralen Nektar-Sekretion ein Vertreter dieser Familie beteiligt sein. Denn bei allen bis dato beschriebenen Kanälen der SLAC/SLAH-Familie handelt es sich um präferentiell Chlorid und/oder Nitrat transportierende Proteine.

Die Suche nach einem geeigneten Kandidaten aus der Familie der SLAC/SLAH-Orthologen im *Ptt*-Genom und in den *Ptt*-Microarrays ergab nur ein einziges in extrafloralen Nektarien induziertes Transkript, das des *Ptt*SLAH3 (siehe auch 3.3.1.2 und 3.3.2.1). Dieser Kanal stellt, auch weil sein Arabidopsis-Ortholog AtSLAH3 für den schnellen Export von Nitrat und Chlorid aus der Schließzelle verantwortlich gemacht wird (Geiger et al., 2011), einen optimalen Kandidaten für die ekkrine Sekretion in *Ptt* dar.

### 4.3.2. *Ptt*SLAH3

#### 4.3.2.1. Protein-Struktur

Der Aminosäuresequenz-Vergleich von *Ptt*SLAH3 und AtSLAH3 zeigte, dass beide Proteine vor allem im mittleren, transmembranen Bereich hoch konserviert sind und dass N- bzw. C-Terminus durch weniger homologe Bereiche definiert sind (Abbildung 3.10).

Dies stimmt mit Sequenz-Untersuchungen an SLAC-ähnlichen Kanälen aus 32 verschiedenen Pflanzenfamilien (Dreyer et al., 2012) überein. Hier wurden vor allem N- und C-Termini der einzelnen Mitglieder der Familie sogar innerhalb einer Art als extrem variabel und divergent beschrieben. Interessanterweise konnte in dieser Studie aber auch gezeigt werden, dass putative Phosphorylierungsstellen, die für die Regulation der Kanäle hauptverantwortlich sind, selbst wenn sie sich im N-terminalen Bereich befinden, trotzdem hoch konserviert waren. Vier dieser Phosphorylierungsstellen, die auch bereits in AtSLAH3 beschrieben wurden (Geiger et al., 2011), konnten folglich an homologen Stellen im N-Terminus von Arabidopsis- und Pappel-SLAH3 gefunden werden (Abbildung 3.10). Daher lag die Vermutung nahe, dass AtSLAH3 und PttSLAH3 nicht nur ähnliche elektrophysiologische Charakteristika aufweisen könnten, sondern höchstwahrscheinlich auch über die gleichen Kinasen reguliert werden.

#### 4.3.2.2. **Lokalisation**

Die Transkriptomanalyse verschiedenster *Ptt*-Gewebe bestätigte, dass das Verhältnis von PttSLAH3 zwischen Blatt und Schließzelle dem des AtSLAH3 in Arabidopsis ähnelte (Abbildung 3.11, siehe auch Geiger et al. 2011). Dies könnte dafür sprechen, dass PttSLAH3 in Pappel dieselbe entscheidende Rolle bei der Stomataregulierung einnimmt wie AtSLAH3 in Arabidopsis. Die ähnlichen Expressionslevel des Pappel-SLAH3 in EFN und Blatt deuteten aber auch an, dass dem Anionenkanal in extrafloralen Nektarien eine große Bedeutung zukommt. PttSLAH3 war allerdings nicht, wie erwartet, in den Nektarien deutlich höher exprimiert als in Blättern. Dies könnte daran liegen, dass PttSLAH3 in Nektarien speziell in der äußeren epidermalen Zellschicht der extrafloralen Drüsen vermutet wurde. Diese Hypothese bestätigte sich durch die Immunfluoreszenzmarkierungen von PttSLAH3 (Abbildung 3.13). Hier konnte *in situ* gezeigt werden, dass PttSLAH3 vorwiegend in den Drüsenzellen lokalisiert ist.

#### 4.3.2.3. **Funktionelle Charakterisierung**

##### 4.3.2.3.1. Allgemeine elektrophysiologische Eigenschaften

Für eine ekkrine Sekretion in *Populus tremula x P. tremuloides* kam PttSLAH3 allerdings nur in Frage, wenn sich der Pappel- und der Arabidopsis-Kanal in ihren funktionellen Eigenschaften entsprechen bzw. ähneln. Die Untersuchungen von AtSLAH3 in *Xenopus* Oozyten zeigten, dass die alleinige Expression des Proteins zu keinen messbaren

Anionenströmen führte. Erst die Interaktion mit bestimmten Kinasen der CPK Familie führte zur Aktivierung des Arabidopsis-Kanals. Die spannungsabhängige, langsame Aktivierung und Deaktivierung bei niedrigen Nitratkonzentrationen charakterisieren AtSLAH3 als S-Typ-Anionenkanal (Hedrich et al., 1990; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992; Geiger et al., 2011).

Die Charakterisierung von PttSLAH3 zeigte, dass dieses Protein mit einer ähnlichen Nitratabhängigkeit und langsamen Aktivierungs- bzw. Deaktivierungskinetik bei negativen Membranspannungen Anionen über die Membran transportieren kann (Abbildung 3.14). Somit konnte bestätigt werden, dass es sich bei PttSLAH3 ebenfalls um einen S-Typ-Anionenkanal handelt. Im Gegensatz zu AtSLAH3 benötigte PttSLAH3 aber interessanterweise keine koexprimierte Kinase, um aktiviert zu werden. Die weitere Analyse zeigte, dass PttSLAH3 eine ähnliche Selektivität für Anionen aufweist wie AtSLAH3 (Nitrat : Chlorid = 20 bei AtSLAH3, 17 bei PttSLAH3), wobei in beiden Fällen kein anderes getestetes Anion transportiert wurde (Abbildung 3.15). Die genaue Analyse der Nitratpermeabilität zeigte das erwartete annähernde Nernt'sche Verhalten für den Transport einwertiger Anionen (Abbildung 3.16). Außerdem konnte die für AtSLAH3 gezeigte Kationen-Unabhängigkeit für PttSLAH3 bestätigt werden (Abbildung 3.17). Die genaue Untersuchung spannungsabhängiger Nitrat- bzw. Chlorid-Leitfähigkeiten offenbarte, dass in Abwesenheit von Nitrat ein Chlorid-Transport über PttSLAH3 stattfinden kann. Dies wurde durch die Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Membranspannungen bestätigt. Allerdings waren dazu sehr hohe, nicht physiologische Konzentrationen von Chlorid (100mM) notwendig (Abbildung 3.18 A). Bereits geringe Konzentrationen externen Nitrats (10mM) führten dagegen zu einer gesteigerten Stromantwort und zwar völlig unabhängig von Chlorid (Abbildung 3.18 B). In Anwesenheit von Nitrat im extrazellulären Medium hatte Chlorid demnach keine Auswirkung auf die Anionentransportrate und das Umkehrpotential. Daraus folgte, dass PttSLAH3 zwar permeabel für Nitrat und Chlorid ist, Chlorid aber bei entsprechend hoher externer Nitratkonzentration keinen Einfluss mehr auf die Transporteigenschaften des Kanals hat. Hier unterscheiden sich Ptt- und AtSLAH3. Denn für AtSLAH3 konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Nitrat eine externe Konzentrationsveränderung von Chlorid eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Membranpotentialen zur Folge hat (Geiger et al., 2011). Die Chlorid-Leitfähigkeit von AtSLAH3 in Anwesenheit von Nitrat konnte also in analogen Experimenten für PttSLAH3 nicht nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz könnte aus den generell schwächeren Stromantworten von

PttSLAH3 im Vergleich zu AtSLAH3 resultieren. Ein Charakteristikum, das sich der Pappel- und der Arabidopsis-Anionenkanal allerdings wieder teilen ist, dass die ansteigende Nitratkonzentration die relative Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Membranpotentialen verschob (Abbildung 3.19). Nitrat ist also essentiell für die Aktivierung des Kanals, denn dieses monovalente Anion verschiebt die Offenwahrscheinlichkeit von PttSLAH3 in den physiologischen Membranspannungsbereich.

Zusammenfassend lässt sich resümieren, dass PttSLAH3 die typischen Eigenschaften eines S-Typ-Anionenkanals besitzt. Zudem lassen sich deutliche Parallelen zu den besonderen Charakteristiken von SLAH3 aus Arabidopsis ziehen. Beide Kanäle nutzen vorzugsweise Nitrat als permeierendes Anion, das zusätzlich als Ligand essentiell für die Aktivierung des Kanals ist. Ein deutlicher Unterschied zu AtSLAH3 ist allerdings seine konstitutive Aktivität. Während AtSLAH3 nur in Anwesenheit einer interagierenden Kinase aktiv ist, benötigt der Pappel-Kanal keine koexprimierte Kinase zur Aktivierung.

#### 4.3.2.3.2. Aktivierung von PttSLAH3

##### **pH-Abhängigkeit:**

Untersuchungen sollten zeigen, ob die bereits festgestellte konstitutive Aktivität von PttSLAH3 in *Xenopus* Oozyten pH abhängig ist. Mae1, ein ferner, strukturell verwandter Malattransporter der pflanzlichen SLAC/SLAH-Anionenkanäle, transportiert Malat im Cotransport mit Protonen (Camarasa et al., 2001; Negi et al., 2008). Um einen solchen Transportmechanismus für PttSLAH3 ausschließen zu können, wurde die Aktivität des Kanals in Abhängigkeit von extrazellulären und zytosolischen pH-Änderungen untersucht. Bei externer Veränderung der Protonenkonzentration konnte allerdings kein Einfluss auf die Nitratleitfähigkeit festgestellt werden (Abbildung 3.20). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass PttSLAH3 keine Leitfähigkeit für Protonen besitzt. Die Veränderung der  $H^+$ -Konzentration auf der zytosolischen Seite hatte allerdings einen starken Einfluss auf die Aktivität des Kanals (Abbildung 3.21). Deshalb könnten besonders die zytosolischen N- oder C-Termini des Proteins oder auch zytosolische Schleifen zwischen zwei Transmembrandomänen interessant für die Suche nach einem pH-sensitiven „Schalter“ sein. Histidine werden als solche pH-sensitive Elemente in Proteinen beschrieben. Ihr pKs-Wert liegt bei pH 6,5. Sie sind deshalb im physiologischen pH-Bereich relativ leicht zu protonieren. So konnte zum Beispiel ein entsprechend pH-sensitives Histidin in der extrazellulären Schleife der äußeren Poren-Region des schwach

spannungsabhängigen Kaliumkanal AKT2/3 identifiziert werden (Geiger et al., 2002). In einem humanen Kationenkanal konnte außerdem ein einzelnes Histidin identifiziert werden, über das der Kanal bei zytosolischen pH-Änderungen reguliert wird (Zong et al., 2001). Dieses spezielle Histidin befindet sich am Übergang einer spannungssensitiven Transmembrandomäne zu einer zytosolischen Schleife. Da die interne Acidifizierung sowohl die Aktivierung von PttSLAH3 als auch von AtSLAH3 (noch nicht veröffentlicht, persönliche Kommunikation) zur Folge hatte, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem Protonen-Ziel um ein in beiden Proteinen an homologer Position vorkommendes, zytosolisches Histidin handelt. Zukünftige Mutationsstudien könnten dazu beitragen, das oder die entscheidenden pH-sensitiven Stellen in PttSLAH3 zu identifizieren.

#### **Aktivierung über Proteinkinasen:**

Da für PttSLAH3, im Gegensatz zu AtSLAH3, bereits ohne Koexpression mit geeigneten Proteinkinasen eine typische S-Typ-Anionenkanalaktivität festgestellt werden konnte, sollte die Koexpression von PttSLAH3 mit den unterschiedlichsten Kinasen zeigen, ob die PttSLAH3-Aktivität durch zusätzliche Phosphorylierung weiter gesteigert werden kann. Jedoch konnten weder Arabidopsis CPKs, die AtSLAH3 aktivierten (Maierhofer, 2012), noch eine Auswahl an Kinasen der Arabidopsis SnRK-Familie, von denen die getesteten in der Lage waren AtSLAC1 zu aktivieren (Geiger et al., 2009), die Aktivität von PttSLAH3 entscheidend steigern (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Vielmehr wurde zum Teil eine leicht erniedrigte Aktivität von PttSLAH3 nach Koexpression mit den Arabidopsis Kinasen AtCPK3d, AtCPK23d und AtSnrk2.8 (siehe Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23) festgestellt. Allerdings spricht die fehlende Interaktion dieser Kinasen mit PttSLAH3 (keine BiFC-Signale) dafür, dass es sich bei dieser Erniedrigung der Anionenströme um keinen direkten Effekt auf den Pappel-Kanal handelt. Es bleibt also offen, wie es zur Verminderung der PttSLAH3-vermittelten Anionenströme in Anwesenheit ausgewählter Kinasen kommt. Für die Kinasen AtCPK6 und AtCPK21 konnte eine physikalische Interaktion mit PttSLAH3 über die BiFC-Technik nachgewiesen werden (siehe auch 3.3.2.3.5). Allerdings konnten auch diese beiden Kinasen die Aktivität des Kanals nicht steigern. Auch zwei aus der Pappel klonierte Kinasen (PttCPK21; PttOST1), die wegen ihrer Aktivierung der entsprechenden Arabidopsis-Kanäle ausgewählt wurden (AtCPK21 aktiviert AtSLAH3; AtOST1 aktiviert AtSLAC1), waren nicht in der Lage, die Stromantwort des Pappel-Kanals eindeutig zu erhöhen (Abbildung 3.24) und es bleibt offen, ob eine Phosphorylierung des Kanals stattfindet. Es deutete aber alles darauf hin, dass PttSLAH3, exprimiert in *Xenopus laevis*, durch Oozyten-endogene Kinasen

phosphoryliert wird und so bereits in einen konstitutiv aktiven Zustand versetzt wird. Diese Theorie konnte durch die Inkubation von PttSLAH3-exprimierenden Oozyten mit dem unspezifischen Kinaseinhibitor K252a bestärkt werden, da das Transportvermögen des Pappel-SLAH3-Anionenkanals nach der Inkubation signifikant verringert wurde (Abbildung 3.25).

Zur Beantwortung der offenen Fragen sollte zukünftig ein anderes heterologes Expressionssystem (wie z.B. Hek293- oder COS-Zellen) verwendet werden. Zudem könnten *in-vitro* Kinaseassays dazu beitragen Proteinkinasen der CPK- oder SnRK-Familie zu identifizieren, welche die zytosolischen Bereiche des PttSLAH3-Anionenkanals phosphorylieren.

### **Putative PttSLAH3-Phosphorylierungsstellen**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt konnten Chen und Kollegen den Bereich der Transmembranen von SLAC1 sehr gut auf die Struktur eines bakteriellen SLAC/SLAH-Orthologs (TehA aus *Haemophilus influenza*) modellieren und so die dreidimensionale Struktur der Porenregion zeigen (Chen et al., 2010). Allerdings ist immer noch nicht bekannt, wie die Phosphorylierung des N-Terminus von SLAC1 durch eine aktivierende Kinase in das Öffnen des Anionenkanals übersetzt wird.

In AtSLAH3 wurde speziell die Aminosäure Threonin an Position 187 (T187), die sich im zytosolischen N-Terminus des Kanals befindet, als potentielle Phosphorylierungsstelle identifiziert (Geiger et al., 2011). Auch in AtSLAC1 befindet sich in einem entsprechend homologen Bereich des N-Terminus ein Serin an Position 120 (S120), welches sich als entscheidende Phosphorylierungsstelle bei der Interaktion mit OST1 herausstellte (Geiger et al., 2009). An homologer Position zum AtSLAH3-Protein konnte in PttSLAH3 ebenfalls ein Threonin (T119) im N-Terminus identifiziert werden (Abbildung 3.10). Die Untersuchung der beiden PttSLAH3-Mutanten T119A und T119D zeigte allerdings nicht die erwarteten Ergebnisse. Die Zerstörung der Phosphorylierungsstelle (Alanin-Mutante T119A, auch Oozyten-endogene Kinasen können hier nicht mehr phosphorylieren) ebenso wie die simuliert konstitutive aktive Aspartat-Mutante T119D hatten keinen Einfluss auf die Aktivität von PttSLAH3 (Abbildung 3.26). T119 in PttSLAH3 scheint deshalb, anders als T187 in AtSLAH3, nicht die entscheidende Rolle bei der Interaktion mit einer Kinase zu spielen.

Da weder der Vergleich des N- und C- Terminus zwischen AtSLAH3 und PttSLAH3 noch die Modifikation der putativen Phosphorylierungsstelle einen Aufschluss über die Deregulation des Pappel-Kanals erbrachte wurden Chimären generiert, bei denen die

zytosolischen Termini zwischen AtSLAH3 und PttSLAH3 ausgetauscht wurden. Die Auswirkungen dieser Kombinationen auf die Aktivität der entstandenen Kanäle, aber auch auf die Interaktion mit der für AtSLAH3 entscheidenden Kinase AtCPK21 sollten klären, ob eine Übertragung der Aktivierbarkeit von AtSLAH3 und PttSLAH3 möglich ist.

Wie bereits erwähnt zeigte der Arabidopsis-Wildtyp-Kanal (AtWT, Abbildung 4.1) in Abwesenheit von AtCPK21 keine makroskopischen Anionenströme. Erst die Koexpression mit AtCPK21d resultierte in einer starken Kanalaktivität. Die Substitution des AtSLAH3-N-Terminus mit dem PttSLAH3-N-Terminus führte dagegen zu einer Kinase-unabhängigen, konstitutiv aktiven Chimäre (PttNT, Abbildung 4.1). Der Kanal verlor also seine Regulierbarkeit und verhält sich wie PttSLAH3.

	SLAH3/ Chimäre			Aktivität	
	<b>Pappel</b>		<b>A.th.</b>	ohne	mit Kinase
PttWT	NT	TMR	CT	++	++
AtWT	NT	TMR	CT	—	++
PttNT	NT	TMR	CT	++	++
AtNT	NT	TMR	CT	+	++
AtCT	NT	TMR	CT	+	+++

**Abbildung 4.1: Hauptsächlich der N-Terminus ist für die unterschiedliche Kinase-abhängige Aktivierung von PttSLAH3 und AtSLAH3 verantwortlich.**

Die Abbildung fasst die Kanalaktivitäten, die für die Analyse der Kinase-abhängigen PttSLAH3-Aktivierung wichtigsten Kanäle/Chimären zusammen. Allein der Austausch des AtSLAH3-N-Terminus gegen den N-Terminus von PttSLAH3 (PttNT) genügte, um den Kinase-abhängigen Kanal konstitutiv zu aktivieren. NT = N-Terminus, TMR = transmembrane Region, CT = C-Terminus; weiße Kästchen = Pappeldomänen, schwarze Kästchen = Arabidopsisdomänen. Kanalaktivität abgeleitet nach Abbildung 3.29; Instantane Ströme bei -100mV in  $\mu\text{A}$ : - = 0 bis 1; + = 1 bis 2; ++ = 2 bis 3; +++ >3.

Das bestätigte, dass der N-Terminus entscheidend für die Phosphorylierungs-induzierte Aktivität von AtSLAH3 (Geiger et al., 2011) ist. Die im Gegenzug erwartete, vollständige Kinase-Abhängigkeit der entsprechenden Pappel-Chimäre (AtNT, siehe Abbildung 4.1) konnte allerdings nicht festgestellt werden. Diese Chimäre zeigte weiterhin eine Basisaktivität in Abwesenheit von AtCPK21, jedoch konnte diese Aktivität in Anwesenheit der Kinase deutlich gesteigert werden. Es konnte also eine Regulierbarkeit

der Kanalaktivität durch AtCPK21d festgestellt werden, die der PttSLAH3-Wildtyp-Anionenkanal nicht aufwies.

Der Austausch des AtSLAH3-N-Terminus gegen die entsprechende Sequenz aus PttSLAH3 führte also zu einer Kinase-unabhängigen, konstitutiven Aktivität der Chimäre. Beide N-Terminus-Chimären bestätigen somit die Bedeutung der N-terminalen, zytosolischen Anhänge von SLAC/SLAH-Anionenkanälen als regulatorische Domäne, die durch Phosphorylierungsereignisse die Aktivität bestimmen.

Interessanterweise führte der Austausch des Pappel-C-Terminus gegen den entsprechenden Arabidopsis-Terminus (AtCT, Abbildung 4.1) auch zu einer durch AtCPK21d regulierbaren Chimäre. Es scheint daher, dass auch der C-Terminus Einfluss auf die Aktivität von PttSLAH3 ausübt, was durch den Vergleich der SLAC/SLAH-Kanäle verschiedener Pflanzenfamilien bekräftigt wurde (Dreyer et al., 2012). Sowohl im N- als auch im C-Terminus fanden sich konservierte Bereiche mit möglichen Phosphorylierungsstellen. In Verbindung mit den hier gezeigten Einflüssen der Termini auf die Aktivität der jeweiligen Chimären deutet demnach alles darauf hin, dass vor allem der N-Terminus, möglicherweise aber auch in Verbindung mit dem C-Terminus, der entscheidende Faktor für die unterschiedliche Kinase-abhängige Aktivierung von PttSLAH3 und AtSLAH3 ist.

Schlussendlich können aber nur weitere Mutationsstudien klären, welche Mechanismen im N- oder C-Terminus für die Aktivierung verantwortlich sind und wo gegebenenfalls die entscheidende Phosphorylierungsstelle in PttSLAH3 zu finden ist. Man sollte aber auch die Möglichkeit nicht außer Acht lassen, dass PttSLAH3 sowohl im heterologen Expressionssystem als auch in der Pflanze konstitutiv aktiv sein könnte. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deuten zumindest darauf hin.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Lokalisation von PttSLAH3 und alle elektrophysiologischen Eigenschaften in Verbindung mit der Anionenzusammensetzung des Nektars dafür sprechen, dass dieser Kanal für den initialen Prozess der ekkrinen Sekretion in *Populus tremula x tremuloides* extrafloralen Nektarien verantwortlich ist.



## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden extraflorale Nektarien (EFN) von *Populus trichocarpa* (*Ptr*) und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (*Ptt*) hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften bei der indirekten Herbivoren-Abwehr untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

### **Nektarien-Funktion und -Regulation:**

Beide untersuchten EFN-Arten sind in der Lage, die jeweilige Pappel indirekt vor Schädigung durch Herbivoren zu schützen. Dies zeigte nicht zuletzt der jeweils beobachtete kontinuierliche Besuch verschiedenster Insektenarten. Vor allem Ameisen aber auch Bienen zählten zu Besuchern sowohl von *Ptr* als auch *Ptt*. Die Effektivität so angelockter Besucher konnte durch Interaktionsversuche mit Bienen bestätigt werden und belegte, dass allein die Anwesenheit von Bienen zu einer eindeutigen Reduktion des herbivoren Blattschadens führt (*Ptr* und *Ptt*).

Obwohl beide Pflanzen derselben Gattung (*Populus*) angehören, konnte bestätigt werden, dass *Ptr* und *Ptt* unterschiedliche Herbivoren-Abwehrstrategien entwickelt haben. Während es sich bei *Ptt*-EFN um konstitutiv vorhandene Organe handelt, zeigten *Ptr*-Pflanzen eine gezielte Bildung von Nektarien/Nektar erst nach Herbivorenbefall. Dabei scheinen spezifische, durch Herbivoren erzeugte Signale für die Induktion verantwortlich zu sein. Die Freisetzung der nach Herbivorenbefall typischen, flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs) in *Ptr* konnte zwar als Jasmonsäure-abhängig identifiziert, der Jasmonsäure-Signalweg, der schon als Auslöser für extraflorale Nektar-Produktion bei z.B. Limabohne gezeigt worden war, als alleiniges Steuerelement aber ausgeschlossen werden. Ein Zusammenspiel mehrerer Hormone bei der Regulation der indirekten Herbivoren-Abwehr in *Ptr* durch Nektarien/Nektar-Induktion ist deshalb sehr wahrscheinlich.

Dies bekräftigten auch die Transkriptomanalysen von *Ptt*-Nektarien. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl Jasmonsäure als auch Auxin und Salicylsäure eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus lieferten verschiedene differentiell regulierte Gencluster, die in Zusammenhang mit Nektarien-Funktion, -Entwicklung und biotischem Stress stehen, deutliche Hinweise auf die entscheidende Rolle extrafloraler Nektarien bei der Herbivoren-Abwehr.

### **Nektar-Produktion:**

Die Analyse extrafloraler Nektar-Proteine und zugehöriger Transkripte zeigte nicht nur, dass beide Pappelarten über eine ähnliche, von antimikrobiellen Proteinen dominierte

Nektar-Proteinzusammensetzung verfügen, sondern auch, dass bei beiden die Produktion dieser Proteine hauptsächlich direkt in den Drüsenorganen stattfindet.

Es deutete außerdem alles darauf hin, dass der Zucker des *Ptt*-Nektars direkt im Nektarienparenchym produziert wird, und dass dafür ein apoplastischer Schritt notwendig ist, der gleichzeitig über das „Source und Sink“ Verhältnis den Nachschub von Saccharose ins Nektarienparenchym reguliert.

### **Nektar-Sekretion:**

Die unterschiedlichen Hauptsekretionsarten der beiden Pappeln konnten ebenfalls gezeigt werden. Während *Ptt*-Nektar eindeutig granulokrin sekretiert wird, konnte dieser Weg für *Ptr* ausgeschlossen werden. Deshalb scheint *Ptr* holokrine Sekretion zu bevorzugen.

In *Ptt* fanden sich außerdem Belege für eine parallel ablaufende ekkrine Sekretion. Hierfür wird die initiale Abgabe osmotisch wirksamer Substanzen und nachfolgend Wasser vorausgesetzt. Der Anionenkanal PttSLAH3 zeigte sich, ausgehend von der Anionenzusammensetzung des Nektars und der Lokalisation des Proteins in den epidermalen Drüsenzellen als optimales Transportprotein für diesen Schritt. Die typischen Eigenschaften eines S-Typ-Anionenkanals vom Typ des Arabidopsis-SLAH3, wie Nitratabhängigkeit und spezifische Anionenpermeabilität wiesen darauf hin, dass PttSLAH3 für die finale „nasse“ Sekretion verantwortlich sein kann.

Im Unterschied zu AtSLAH3 scheint die Aktivierung von PttSLAH3 allerdings auf andere Weise zu erfolgen. Denn im Gegensatz zum Arabidopsis-Ortholog, zeigte PttSLAH3 in *Xenopus*-Oozyten bereits ohne koexprimierte Kinase Aktivität. Grundsätzlich konnte eine Aktivierung durch Phosphorylierung aber nicht ausgeschlossen werden. Es deutete vielmehr alles darauf hin, dass bereits Oozyten-endogene Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von PttSLAH3 spielen. Eine entsprechende Phosphorylierungsstelle konnte jedoch nicht ausgemacht werden. Allerdings deuteten die Ergebnisse im Weiteren darauf hin, dass die unterschiedliche Struktur der AtSLAH3- und PttSLAH3-Termini, im Besonderen die des N-Terminus, für die konstitutive Aktivität des Pappel-Kanals verantwortlich ist. Damit kommt PttSLAH3 eine Sonderstellung innerhalb der SLAC/SLAH-Familie zu, die weiterer Untersuchungen bedarf.

## 6. Summary

In this study extrafloral nectaries (EFN) of *Populus trichocarpa* (*Ptr*) and *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (*Ptt*) were analyzed in terms of their functional properties regarding indirect defense against herbivores. The findings can be summarized as follows:

### **Nectary function and regulation:**

Both EFN-types were able to protect poplar leaves from damage by herbivores. This finding was confirmed in *Ptr* as well as *Ptt*, by continuous visits of various insect species, particularly ants and bees. Protection mediated by these visitors could be confirmed with interaction studies using bees, in which the presence of bees led to a significant reduction of leaf herbivory (*Ptr* and *Ptt*).

Although both plants belong to the same genus (*Populus*), it turned out that *Ptr* and *Ptt* have developed different EFN-based herbivore defense strategies. While *Ptt*-EFN are constitutively present and secreting, *Ptr* plants revealed nectary and nectar formation only upon herbivore attack. However, herbivore-specific elicitors, may be responsible for the induction in *Ptr*. Even though the release of herbivore-induced volatile organic compounds (VOCs) could be identified as jasmonic acid-dependent, the jasmonic acid signaling pathway, in contrast to studies with lima bean, could be excluded for triggering extrafloral nectar secretion in *Ptr*. Therefore, regulation of *Ptr*-EFN-based herbivore defense is very likely controlled via an interaction of several hormones.

This finding was confirmed by transcriptome analysis in *Ptt*-nectaries, where jasmonic acid, auxin and salicylic acid appeared to be involved. In addition, various differentially regulated gene clusters associated with nectary function, development and biotic stress, clearly indicated the crucial role of extrafloral nectaries regarding herbivore defense.

### **Nectar production:**

The analysis of extrafloral nectar proteins and associated transcripts revealed that nectar of both species is composed from a similar blend of antimicrobial proteins. In addition, it seems that in both species these proteins are synthesized predominantly in the nectaries themselves.

Moreover, *Ptt*-nectar-specific sugar production appears to be executed mainly in the nectary parenchyma. There an apoplastic step is required to process sucrose, provided by the phloem, which as a result regulates the source and sink relationship and thereby maintains sucrose supplies.

**Nectar secretion:**

For both poplars two different secretion types could be confirmed. While *Ptt* nectar is secreted clearly granulocrine, this secretion type could be excluded for *Ptr*. Therefore, *Ptr* seems to prefer holocrine secretion.

In the case of *Ptt* evidences of a possible parallel eccrine secretion could be found. Prerequisite is an initial release of osmotically active substances followed by water efflux. Starting with anion composition of the nectar and the localization of the protein in the epidermal nectary cells, one might suggest that the anion channel PttSLAH3 is an optimal transport protein for this initial step. The observed biophysical characteristics, such as nitrate dependency and specific anion permeability, were typical of an S-type anion channel like SLAH3 in Arabidopsis. This indicated that PttSLAH3 may be responsible for such a “wet” secretion in *Ptt*.

However, in contrast to AtSLAH3, PttSLAH3 seems to be activated differently. Unlike the Arabidopsis-orthologe, PttSLAH3 expressed in *Xenopus* oocytes revealed channel activity, even in the absence of co-expressed kinases. However, phosphorylation by specific kinases could not be excluded in general. Instead, all of the available evidence suggests that oocyte endogenous kinases play a crucial role in the activation of PttSLAH3, although no corresponding phosphorylation site could be identified. Nevertheless, the results are indicating that structural differences of the AtSLAH3- and PttSLAH3-termini, in particular the N-terminus, are responsible for the constitutive activity of the poplar channel. Therefore PttSLAH3 takes on a special position within the SLAC/SLAH-family, however further investigations are necessary.

## 7. Anhang

### 7.1. Literaturverzeichnis

- Allaway WG** (1973) Accumulation of malate in guard cells of *Vicia-Faba* during stomatal opening. *Planta* **110**: 63-70
- Almeida AM, Figueiredo RA** (2003) Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Braz J Biol* **63**: 551-558
- An Q, van Bel AJ, Huckelhoven R** (2007) Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? *Plant signaling & behavior* **2**: 4-7
- An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB** (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **10**: 107-121
- Arabidopsis Genome I** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Arimura G, Huber DP, Bohlmann J** (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa x deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **37**: 603-616
- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J** (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**: 512-515
- Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA** (2006) Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science* **311**: 812-815
- Bankaitis VA, Mousley CJ, Schaaf G** (2010) The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in biochemical sciences* **35**: 150-160
- Bashkirov PV, Akimov SA, Evseev AI, Schmid SL, Zimmerberg J, Frolov VA** (2008) GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* **135**: 1276-1286

- Bassham DC, Brandizzi F, Otegui MS, Sanderfoot AA** (2008) The secretory system of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **6**: e0116
- Bentley BL** (1977) Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**: 408-427
- Bhat RA, Lahaye T, Panstruga R** (2006) The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant methods* **2**: 12
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44
- Boland W, Hopke J, Donath J, Nuske J, Bublitz F** (1995) Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **34**: 1600-1602
- Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R** (2000) Emerging model systems in plant biology: Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 306-313
- Camarasa C, Bidard F, Bony M, Barre P, Dequin S** (2001) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4144-4151
- Chamberlain SA, Holland JN** (2009) Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**: 2384-2392
- Chandran V, Stollar EJ, Lindorff-Larsen K, Harper JF, Chazin WJ, Dobson CM, Luisi BF, Christodoulou J** (2006) Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *Journal of molecular biology* **357**: 400-410
- Chen F, D'Auria JC, Tholl D, Ross JR, Gershenzon J, Noel JP, Pichersky E** (2003) An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **36**: 577-588
- Chen YH, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum SA, Hendrickson WA** (2010) Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* **467**: 1074-1080

- Choh Y, Kugimiya S, Takabayashi J** (2006) Induced production of extrafloral nectar in intact lima bean plants in response to volatiles from spider mite-infested conspecific plants as a possible indirect defense against spider mites. *Oecologia* **147**: 455-460
- Choh Y, Takabayashi J** (2006) Herbivore-induced extrafloral nectar production in lima bean plants enhanced by previous exposure to volatiles from infested conspecifics. *Journal of chemical ecology* **32**: 2073-2077
- Coello P, Hey SJ, Halford NG** (2011) The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of experimental botany* **62**: 883-893
- D'Souza-Schorey C, Chavrier P** (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 347-358
- Danner H, Boeckler GA, Irmisch S, Yuan JS, Chen F, Gershenzon J, Unsicker SB, Kollner TG** (2011) Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry*
- Dauwalder M, Whaley WG** (1982) Membrane assembly and secretion in higher-plants. *Journal of ultrastructure research* **78**: 302-320
- Donaldson JR, Lindroth RL** (2007) Genetics, environment, and their interaction determine efficacy of chemical defense in trembling aspen. *Ecology* **88**: 729-739
- Dreyer I, Gomez-Porrás JL, Riano-Pachon DM, Hedrich R, Geiger D** (2012) Molecular evolution of slow and quick anion channels (SLACs and QUACs/ALMTs). *Front Plant Sci* **3**: 263
- Elias TS** (1983) Extrafloral nectaries: their structure and distribution. *In* ET Bentley B, ed, *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, NY, USA, pp 174–203
- Erb M, Meldau S, Howe GA** (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in plant science* **17**: 250-259
- Escalante-Pérez M** (2009) Poplar responses to biotic and abiotic stress. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Escalante-Pérez M, Heil M** (2012a) Nectar secretion: Its ecological context and physiological regulation. *In* JMaB Vivanco, F., ed, *Secretions and exudates in biological systems, signaling and communication in plants* 12. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 283

- Escalante-Pérez M, Heil M** (2012b) The production and protection of nectars. *In* ULe al., ed, Progress in Botany. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 239-261
- Escalante-Pérez M, Jaborsky M, Lautner S, Fromm J, Muller T, Dittrich M, Kunert M, Boland W, Hedrich R, Ache P** (2012a) Poplar extrafloral nectaries: two types, two strategies of indirect defenses against herbivores. *Plant physiology* **159**: 1176-1191
- Escalante-Pérez M, Jaborsky M, Reinders J, Kurzai O, Hedrich R, Ache P** (2012b) Letter to the editor: Poplar extrafloral nectar is protected against plant and human pathogenic fungus. *Molecular plant*
- Evert RF** (2006a) Chapter 2. The protoplast: plasma membrane, nucleus, and cytoplasmic organelles. *In* Esau's plant anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body: the structure, function, and development., Ed 3rd. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey
- Evert RF** (2006b) Chapter 16. External secretory structures. *In* Esau's plant anatomy: Meristems, cells, and tissues of the plant body: the structure, function, and development., Ed 3rd. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey
- Fahn A** (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229-257
- Finkel A, Gage P** (1985) Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. *In*: Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW, eds. Voltage and patch clamping with microelectrodes. Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co.: 47-94
- Geiger D, Becker D, Lacombe B, Hedrich R** (2002) Outer pore residues control the H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> sensitivity of the *Arabidopsis* potassium channel AKT3. *The Plant cell* **14**: 1859-1868
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R** (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science signaling* **4**: ra32
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R** (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 8023-8028



- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 21425-21430
- Gonzalez-Teuber M, Silva Bueno JC, Heil M, Boland W** (2012) Increased host investment in extrafloral nectar (EFN) improves the efficiency of a mutualistic defensive service. *PloS one* **7**: e46598
- Gudesblat GE, Russinova E** (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Current opinion in plant biology* **14**: 530-537
- Gundersen CB, Miledi R, Parker I** (1983) Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**: 131-140
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G** (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**: 177-182
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant molecular biology* **49**: 373-385
- Hampton M, Xu WW, Kram BW, Chambers EM, Ehrnriter JS, Gralewski JH, Joyal T, Carter CJ** (2010) Identification of differential gene expression in *Brassica rapa* nectaries through expressed sequence tag analysis. *PloS one* **5**: e8782
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C** (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**: 7278-7287
- Harper JF, Huang JF, Lloyd SJ** (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**: 7267-7277
- Harper S, Speicher DW** (2008) Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 6**: Unit 6 6
- Hedrich R** (2012) Ion channels in plants. *Physiol Rev* **92**: 1777-1811
- Hedrich R, Busch H, Raschke K** (1990) Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO journal* **9**: 3889-3892
- Heil M** (2004) Direct defense or ecological costs: responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild Lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of chemical ecology* **30**: 1289-1295

- Heil M** (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *The New phytologist* **178**: 41-61
- Heil M** (2011) Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science* **16**: 191-200
- Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE** (2000) Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology* **14**: 749-757
- Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W, Linsenmair K** (2001) Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1083-1088
- Heil M, McKey D** (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**: 425-553
- Heil M, Rattke J, Boland W** (2005) Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science* **308**: 560-563
- Heil M, Silva Bueno JC** (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5467-5472
- Herrera CM, Canto A, Pozo MI, Bazaga P** (2010) Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proc Biol Sci* **277**: 747-754
- Holopainen JK** (2011) Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? *Tree physiology* **31**: 1356-1377
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology* **132**: 666-680
- Hrabak EM, Dickmann LJ, Satterlee JS, Sussman MR** (1996) Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **31**: 405-412
- Humble GD, Raschke K** (1971) Stomatal opening quantitatively related to potassium transport - evidence from electron probe analysis. *Plant physiology* **48**: 447-&

- Imlau A, Truernit E, Sauer N** (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant cell* **11**: 309-322
- Jansson S, Douglas CJ** (2007) *Populus*: a model system for plant biology. Annual review of plant biology **58**: 435-458
- Javot H, Maurel C** (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of botany* **90**: 301-313
- Jurgens G, Geldner N** (2002) Protein secretion in plants: from the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* **3**: 605-613
- Kachroo A, Kachroo P** (2007) Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. *Genetic engineering* **28**: 55-83
- Kaczorowski RL, Juenger TE, Holtsford TP** (2008) Heritability and correlation structure of nectar and floral morphology traits in *Nicotiana glauca*. *Evolution; international journal of organic evolution* **62**: 1738-1750
- Katayama N, Suzuki N** (2004) Role of extrafloral nectaries of *Vicia faba* in attraction of ants and herbivore exclusion by ants. *Entomological Science* **7**: 119-124
- Kessler A, Baldwin IT** (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S** (2009) *Physiologie*, Vol 6. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Kobe B, Deisenhofer J** (1995) Proteins with leucine-rich repeats. *Current opinion in structural biology* **5**: 409-416
- Kost C, Heil M** (2005) Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology* **6**: 237-248
- Kost C, Heil M** (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology* **94**: 619-628
- Kost C, Heil M** (2008) The defensive role of volatile emission and extrafloral nectar secretion for lima bean in nature. *Journal of chemical ecology* **34**: 1-13
- Kram BW, Bainbridge EA, Perera MA, Carter C** (2008) Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant molecular biology* **68**: 173-183

- Kram BW, Xu WW, Carter CJ** (2009) Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC plant biology* **9**: 92
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N** (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**: 95-125
- Kunert M, David A, Becher J, Boland W** (2009) Volatile sampling from biological sources by the closed-loop-stripping technique. *Cold Spring Harb Protoc* **2009**: pdb prot5233
- Kyhse-Andersen J** (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment* **26**: 37-56
- Lawrence SD, Dervinis C, Novak N, Davis JM** (2006) Wound and insect herbivory responsive genes in poplar. *Biotechnology letters* **28**: 1493-1501
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S** (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**: 21419-21424
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM** (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300-303
- Ligaba A, Kochian L, Pinerros M** (2009) Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60**: 411-423
- Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T** (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends in biochemical sciences* **17**: 114-119
- Linder B, Raschke K** (1992) A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS letters* **313**: 27-30

- Linsenmair KE, Heil M, Kaiser WM, Fiala B, Koch T, Boland W** (2001) Adaptations to biotic and abiotic stress: *Macaranga*-ant plants optimize investment in biotic defence. *Journal of experimental botany* **52**: 2057-2065
- Louis J, Singh V, Shah J** (2012) *Arabidopsis thaliana*-Aphid Interaction. *Arabidopsis Book* **10**: e0159
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD** (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of experimental botany* **55**: 181-188
- Maffei M, Bossi S, Spiteller D, Mithofer A, Boland W** (2004) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant physiology* **134**: 1752-1762
- Maierhofer T** (2012) Funktionelle Charakterisierung von SLAC1-homologen Anionenkanälen aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Major IT, Constabel CP** (2008) Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant physiology* **146**: 888-903
- Markl H, Tautz J** (1975) Sensitivity of hair receptors in caterpillars of *Barathra-Brassicae L.* (Lepidoptera, Noctuidae) to particle movement in a sound field. *Journal of Comparative Physiology* **99**: 79-87
- Mathews CR, Brown MW, Bottrell DG** (2007) Leaf extrafloral nectaries enhance biological control of a key economic pest, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), in peach (Rosales: Rosaceae). *Environmental entomology* **36**: 383-389
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT** (2012) Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of botany* **110**: 1503-1514
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W** (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant molecular biology* **47**: 239-274
- Mithöfer A, Boland W** (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*
- Mithöfer A, Wanner G, Boland W** (2005) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant physiology* **137**: 1160-1168

- Mondor EB, Addicott JF** (2003) Conspicuous extra-floral nectaries are inducible in *Vicia faba*. *Ecol Lett* **6**: 495-497
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Naidoo Y, Karim T, Heneidak S, Sadashiva CT, Naidoo G** (2012) Glandular trichomes of *Ceratotheca triloba* (Pedaliaceae): morphology, histochemistry and ultrastructure. *Planta* **236**: 1215-1226
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M** (2001) DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **25**: 213-221
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K** (2008) CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**: 483-486
- Nepi M, Stpiczynska M** (2007) Nectar resorption and translocation in *Cucurbita pepo* L. and *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.). *Plant biology* **9**: 93-100
- Nepi M, Stpiczynska M** (2008) The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Die Naturwissenschaften* **95**: 177-184
- Nicolson SW, Thornburg RW** (2007) Nectar Chemistry. In SW Nicolson, M Nepi, E Pacini, eds, *Nectaries and Nectar*. Springer
- Norholm MH** (2010) A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol* **10**: 21
- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Norholm MH, Jensen JK, Halkier BA** (2006) Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res* **34**: e122
- Osier TL, Hwang SY, Lindroth RL** (2000) Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecological Entomology* **25**: 197-207
- Overall RL, Blackman LM** (1996) A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends in plant science* **1**: 307-311
- Pacini E, Nepi M** (2007) Nectar Production and Presentation. In SW Nicolson, E Pacini, M Nepi, eds, *Nectaries and Nectar*. Springer, pp 167-214

- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL** (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7-21
- Painter RH** (1958) Resistance of Plants to Insects. *Annual Review of Entomology* **3**: 267-290
- Palmer TM, Stanton ML, Young TP, Goheen JR, Pringle RM, Karban R** (2008) Breakdown of an ant-plant mutualism follows the loss of large herbivores from an African Savanna. *Science* **319**: 192-195
- Pemberton RW** (1992) Fossil extrafloral nectaries, evidence for the ant-guard antiherbivore defense in an oligocene *Populus*. *American Journal of Botany* **79**: 1242-1246
- Petanidou T, Goethals V, Smets E** (2000) Nectary structure of Labiatae in relation to their nectar secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community - Does flowering time matter? *Plant Systematics and Evolution* **225**: 103-118
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 489-521
- Poulsen LR, Lopez-Marques RL, McDowell SC, Okkeri J, Licht D, Schulz A, Pomorski T, Harper JF, Palmgren MG** (2008) The *Arabidopsis* P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *The Plant cell* **20**: 658-676
- Radhika V, Kost C, Bartram S, Heil M, Boland W** (2008) Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta* **228**: 449-457
- Ralph S, Oddy C, Cooper D, Yueh H, Jancsik S, Kolosova N, Philippe RN, Aeschliman D, White R, Huber D, Ritland CE, Benoit F, Rigby T, Nantel A, Butterfield YS, Kirkpatrick R, Chun E, Liu J, Palmquist D, Wynhoven B, Stott J, Yang G, Barber S, Holt RA, Siddiqui A, Jones SJ, Marra MA, Ellis BE, Douglas CJ, Ritland K, Bohlmann J** (2006) Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa x deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Molecular Ecology* **15**: 1275-1297
- Regier N, Frey B** (2010) Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol* **11**: 57

- Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **37**: 578-588
- Roos A, Boron WF** (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* **61**: 296-434
- Röse USR, Lewis JD, Tumlinson JH** (2006) Extrafloral nectar from cotton (*Gossypium hirsutum*) as a food source for parasitic wasps. *Functional Ecology* **20**: 67-74
- Ruhmann JM, Kram BW, Carter CJ** (2010) CELL WALL INVERTASE 4 is required for nectar production in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **61**: 395-404
- Sampedro J, Cosgrove DJ** (2005) The expansin superfamily. *Genome biology* **6**: 242
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467
- Sasu MA, Wall KL, Stephenson AG** (2010) Antimicrobial nectar inhibits a florally transmitted pathogen of a wild *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* **97**: 1025-1030
- Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI** (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**: 9535-9539
- Schmidt C, Schroeder JI** (1994) Anion selectivity of slow anion channels in the plasma membrane of guard cells (large nitrate permeability). *Plant physiology* **106**: 383-391
- Schopfer P, Brennicke A** (2006) *Pflanzenphysiologie*, Vol 6. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5025-5029
- Schüler G, Goerls H, Boland W** (2001) 6-Substituted indanoyl isoleucine conjugates mimic the biological activity of coronatine. *European Journal of Organic Chemistry*: 1663-1668
- Schüler G, Mithofer A, Baldwin IT, Berger S, Ebel J, Santos JG, Herrmann G, Holscher D, Kramell R, Kutchan TM, Maucher H, Schneider B, Stenzel I, Wasternack C, Boland W** (2004) Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS letters* **563**: 17-22



- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **46**: 941-950
- Shan X, Yan J, Xie D** (2012) Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current opinion in plant biology* **15**: 84-91
- Shimomura O** (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of microscopy* **217**: 1-15
- Sonwa MM, Kost C, Biedermann A, Wegener R, Schulz S, Boland W** (2007) Dehydrogenation of ocimene by active carbon: artefact formation during headspace sampling from leaves of *Phaseolus lunatus*. *Arkivoc*: 164-172
- Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P** (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1456-1461
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A** (2004) Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of botany* **93**: 87-95
- Svoboda J, Boland W** (2010) Plant defense elicitors: analogues of jasmonoyl-isoleucine conjugate. *Phytochemistry* **71**: 1445-1449
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2917-2921
- Tautz J** (1977) Reception of medium vibration by thoracal hairs of caterpillars of *Barathra-brassicae* L (Lepidoptera, Noctuidae) .I. Mechanical-properties of receptor hairs. *Journal of Comparative Physiology* **118**: 13-31
- Tautz J, Markl H** (1978) Caterpillars detect flying wasps by hairs sensitive to airborne vibration. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **4**: 101-110
- Tautz J, Rostas M** (2008) Honeybee buzz attenuates plant damage by caterpillars. *Current biology : CB* **18**: 1125-1126
- Taylor G** (2002) *Populus*: arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? *Annals of botany* **90**: 681-689
- Trelease W** (1881) The foliar nectar glands of *Populus*. *Botanical Gazette* **6**: 284-290

- Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS** (1995) Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *American Journal of Physiology* **268**: C1173-1178
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17588-17593
- Unsicker SB, Kunert G, Gershenzon J** (2009) Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology* **12**: 479-485
- Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, Stitt M** (2009) A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant, cell & environment* **32**: 1211-1229

- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487-491
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135-162
- Vassilyev AE** (2010) On the mechanisms of nectar secretion: revisited. *Annals of botany* **105**: 349-354
- Vesprini JL, Nepi M, Ciampolini F, Pacini E** (2008) Holocrine secretion and cytoplasmic content of *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae) nectar. *Plant biology* **10**: 268-271
- Vitart V, Christodoulou J, Huang JF, Chazin WJ, Harper JF** (2000) Intramolecular activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. *Biochemistry* **39**: 4004-4011
- Wachter RM, Elsliger MA, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ** (1998) Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **6**: 1267-1277
- Wäckers FL, van Rijn PCJ, Bruin J** (2005) Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications. *In*. ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **40**: 428-438
- War AR, Sharma HC, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S** (2011) Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant signaling & behavior* **6**: 1973-1978
- Weber MG, Keeler KH** (2012) The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. *Annals of botany*
- Wist TJ, Davis AR** (2006) Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of botany* **97**: 177-193

- Wooley SC, Donaldson JR, Stevens MT, Gusse AC, Lindroth RL** (2007) Extrafloral nectaries in aspen (*Populus tremuloides*): heritable genetic variation and herbivore-induced expression. *Annals of botany* **100**: 1337-1346
- Wu J, Baldwin IT** (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual review of genetics* **44**: 1-24
- Yunta C, Martinez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A** (2011) The structure of *Arabidopsis thaliana* OST1 provides insights into the kinase regulation mechanism in response to osmotic stress. *Journal of molecular biology* **414**: 135-144
- Zarsky V, Cvrckova F, Potocky M, Hala M** (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *The New phytologist* **183**: 255-272
- Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y, He Z** (2007) Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant physiology* **145**: 450-464
- Zhao JP, Su XH** (2010) Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. *Planta* **232**: 949-962
- Zhou C, Yang Y, Jong AY** (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**: 172-173
- Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M** (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *The Journal of biological chemistry* **276**: 6313-6319
- Zuo R, Hu R, Chai G, Xu M, Qi G, Kong Y, Zhou G** (2012) Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*). *Mol Biol Rep* **40**: 2645-2662

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Nektar-Sekretionstypen.....	10
Abbildung 1.2: Vergleich von Position, Form und Nektar-Sekretion extrafloraler Nektarien von <i>Ptr</i> und <i>Ptt</i> .....	18
Abbildung 1.3: Unterschiedliche Morphologie von <i>Ptr</i> - und <i>Ptt</i> -EFN.....	19
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Mutagenese.....	40
Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau Semi-Dry-Western-Blot.....	55
Abbildung 2.3: DEVC-Messprinzip/Messaufbau.....	61
Abbildung 2.4: Standard-Spannungspulsprotokoll.....	63
Abbildung 3.1: Entwicklung neuer <i>Ptr</i> -EFN neben alten, toten Nektarien.....	68
Abbildung 3.2: Nektar-Sekretion an <i>Ptr</i> -Blättern ist Herbivoren-abhängig.....	69
Abbildung 3.3: Von <i>Ptr</i> freigesetzte VOCs nach simuliertem bzw. realem Herbivorenbefall.....	72
Abbildung 3.4: Besucher extrafloraler Nektarien von <i>Ptr</i> und <i>Ptt</i> .....	73
Abbildung 3.5: Verringerter Fraßschaden an <i>Ptr</i> und <i>Ptt</i> durch <i>Spodoptera exigua</i> bei Anwesenheit von Bienen.....	75
Abbildung 3.6: Kategorisierung der 500 am stärksten differenziell exprimierten Gene, EFN vs. Blatt.....	78
Abbildung 3.7: An biotischem Stress beteiligte Genklassen sind in Nektarien hauptsächlich induziert.....	82
Abbildung 3.8: Chlorid und Nitrat dominieren die <i>Ptt</i> -Nektar Anionenzusammensetzung.....	91
Abbildung 3.9: Kladogramm aller SLAC-Homologen aus Arabidopsis und Pappel.....	92
Abbildung 3.10: Vergleich von Arabidopsis- und Pappel-SLAH3.....	93
Abbildung 3.11: <i>Ptt</i> SLAH3-Expression in verschiedenen Pappelgeweben.....	94
Abbildung 3.12: <i>Ptt</i> SLAH3-Antikörper Spezifität.....	95
Abbildung 3.13: <i>In situ</i> Immunlokalisierung belegt die vorwiegende Expression von <i>Ptt</i> SLAH3 in den sekretorischen Drüsenzellen von <i>Ptt</i> -EFN.....	96
Abbildung 3.14: Nitrat-abhängige Aktivierung von <i>Ptt</i> SLAH3.....	97
Abbildung 3.15: Nitrat-Selektivität von <i>Ptt</i> SLAH3.....	98
Abbildung 3.16: Nitratpermeabilität mit annähernd Nernst'schem Verhalten.....	99
Abbildung 3.17: Kationen-Unabhängigkeit.....	100
Abbildung 3.18: Chlorid-, Nitrat- und Spannungsabhängigkeit von <i>Ptt</i> SLAH3.....	101
Abbildung 3.19: Relative Offenwahrscheinlichkeit (rel. $P_O$ ) von <i>Ptt</i> SLAH3.....	102

Abbildung 3.20: PttSLAH3-Aktivität und -Permeabilität sind unabhängig vom externen pH. ....	103
Abbildung 3.21: Gesteigerte Kanalaktivität nach zytosolischer Acidifizierung. ....	104
Abbildung 3.22: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Arabidopsis CPKs. ....	105
Abbildung 3.23: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Arabidopsis SnRKs. ....	107
Abbildung 3.24: Keine Steigerung der PttSLAH3-Aktivität durch Pappel CPK21 oder OST1. ....	108
Abbildung 3.25: PttSLAH3-Aktivitätsminderung durch Kinaseinhibitor K252a. ....	109
Abbildung 3.26: Threonin <sup>119</sup> besitzt in PttSLAH3 nicht die entscheidende Kanalaktivierende Bedeutung wie in Arabidopsis. ....	110
Abbildung 3.27: SLAH3-Chimären. ....	111
Abbildung 3.28: BiFC-basierende Interaktion von SLAH3-Chimären und AtCPK21d. ....	112
Abbildung 3.29: Kanalaktivität von Pappel- und Arabidopsis-SLAH3-Chimären mit und ohne koexprimierte AtCPK21d. ....	113
Abbildung 3.30: Interaktion (BiFC) und Aktivität (DEVC) von Pappel- und Arabidopsis-SLAH3-Chimären im Zusammenhang mit AtCPK21d. ....	114
Abbildung 4.1: Hauptsächlich der N-Terminus ist für die unterschiedliche Kinaseabhängige Aktivierung von PttSLAH3 und AtSLAH3 verantwortlich. ....	133

### 7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten USER-Vektoren.....	39
Tabelle 2.2: Standardprotokoll qPCR.....	45
Tabelle 2.3: Reaktionsansatz IVT .....	50
Tabelle 2.4: Mastermix A für IVT.....	51
Tabelle 2.5: Injizierte cRNA-Lösungen. ....	59
Tabelle 3.1: Validierung der Microarray-Daten durch qPCR. ....	77
Tabelle 3.2: Klasse der dem Zellwand-Metabolismus zugeordneten besonders induzierten Gene.....	79
Tabelle 3.3: Klasse der dem Hormon-Metabolismus zugeordneten besonders induzierten Gene.....	81
Tabelle 3.4: <i>Ptr</i> und <i>Ptt</i> zeigen eine ähnliche Zusammensetzung antimikrobieller Nektar- Proteine.....	84
Tabelle 3.5: Kohlenhydrat-Metabolismus und -Transport in extrafloralen <i>Ptt</i> -Nektarien.....	85
Tabelle 3.6: Identifizierte, an Exocytose beteiligte Gene deuten auf granulokrine Sekretion in <i>Ptt</i> -Nektarien hin. ....	87
Tabelle 3.7: <i>Ptr</i> -EFN-Sekretion erfolgt nicht über Exocytose.....	89

## 7.4. Verwendete Medien und Lösungen

### 7.4.1. Allgemeine Medien

#### Künstliches Raupenfutter:

Zur Herstellung von Nahrung für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Insektenlarven wurden 500 ml H<sub>2</sub>O auf 98 °C erhitzt und unter ständigem Rühren folgende Zutaten eingearbeitet:

Agar agar (700-800 Gel)	18.3 g
kaltes H <sub>2</sub> O	260 ml
=> Temperaturerniedrigung auf ca. 70 °C	
Pflanzenöl (Speiseöl)	500 µl
Wesson´s Salt Mix	580 mg
Sorbinsäure (>99 %)	3 g
4-Hydroxybenzoesäuremethylester (99 %) 15 %ig in Ethanol	2,5 ml
Formaldehyd (37 %iges) 10 %ig in Methanol	2 ml
L-Leucin (99%)	417 mg
L-(+)-Ascorbinsäure (99%)	3,3 g
Ain Vitamin Mixture 76 (ICN Biomedicals GmbH)	3,08 g
Bierhefe (Reformhaus)	33 g
Luzerneblattpulver	15 g
Bohnenmehl (getrocknete Kidneybohnen)	111 g

#### PamII (Wachstumsmedium Pflanzen):

MS Medium + MES mit Vitaminen	2,45 g
Saccharose	20 g
Agar Dänisch	10 g
mit KOH auf pH 5,8 einstellen	
=> autoklavieren	
BAP (Cytokinin, 0,25 mg / ml 1 / 10 EtOH/H <sub>2</sub> O)	0,8 ml / l
IBA (Auxin, 0,5mg / ml 1 / 10 EtOH/H <sub>2</sub> O)	20 µl / l
Glutamin (0,25g / 10ml)	8 ml / l
Cefotaxim (0,25g / ml)	1 ml / l



## 7.4.2. Fixierlösungen für Immunfluoreszenz-Markierung

### PIPES-Puffer:

PIPES	50 mM
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	5 mM
EGTA	5 mM
mit KOH auf pH 6,9 einstellen	

### Fixativ:

Formaldehyd	3,7 % (w/v)
in PIPES-Puffer	

### PBS:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	150 mM
pH auf 7,4 einstellen	

## 7.4.3. Molekularbiologie

### Agarose-Gel (1-3 %):

Agarose	1-3 % (w/v)
1x TBE/TAE	400 ml
aufkochen => 60 °C abkühlen	
Ethidiumbromid/GelGreen	4 µl / 20 µl

### 25x TAE-Puffer (Tris-Aacetat-EDTA-Puffer):

Tris	484 g
Essigsäure	114,2 ml
EDTA	74,4 g
pH >8,0; anschließend filtrieren (Nutsche)	

**10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer):**

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA, pH 8,0	20 mM
pH 8,3; anschließend filtrieren (Nutsche)	

**5x DNA-Probenpuffer:**

Glycerin	50 % (w/v)
EDTA	100 mM
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)
in ddH <sub>2</sub> O	

**10x MEN-Puffer:**

MOPS (pH7; NaOH)	200 mM
Na-Acetat	50 mM
Na-EDTA	5 mM
in ddH <sub>2</sub> O	

**RNA-Probenpuffer:**

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

**TE-Puffer (Tris-EDTA\_Puffer):**

Tris (pH8, HCL)	10 mM
EDTA	1 mM
in ddH <sub>2</sub> O	

**TENS-Lysis-Puffer:**

TE-Puffer	9,4 ml
SDS (10 %)	500 µl
NaOH (10 M)	100 µl
RNase	200 µg / ml

**LB-Medium:**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
in 1 Liter ddH <sub>2</sub> O	

**für Selektionsplatten**      Agar-Agar, Kobe I      1,5 %

**LB<sub>Amp</sub>-Medium:**

LB-Medium	
Ampicillin	50 µg / ml

**LB<sub>Amp-Cam</sub>-Medium:**

LB-Medium	
Ampicillin	50 µg / ml
Chloramphenicol	50 µg / ml

**7.4.4. Lösungen für biochemische Methoden****PBS-Puffer (10x):**

NaCl	1,4 M
KCl	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM
für 1x Puffer auf pH 7,3-7,4 einstellen	

**GST-Equilibrierungs- und Waschpuffer:**

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
mit HCl auf pH 7,5 einstellen	

**GST-Elutionspuffer:**

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Reduziertes Glutathion	10 mM
Mit HCl auf pH 8 einstellen	

**Protein-Probenpuffer (6x):**

Tris/HCl pH 6,8	500 mM
SDS	20 % (v/v)
Glycerin	24 % (v/v)
Bromphenolblau	0,012 % (v/v)
DTT	200 mM
β-Mercaptoethanol	9 % (v/v)

**Coomassielösung:**

Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)
Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

**Anodenpuffer 1:**

Tris	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

**Anodenpuffer 2:**

Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

**Kathodenpuffer:**

Tris	25 mM
Aminocaprinsäure	40 mM
Methanol	20 % (v/v)

**Magermilch-Blockpuffer:**

Magermilchpulver	5 % (w/v)
Tween-20	0,05 % (v/v)
in PBS-Puffer	

**7.4.5. Lösungen für elektrophysiologische Charakterisierung****ND96-Lösung:**

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES pH7,4	10 mM
Gentamycin	100 µg / ml
mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen	

**Messlösungen:**

Für die elektrophysiologische Charakterisierung von PttSLAH3, Mutanten- und Chimären-Kanälen wurden folgende Messlösungen hergestellt und verwendet.

**Standard-Messlösungen:**

Natriumsalz des entsprechenden Anions (NaNO <sub>3</sub> , NaCl, NaGluconat)	100 mM
Calciumgluconat	1 mM
Magnesiumgluconat	1 mM
Mes	10 mM
auf pH 5,6 eingestellt mit 1 M Tris	
mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen	

Für Kontrollmessungen der hier untersuchten Anionenkanäle wurde die auf 100 mM NaGluconat basierende Messlösung verwendet, da S-Typ-Anionenkanäle für dieses Anion nicht permeable sind. Deswegen wurde außerdem zur Herstellung von Messlösungen mit reduzierter Anionenkonzentration (1, 3, 10, 30 mM NO<sub>3</sub>, bzw. 3, 10 mM Cl) das entsprechende Anion (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bzw. Cl<sup>-</sup>) durch Gluconat ersetzt. Um die Aktivität endogener

Oozytenkanäle zu vermeiden wurde den Messlösungen gegebenenfalls 1 mM Lanthanchlorid zugefügt.

**Abweichende Messlösungen für**

**Anionenselektivität:**

Natriumsalz des entsprechenden Anions (NaNO <sub>3</sub> , NaCl, NaCitrat, NaSuccinat, NaMalat, NaFumarat, NaGlutamat)	50 mM
Calciumgluconat	1 mM
Magnesiumgluconat	1 mM
Mes	10 mM
auf pH 5,6 eingestellt mit 1 M Tris mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen	

**Kationenselektivität:**

NaNO <sub>3</sub> bzw. KNO <sub>3</sub>	100 mM
Calciumgluconat	1 mM
Magnesiumgluconat	1 mM
Mes	10 mM
auf pH 5,6 eingestellt mit 1 M Tris mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen	

**externe pH-Abhängigkeit:**

NaNO <sub>3</sub>	100 mM
Calciumgluconat	1 mM
Magnesiumgluconat	1 mM
Tris	10 mM
auf pH 7,5 eingestellt mit 1 M Mes mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen	

**interne pH-Abhängigkeit:**

NaNO <sub>3</sub>	90 mM
NaAcetat	10 mM
Calciumgluconat	1 mM
Magnesiumgluconat	1 mM
Mes	10 mM

auf pH 5,6 eingestellt mit 1 M Tris

mit D-Sorbitol auf 220 mosmol / kg einstellen

## 7.5. Verwendete Primer

### 7.5.1. USER-Primer

#### Allgemeine USER-Primer:

Primer Bezeichnung	Sequenz
PttSLAH3user_fwd	5'-GGCTTAAUATGGGAAGTGATACTGCTGC-3'
PttSLAH3user_rev	5'-GGTTTAAUTCAATGACTGCTATCTGAGCTAGA-3'
PttSLAH3user_rev_oS	5'-GGTTTAAUCCATGACTGCTATCTGAGCTAGA-3'
PttSLAH3NTuser_rev_oS	5'-GGTTTAAUCCAAATGGCCATGTACTATCATCTG-3'
PttCPK21duser_fwd	5'-GGCTTAAUATGGGTTGTTGCGGTAGC-3'
PttCPK21duser_rev	5'-GGTTTAAUTTATCCTTCCTTAATCCATGGATG-3'
PttCPK21duser_rev_oS	5'-GGTTTAAUCCTCCTTCCTTAATCCATGGATG-3'
PttOST1user_fwd	5'-GGCTTAAUATGGATCGATCGGCGATGAC-3'
PttOST1user_rev	5'-GGTTTAAUTCACATTGCATATACTATCTCTCCACTGCT-3'
PttOST1user_rev_oS	5'-GGTTTAAUCCATTGCATATACTATCTCTCCACTGCT-3'

oS = Reverse-Primer ist so designt, dass am 3'-Ende des PCR-Fragments kein Stoppcodon entsteht und somit eine fortlaufende Translation für entsprechende Fusionsproteine (USER-Vektor #18, #20 und #22) möglich ist.

#### Amp-USER-Primer:

Primer Bezeichnung	Sequenz
Amp-USER_fwd	5'-AGACCCACGCUCACCGGCTC-3'
Amp-USER_rev	5'-AGCGTGGGTCUCGCGGTATC-3'

#### Mutagenese-User-Primer (2.4.2.7.1):

Primer Bezeichnung	Sequenz
PttSLAH3S119A_fwd	5'-AAGCATGGUCTGGGAAACTTGAGAGGCA-3'
PttSLAH3S119A_rev	5'-ACCATGCTUTGAAAGAATCATATCTTTTATCCTTTAAC-3'
PttSLAH3S119D_fwd	5'-AAGACTGGUCTGGGAAACTTGAGAGGCA-3'
PttSLAH3S119D_rev	5'-ACCAGTCTUTGAAAGAATCATATCTTTTATCCTTTAAC-3'



**Chimären-USER-Primer (2.4.2.7.2):**

<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
PttSLAH3-NT_fwd	5'-ACTCCGTUTTCCCATCTCTTCATTTCGGTATC-3'
PttSLAH3-NT_rev	5'-AACGGAGUAGAAATGGCCATGTACTATCATCTG-3'
PttSLAH3-CT_fwd	5'-ATTTGTCCUCCAGGACCTCTTCCCTAATGACCA-3'
PttSLAH3-CT_rev	5'-AGGACAAAUGCGTGCCTATTGTCGATACAA-3'
AtSLAH3-NT_fwd	5'-ACTCCGTUACCCCATTTCCACCTTCGGTATG-3'
AtSLAH3-NT_rev	5'-AACGGAGUAGAAACGGCCACTTTTTATCATTGG-3'
AtSLAH3-CT_fwd	5'-ATTTGTCCUCCGAGATCTTTTTCCCAATGACC-3'
AtSLAH3-CT_rev	5'-AGGACAAAUGCGTGGATAATGGTGGTCAC-3'

**7.5.2. Realtime Primer****Pappel-Aktin:**

<b>Öffentliche ID (NCBI)</b>	<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
GU385982	PtACT2fwd	5'-CCCAGAAGTCCTCTT-3'
	PtACT2rev	5'-ACTGAGCACAATGTTAC-3'

**Für Lokalisierung PttSLAH3 (3.3.2.2):**

<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
PtSLAH3RTfwd	5'-CTGCATCTAAAATTGTCG-3'
PtSLAH3RTrev	5'-GGTATCGGTCTACAGG-3'

**Für Validierung Microarray-Daten (3.2.1):**

<b>Öffentliche ID (NCBI)</b>	<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
CV242633	PtACCL10fwd PtACCL10rev	5'-GGCGAGGCAAGGGATTAG-3' 5'-TTGCAGTAAGCGATAAT-3'
BU825949	PtSABfwd PtSABrev	5'-GTCCACCAAGCGTGCTTA-3' 5'-CATGCACTTAGCAACATT-3'
CV276911	PtPIN288fwd PtPIN288rev	5'-TGTATACTTCCGGGAACC-3' 5'-CGGAACAAGATATAAGGC-3'
CV283544	PtSDRfwd PtSDRrev	5'-GGCGCATTCTTAGGCACT-3' 5'-GGGGTCAAACAACGTAG-3'
AJ744954.1	PtILR1fwd PtILR1rev	5'-TGGTAGGGGTAAGGAG-3' 5'-ATTCCTGCATAGCAA-3'
XP_002326709	PtPTR2fwd PtPTR2rev	5'-GGCCTTGTGATAGCAATA-3' 5'-CTAGCGAGATAGATGTCA-3'
CV246702	PtLysHisfwd PtLysHisrev	5'-TTGACTAAGCTAAATCCG-3' 5'-CAAGCTCCACATATCTGT-3'
AJ777538	PtCSY3fwd PtCSY3rev	5'-GATTCATCGAGGGTG-3' 5'-AAGCCTATCCGCATC-3'
CK093044	PtHCTfwd PtHCTrev	5'-TATCTAAGGTCAGCCC-3' 5'-AATAGTTTCATGTGTTTCAG-3'
XP_002315752	PtCLH2fwd PtCLH2rev	5'-TCTCAGCACTAATTGG-3' 5'-ACAACGAAATAACTAGCC-3'
CV249255	PtCI3fwd PtCI3rev	5'-CTCTAGATAGCGAATATG-3' 5'-TCTGATTGAAATAGACCT-3'
CV242179	PtPGR5fwd PtPGR5rev	5'-CGTCAAATAATCGGCA-3' 5'-TGGCCAACCTAATCAG-3'
CV283317	PtLFNR1fwd PtLFNR1rev	5'-CCACTATCATTATGCTTG-3' 5'-TCTTTAGTAATCCCACAG-3'
CA926076	PtGLP3fwd PtGLP3rev	5'-AAATTCGGAGGTGTAAAT-3' 5'-CGTCATCGAGGAATGTTG-3'

**Für an Exocytose beteiligte Gene (3.2.3.3):**

<b>Öffentliche ID (NCBI)</b>	<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
XP_002314626	PtAla3(1)fwd PtAla3(1)rev	5'-ATTCTATTTCTACCTCACG-3' 5'-CATACCCAGGTGATTC-3'
XP_002339708	PtAla3(2)fwd PtAla3(2)rev	5'-AATCTATTTCTACCTCACG-3' 5'-CTGCCCTAGTGTTGTC-3'
BU810775	PtAla3(3)fwd PtAla3(3)rev	5'-ATCCTAAATATCGTGATCT-3' 5'-ACAATACATGCGACTG-3'
CV275482	PtArf1(1)fwd PtArf1(1)rev	5'-GCTGTATGAGGGATTG-3' 5'-GGCTTTGCTATTTGAATAA-3'
CK088579	PtArf1(2)fwd PtArf1(2)rev	5'-CCACCATTCTACTATTG-3' 5'-CCCTGTCGTTGCTATC-3'
CV278073	PtDAGfwd PtDAGrev	5'-AGGGTGCCACTAAGC-3' 5'-CTTTGTATTCCGGGGTC-3'
BU824735	PtDyn(1)fwd PtDyn(1)rev	5'-AAGGTACATTACTACATTC-3' 5'-ACCATCATGTCTACC-3'
CK090501	PtDyn(2)fwd PtDyn(2)rev	5'-TGAAGACTCGTGGTAT-3' 5'-TTTGTTCCAAGGGTTCTA-3'
CK092620	PtPEP12(1)fwd PtPEP12(1)rev	5'-TCTGATCGCTAGTATGG-3' 5'-CATTTAGATTTACGGTT-3'
CF936851	PtPEP12(2)fwd PtPEP12(2)rev	5'-GGAAACGGCATATACT-3' 5'-GTTCTCTCTCCTCGATAA-3'
CV241725	PttrabAfwd PttrabArev	5'-TTCTGGATGGGCAAAG-3' 5'-GGATCCTGGAACCGT-3'
DN496417	PttrabE/8(1)fwd PttrabE/8(1)rev	5'-TCACAAGTCTTATTATCG-3' 5'-TTGATCCCGTACTCAT-3'
BU893135	PttrabE/8(2)fwd PttrabE/8(2)rev	5'-CAACTGCTTACTATCGC-3' 5'-CCTTGTCGGTGTC-3'
CV277800	PttrabF(1)fwd PttrabF(1)rev	5'-GGTTATGGCATTAGTAGC-3' 5'-GATTCACCCCAGTAGA-3'
CX178052	PttrabF(2)fwd PttrabF(2)rev	5'-TACCACAGCTTAGCTC-3' 5'-GCTGGCTGTACTTGA-3'
CV240653	PttrabF(3)fwd PttrabF(3)rev	5'-GTCCAGTCTCGTATTG-3' 5'-ATACTCCTGGGCATAA-3'
XP_002306120	PtSEC14fwd PtSEC14rev	5'-ATATCGCATCCCCTAA-3' 5'-CCAGTGAGCGAAAGA-3'
XP_002327686	PtSNARE(1)fwd PtSNARE(1)rev	5'-CGAAGGATCGTATTGT-3' 5'-CCTTAATGTCGTAGAACT-3'
CK093245	PtSNARE(2)fwd PtSNARE(2)rev	5'-AGGAACTCCGATTTATAG-3' 5'-ACCTGTCCTGTATCTC-3'
BP932273	PtSNX1fwd PtSNX1rev	5'-GTAAGGCAGTAAACTCC-3' 5'-AAGAACGTGTTAGCATA-3'
CF120135	PtVHA-a1fwd PtVHA-a1rev	5'-GTGATTACTCTCCTGAAG-3' 5'-CTGCGAGCTAAGATG-3'

**Für antimikrobielle Nektar-Proteine (3.2.3.1):**

<b>Protein ID [Poptrdraft...] (JGI)</b>	<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
827727	fwd rev	5'-ATCTGCCTTATGGAATAG-3' 5'-CTTAGCAACGTCATCG-3'
586261	fwd rev	5'-AACTACCGGGTTTAGG-3' 5'-TCGTATGGATAAGCATCA-3'
593152	fwd rev	5'-CAACTGGGTGATAGAAT-3' 5'-CGAAACGGATAGGAAT-3'
581173	fwd rev	5'-TGCATAACAGGGTTTAG-3' 5'-GGTTGGATAAGCATCAGA-3'
292112	fwd rev	5'-TTGGAGCAATAGGCAG-3' 5'-CTTACCGAGCACAGAA-3'
590536	fwd rev	5'-TGATATTGTGAACGACAT-3' 5'-CTGCGTCTGTATAAGC-3'
290846	fwd rev	5'-ACTTGAAGCCCTTAGA-3' 5'-CTGTCACTAAAGGACC-3'
652688	fwd rev	5'-ATTCTTGGTATTCTAAATCC-3' 5'-ATCAATAGCGGTTGAAA-3'
746640	fwd rev	5'-TCAATTTGTGAACGTAGC-3' 5'-GCCCTGCATCGTC-3'
717157	fwd rev	5'-AACATATCAAGTTACAATCT-3' 5'-TTGCTAACGTGATGGA-3'
826290	fwd rev	5'-TACGCCTACTACTCCC-3' 5'-TTGACCGGAAGCA-3'
550049	fwd rev	5'-TTGTCTGGGACACTAATG-3' 5'-GGCCAACGTAGTTGC-3'
571046	fwd rev	5'-GACGATCATTGTAATCC-3' 5'-AGTCCAGCCGTATTTC-3'
763978	fwd rev	5'-CATGGATGGTAGGTGA-3' 5'-CAAAGGCCTAGGACA-3'
669475	fwd rev	5'-GCTGAATATGCCTTGAAC-3' 5'-ACAGTATTGATCTGTCTT-3'

### 7.5.3. Sequenzierprimer

<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
M13fwd	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pGEXfwd	5'-CCAGCAAGTATATAGCATGG-3'
pGEX-6P1-seq-rev	5'-GAGGTTTTTCACCGTCATCAC-3'
PtSLAH3sq1	5'-TCTTTCAAACATGGTCTGG-3'
PtSLAH3sq2	5'-CCCAATCCGAGTGAACCTTCT-3'
PtSLAH3sq3	5'-ACTGTGTCGGCTCTCCTTGT-3'
PtSLAH3seqNT	5'-CTACCATCCAATCAGAATCAAC-3'

### 7.5.4. SMART-RACE-Primer PttSLAH3

<b>Primer Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
GSP1	5'-AGGGCAATGAAGTAAGGA-3'
GSP2	5'-AGAAGGCTTTCGAAGGT-3'
NGSP1	5'-AATATTTGCCCATGCCATAGAAG-3'
NGSP2	5'-TCGGTTTGGCTCACTATACAGTC-3'

## 7.6. Gensequenzen

### PtSLAH2/3-1, 1449bp:

Als Ausgangssequenz für die Identifikation der cDNA-Enden von SLAH3 in Pappel (2.4.2.14) diene die kombinierte Sequenz aus eugene3.01220013 und eugene3.01220012 (Pappel ID Namen aus JGI, [http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Poptr1\\_1](http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Poptr1_1)). Beide Sequenzen wurden bei der ursprünglichen Identifikation von Pappel-orthologen SLAC/SLAH-Kanälen (2.4.2.13) als eindeutig homolog zu AtSLAH3 identifiziert. Ein Vergleich der beiden Sequenzen mit AtSLAH3 zeigte zudem, dass eugene3.01220013 im putativen PtrSLAH3-Gen etwa 270 Nukleotide in 5'-Richtung von eugene3.01220012 entfernt positioniert sein und damit zum selben Gen gehörig sein könnte. Diese Annahme erschließt sich aus der offensichtlichen Homologie zu AtSLAH3. Im Einklang mit dieser These konnten beide Sequenzen im Genom von *Populus trichocarpa* in unmittelbare Nähe zueinander auf demselben Chromosom (scaffold 122) ausgemacht werden. Ein Fehler bei der Annotierung der Pappel-Sequenz schien deshalb sehr wahrscheinlich. Deswegen wurde für die Identifizierung der vollständigen CDS von PttSLAH3 beide Sequenzen zu folgender PtSLAH2/3-1 Sequenz kombiniert, wobei der offensichtlich fehlende Sequenzteil aufgefüllt wurde (X = unbekanntes Nukleotid).

```
5'-ATGGCTAAGGGAAGTGCATTGAGGTTGCACTTGCACCTTCCAAACCATCCTAATAACCATCCCAGC
TTGAAAAAGTTAAAGGATAAAACATATGATTCTTTCAAACATGGTCTGGGAAACTTGGGAGGCAGACAA
CAAATTTACGTGTGAGGCCGCGAGAAGATTCAACAGAGAAGACTGCTGGCCAAAAGCAGAGAAAGATGC
TTTACCTGTAGACCGATACTTTGACGCGTTGGAAGGGCTGAGTTGGAACTCTTAGGCCTTCGGAACAAA
TAGTGCTACCAGATGATAATACATGGCCATTTCTTCTCCGTTTTCCCATCTCTTCGTTCGGTATCTGCCTTGG
GGTTAGCAGCAAACAATAATGTGAAACCCTGGCCACCTCTGCCTCCACAAAATTTCTCCACATAAXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXATG
TCAGGAGGACAGAGAAGGCTTTCGAAGGTGGCAAATCCTACAAACCATCTGTCTGATTGTGGGGAAGTTTGT
GGGGCACTGTTGGGTGCATCGATGGGATTAAAAGAAGGGCTATATTCTTTTGCAGTCGGTTTTGGCTC
ACTATACAGTCCTATTGTAAC TTGTACCAGAGACTTCGACAAATGAGACAATCCCCGAGGAGCTCCAT
CCAGTTTTCTTTCTGTTTGTTGTCAGCTCCAAGTGTGCTTCTATGGCATGGGCAAATATTCAAGGTTCAATTTG
ATCATGGATCACGGATTCCTTACTTCATTGCCCTGTTCCTTTATTTATCATTGGCAGTCCGTGTTAATTTTT
CCGAGGATCAAGTTTTATTTGTCATGGTGGGCATACACTTTCCCAGTACCGGGCCTGCCATTGCGACCAT
CAGGTACTCGAATGAAGTCACGAATGTAGTCACCAAGTTCTTGCCGTCATATTCTTACTGTTTCCACACT
CACTGTATCGGCTCTCCTTGTATCGACAATAGTGCACGCATTCTACTCCAGGACCTCTTCCCTAATGACAT
TGCCATCGCTATCAGCAACAGGAAACCAAGACAGCATACCAAAGGAAGTGGTTCCATCTAAGACGTGGA
AGCTCGGTTGAAAAAGAGATTGAACACTTAAAGTTCACAAACTCAGATGGTAAGGATATAGAATCTTC
TCTAGACCCCACTTCTAGCTCAGATAGTAGTATTGA-3'
```

**PttSLAH3 CDS, 1701bp:**

5'-ATGGGAAGTGATACTGCTGCCTTTGAGAACCAAAGTATGAATCTCAACCCATCCACCTTCAAAGGAAG  
CATTCTGTTTACATCAGCTTGCCACCTTGTCCCTTAGCAGAAAGCTCAAAGAAGGCAGAAAAGGTCCTTTTC  
AAAGAAGATGGTGAAAAACCTTTGTTTATGGAAATCCAGATTCTTCTGCTGCATCTAAAATTGTCGATAC  
ACCACCTAAGCAAGTTAAATTCCACCCTCAACCAATGGCTAAGGGAAGTCTGCATTTGAGGTTGCACTTG  
ACGTTCCAAACCATCTAATAACCATCCCAGCTTGAAAAAGTTAAAGGATAAAAAGATATGATTCTTTCAA  
ACATGGTCTGGGAAACTTGAGAGGCAGATAACAAATTTACGTGTGAGGCCGCGAGAAGATTCAACAGAGA  
AGACTGCTGGCGCAAAGCAGAGAAAGATGCTTTACCTGTAGACCGATACCTTGACGCCTTGGAAGGGCCT  
GAGTTGAAAACCTTAGGCCTTCGGAACAAATAGTGCTACCAGATGATAGTACATGGCCATTTCTTCTCCGT  
TTTCCCATCTCTTCATTCCGTATCTGTCTTGGGGTTAGCAGCCAAGCAATAATGTGAAAACCTGGCCACC  
TCTGCCTCCACAAAATTTCTCCACATAAGCATCGACGTAATCTTGTCTCTGGTGCATCGCTGTTGCTCTT  
GTAGTGATCATTGGTTCATATACCTGCTGAAAATGATTCTCTACTTTGAAGCAGTTCGTCTGAGTACGGC  
CACCCAATCCGAGTGAACCTTTTTTGCACCATGGATAGCTCTGCTATTCTTAGCTATTGGAATGCCTCCTT  
CCCTTGCCGAAGACCTGCATGCAGCGCTTTGGTATGTTCTCATGACTCCATTCTCATTCTGGAGCTTAAAA  
TATACGGACAGTGGATGTCTGGAGGACAGAGAAGGCTTTCGAAGGTGGCAAATCCTACAAACCATCTGTC  
GATTGTTGGAACTTTGTGGGGGCACTGTTGGGTGCATCAATGGGATTAAGAAGGGCCTTTATTCTTCTT  
TGCAGTCGGGTTGGCTCACTATACAGTCTATTTGTAAGTCTGTACCAGAGACTTCCGACAAATCAGACAAT  
CCCCAAGGAGCTCCATCCAGTTTTCTTCTGTTTGTGACGCTCCAAGTGTGGCTTCCATGGCTTGGGCAAA  
AATTCAAGGTTCAATTTGATCATGGATCACGGATTCTTACTTCACTGCCTTATTCCTTTATTTCTCACTGGCA  
GTCCGIGTTAATTTTTTCCGAGGATTCAAGTTTTCATTGTCATGGTGGGCATACACTTTCCTCCATGACCGGC  
GCTGCCATTGCAACCATCAGGTAAGTCTGAATGAAGTCACGAATGTAGTCACCCAAGTTCTTCCGTCATATTC  
TCTGCTGTTTCCACACTCACTGTGTGCGCTCTCCTTGTATCGACAATAGTGCACGCATTCTGACTCCAGGAC  
CTCTTCCCTAATGACATTGCCATCGCTATCAGCAACAGGAAACCAAGACAGCATCACCAGAGGAAGTGGTT  
CGATCTAAGACGAGGAAGCTCGGATGAAAAAGAGATTGAACATTACTTAAAGTTCACAAACTCAGATGGT  
AAGGATATAGAATCTTCTCTACACCCCACCACTTCTAGCTCAGATAGCAGTCATTGA-3'

**PttCPK21d CDS, 1041bp:**

ATGGGTTGTTGCGGTAGCAAAGGAAATGCTCCAACACCAGATGTTAATGGTTATAGAGGACCAGCAACTG  
GATATCCTAGGCAAACCAATCAACAACAACAACCTCAATATCATCCAAGCCAACAGAAAGTCACAGTCCCT  
CAAATTCAGACACAAACCCACCAACAAGACCTCAACAGACACAACAACAACCCCAACAAGGCCAGCTC  
CTGATACTATACTTGGCAAGCCTTTTGAAGACATCAAGCAACACTATACTCTTGAAAAGAATTGGGTAGA  
GGTCAGTTTGGTGTACTTATTTGTGCACAGAGAATCAACTAGTCATACTTATGCTTGCAAGTCAATATTG  
AAGAGGAAGTTAGTGAATAAGAATGATAAAGAGGATATGAAAAGAGAGGTTTATATCATGCAGGACTTGT  
CAGGGCAGCCAAATATTGTTGAATTTAGAGGGGCTTATGAGGATAGGCAATCTGTGCATCTTGTATGGAG  
CTTTGTGCAGGGGGGAGCTTTTCGATCGGATTATAGCAAAAGGGCATTATTCAGAGAGAGATGCTGCTAA  
GATTTGTAGGAGATAGTGAATGTGGTACATGCTTGTCAATTTATGGGAGTGATGCATAGAGATCTCAAGC  
CTGAGAATTTCTTGTCTAGCAAAGCTGAGGGTGCTAAACTGAAGGCAACTGATTTTGGGTTGTCTGTGT  
TCATTGAGGAAGGTAAGTTTACCGTGATATAGTGGGCAGTGCATATTATGTTGCTCCTGAAGTATTGCGC  
CGTAGTTATGGAAAGGAAATAGACATCTGGAGTGCAGGAGTATTTTGTATATTCTACTCAGTGGAGTACC  
TCCCTTTTGGGCTGAAAATGAAAAGGGAATATTTGATGCCATTCTACAAGGAGACATTGACTTTGAAAGTG  
ACCCATGGCCTTCAATATCTAACAGTGCAAAAGATCTTGTGACAGGAGGATGTTGACTCAGGATCCTAAAAAG  
CGAATCACTTCTACACAAGTTCTTGAGCATCCATGGATTAAGGAAGGA

## 7.7. Abkürzungen

A	Ampere
ABA	Abscisinsäure (engl. abscisic acid)
adj.P-val	adjusted P-value, engl. für angepasster P-Wert
AG	Arbeitsgruppe
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaare (engl. basepairs)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius, Carboxy (-terminal)
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cam	Chloramphenicol
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CDPK	Calcium-abhängige Proteinkinase (engl. calcium-dependent protein kinase)
CDS	kodierende Sequenz (engl. coding sequence)
CE	Stromelektrode (engl. current elektrode)
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase (engl. calcium-dependent protein kinase)
CPKd	Deletionsmutante der Calcium-abhängigen Proteinkinase (engl. calcium-dependent protein kinase)
cRNA	Komplementäre RNA (engl. complementary RNA)
CT	C-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVIC	Zwei Elektroden Spannungsklemmen Technik (engl. Double Electrode Voltage Clamp)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
d.h.	das heißt



DNA	Desoxyribunukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
downstream	engl. für stromabwärts
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethyl-ether)-N,N'-Tetraessigsäure
EFN	extraflorale Nektarien
engl.	englisch
et al.	und Andere (lat.; et alii)
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FC	Induktionsfaktor engl. fold change
FN	florale Nektarien
fwd	Vorwärts (engl. forward)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (engl. hour)
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HiTehA	Tellurit-Resistenz Protein aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz, (Frequenz) 1 / s
JA	Jasmonsäure (engl. jasmonic acid)
J-v-S	Julius-von-Sachs
lac	Laktose (engl. lactose)
I	Strom
I <sub>F</sub>	Folgepulsstrom
I <sub>ss</sub>	Gleichgewichtsstrom
I <sub>t</sub>	instantaner Strom

IVT	In Vitro Transkription
IPTG	Isopropyl-1-thio-b-D-galactosid
JGI	Joint Genome Institut, online Datenbank
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth oder Luria Bertani (Medium)
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter, milli-
M	Molar
max	maximal
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mol	molar
MPI	Max-Plank-Institut
MS	Massenspektrometrie
MV	Messverstärker
MVB	multivesikuläre Körper (engl. multivesicular bodies)
n	nano- / Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ion
NT	N-Terminus
OD	optische Dichte
OST	offene Stomata (engl. open stomata)
P	Permeabilität
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Potentialelektrode
pH	potentia Hydrogenii (Säuregrad)
PhD	wissenschaftlicher Doktorgrad
Phytozome	online Datenbank
PR	Phatogen-bedingt (engl. pathogenesis related)

<i>Ptr</i>	<i>Populus trichocarpa</i>
<i>Ptt</i>	<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>
R	Gaskonstante
Race	engl. rapid amplification of cDNA-ends
RE	Referenzelektrode
rel. $P_0$	relative Offenwahrscheinlichkeit
rev	Rückwärts (engl. reverse)
RNA	Ribo-Nucleinsäure (engl. -Acid)
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
sec	Sekunde (engl. second)
SF	Standardfehler
Sink	engl. für Senke
SLAC1	engl. slow anion channel associated 1
SLAH1-4	SLAC1-Homologe 1-4
SMART	engl. switching mechanism at 5' end of RNA transcripts
SnRK	Snf-1 (engl. für Saccharose nicht vergärende)-verwandte Proteinkinasen
Source	engl. für Quelle
t	Zeit (engl. time)
T	absolute Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tens	TE-NaOH-SDS-Puffer
TGN	trans Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
$U_{com}$	Sollspannung (com = Computer)
$U_m$	Membranspannung
upstream	engl. für stromaufwärts

USER	Uracil-spezifisches Entfernungsmittel (engl. uracil-specific excision reagent)
$U_{rev}$	Umkehrpotential
UV	Ultraviolettes Licht
$U_{1/2}$	halb-maximale Aktivierungsspannung
V	Volt (engl. voltage) / Spannung
VOCs	flüchtige organische Verbindungen (engl. volatile organic compounds)
vs.	versus
VV	Vorverstärker
W	Watt
WT	Wildtyp
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein (engl. yellow fluorescent protein)
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	mikro-
%	Prozent

## 7.8. Firmenverzeichnis

5Prime GmbH,	Hamburg
AppliChem BioChemica GmbH,	Darmstadt
Bandelin electronic,	Berlin
Bayer CorpScience,	Monheim
Bio&SELL,	Feucht bei Nürnberg
Bio-Rad Laboratories GmbH,	München
Biotium inc.,	Haward, USA
Clontech Laboratories, Inc.,	Mountain View, CA, USA
Drumond Scientific Company,	Broomall, PA, USA
Eppendorf AG,	Hamburg
Fermentas GmbH,	St.Leon-Rot
Finnzymes,	Vantaa, Finland
Fujifilm Corporation,	Tokyo, Japan
GATC-Biotech,	Konstanz
GE Healthcare Europe GmbH,	Glattburg, Schweiz
Heidolph Instruments,	Schwabach
HEKA-Elektronik,	Lambrecht/Pfalz, Deutschland
ImmunoGlobe,	Himmelstadt
Instrutech corporation ,	New York, USA
Intas Science Imaging Instruments GmbH,	Göttingen
Invitrogen, jetzt Life Technolocies GmbH,	Darmstadt
Carl Roth GmbH & Co. KG,	Karlsruhe
Keyence Deutschland GmbH,	Neu-Isenburg
LANXESS,	Leverkusen
Liebherr,	Biberach an der Riss
MANNA,	Düsseldorf
Marzhauser,	Wetzlar
Memmert,	Schwabach
Metabion International AG,	Martinsried
Microsoft,	Redmond, USA
MoBiTec,	Göttingen
Molecular Biology Insights, Inc.,	Cascade, USA

Molecular Probes, Invitrogen, jetzt Life Technologies, Darmstadt	
MWG-Biotech AG,	Ebersberg
Narishige Scientific Instrument Lab,	Tokyo, Japan
NewBrunswick scientific,	Enfield, CT, USA
New England BioLabs, Inc.,	Ipswich, MA, USA
NPI electronics,	Tamm
Olympus,	Hamburg
Omega bio-tek,	Norcross, GA, USA
OriginLab,	Northampton, USA
PEQLAB Biotechnologie GmbH,	Erlangen
Promega Corporation,	Madison, WI, USA
QIAGEN GmbH,	Hilden
Retsch GmbH,	Haan
Roche Deutschland Holding GmbH,	Grenach-Wyhlen
Sanyo,	Loughborough, England
Schott,	Landshut
Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	Steinheim
Stratagene jetzt Agilent Technologies, Inc.,	Santa Clara, CA, USA
Thermo Fisher Scientific,	Wilmington, USA
Thermo Scientific,	Rockford, IL, USA
TIB Molbiol GmbH,	Berlin
WaveMetrics,	Portland, USA
World Precision Instruments Inc.,	Sarasota, FL, USA
Zeiss,	Oberkochen

## 7.9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mario Jaborsky  
Geburtsdatum: 19.01.1982  
Geburtsort: Günzburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung an Schulen und Hochschulen

**Seit 01/2009** Promotion am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-von-Sachs-Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Thema der Dissertation: Extraflorale Nektarien der Pappeln *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* x *P. tremuloides*: Unterschiede und Gemeinsamkeiten

**02/2008 – 11/2008** Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik. Thema: Untersuchungen an extrafloralen Nektarien der Pappel.

**10/2002 – 11/2008** Studium der Biologie (Diplom) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Ausrichtung des Hauptstudiums: Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik  
Nebenfächer: Verhaltensphysiologie und Soziobiologie der Tiere; Ökophysiologie der Pflanzen und Vegetationsökologie  
Erfolgreicher Abschluss als Diplom Biologe univ.

**07/2001 – 03/2002** Wehrdienst: Transportbataillon Prinz-Eugen-Kaserne, Günzburg

**09/1992 – 06/2001** Dossenberger-Gymnasium, Günzburg  
Erfolgreicher Abschluss mit Abitur

**09/1988 – 07/1992** Grundschule, Burgau

## 7.10. Publikationen

María Escalante-Pérez\*, **Mario Jaborsky\***, Silke Lautner, Jörg Fromm, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Maritta Kunert, Wilhelm Boland, Rainer Hedrich und Peter Ache. „Poplar extrafloral nectaries: two types, two strategies of indirect defenses against herbivores.” Plant Physiology, Juli 2012, vol. 159, pp. 1176-1191

María Escalante-Pérez\*, **Mario Jaborsky\***, Jörg Reinders, Oliver Kurzai, Rainer Hedrich und Peter Ache. „Letter to the Editor: Poplar Extrafloral Nectar Is Protected against Plant and Human Pathogenic Fungus.” Molecular Plant, Juni 2012, doi: 10.1093/mp/sss072

\* Autoren gleichberechtigt

## 7.11. Teilnahme an Tagungen

Posterpräsentation:

**Mario Jaborsky**; María Escalante-Pérez, Andrea Olbrich, Rainer Hedrich and Peter Ache; Nectar secretion of poplar extrafloral nectaries: Two different strategies with common functions

Botaniker Tagung 2011



## 7.12. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation möglich wurde. Im Besonderen gilt dies für:

Prof. Dr. Rainer Hedrich, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Julius-von-Sachs-Institut der Universität Würzburg anfertigen zu können sowie für die Erstbegutachtung dieser Dissertation.

Prof. Dr. Jürgen Tautz, für die Bereitschaft, sich als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen. Außerdem möchte ich ihm für die Bereitstellung der Bienenvölker und die hilfreichen Ratschläge danken, die mir die Durchführung meiner Interaktionsversuche ermöglicht haben.

Dr. Peter Ache, für die spannende und interessante Aufgabenstellung und die stets sehr gute Betreuung während meiner gesamten Zeit am Institut. Vor allem aber möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Zu wissen, dass jede Frage gestellt und bei Problemen immer mit Unterstützung gerechnet werden konnte, hat meine Arbeit sehr erleichtert.

Dr. María Escalante Pérez, für ihr Vertrauen, meine Eingliederung in die „Botanik I-Familie“ und die Einführung in so viele Themengebiete und Methoden, die dieser Arbeit zugrunde liegen.

Prof. Dr. Dietmar Geiger und Arbeitsgruppe möchte ich für all die Unterstützung danken, die ich bei der Erlernung elektrophysiologischer Methoden erhalten habe.

Prof. Dr. Thomas Müller und Arbeitsgruppe möchte ich für die Einführung in die Proteinbiochemie danken und dafür, dass jede Frage ein offenes Ohr fand.

Prof. Dr. Wilhelm Boland und seiner Arbeitsgruppe des Max-Planck-Instituts in Jena, besonders Dr. Maritta Kunert und Anja, möchte ich für meine erfolgreiche Zeit in Jena, die Einführung in das Reich der „VOCs“ und deren Analyse danken.

Ebenso möchte ich Dr. Tobias Müller und Dr. Dr. Marcus Dittrich (Lehrstuhl für Bioinformatik) für die Auswertung der Microarray-Daten, Dr. Michael Rostas (früher Botanik II, jetzt Lincoln University New Zealand) für die Näherbringung der Raupenaufzucht und für die hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung meiner Interaktionsstudien, Dr. Andrea Olbrich (Zentrum Holzwirtschaft, Universität Hamburg) für die Durchführung der *in-situ* Lokalisationsstudien und Dr. Judy Simmons (Professur für Baumphysiologie, Universität Freiburg) für die Analyse der Nektar-Anionen, danken.

Dem gesamten Gärtnerteam der Botanik I, im Besonderen Joachim und Jutta (Botanik II) möchte ich danken. Eure Ratschläge und vor allem Pflege meiner Pappeln haben viele meiner Versuche erst möglich gemacht.

Allen TA's des Instituts, vor allem Melanie, Brigitte, Kerstin und Ruth möchte ich ebenfalls danken. Ohne euch wären viele Fragen ungelöst und unzählige Arbeiten unvollendet geblieben.

Allen Mitarbeitern des gesamten Instituts möchte ich für die angenehme, kollegiale und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Ins Besondere möchte ich meinen „Kollegen von der Terrasse“ danken. Ohne euch wären viele arbeitsreiche Tage mit Sicherheit mühevoller gewesen.

Ein großes Dankeschön allen Freunden, die ich während meiner Zeit am Institut gewonnen habe.

Mona und meiner Mutter danke ich für das Korrekturlesen.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke, dass ihr immer und in jeder Hinsicht hinter mir gestanden, mich unterstützt und motiviert habt.

Franzi, danke, dass du immer für mich da bist, wenn ich dich am meisten brauch und mich in schwierigen Phasen immer wieder daran erinnerst, dass es im Leben viel Wichtigeres und Schöneres gibt als Arbeit und Stress.