



# **Charakterisierung vakuolärer Transportproteine aus Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung abiotischer Stressbedingungen**

Vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

D386

vorgelegt von

Stefan Wic

Kaiserslautern, im Oktober 2009

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 4.12.2009

Berichterstatter:  
Herr Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus  
Herr Prof. Dr. Eckhard Friauf

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>01</b>
1.1	Überblick zu den Funktionen pflanzlicher Vakuolen	01
1.2	Kälte, Versalzung und Trockenheit: abiotischer Stress für Pflanzen	02
1.3	Funktion vakuolärer Transportproteine bei Kälte, Versalzung und Trockenheit	04
1.4	Reversible Speicherung von Zuckern in der Vakuole	05
1.5	Reversible Speicherung von Malat in der Vakuole	06
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	08
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>09</b>
2.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	09
2.1.1	Pflanzenmaterial	09
2.1.2	Pflanzenanzucht auf Erde	10
2.1.3	Oberflächensterilisation der Samen	11
2.1.4	Keimungstests	11
2.2	Chemikalien und Enzyme	11
2.3	Molekularbiologische Methoden	11
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme	11
2.3.2	Verwendete Vektoren und Konstrukte	12
2.3.3	Anzucht von Bakterien	12
2.3.4	Verwendete Oligonukleotide	13
2.3.5	Herstellung kompetenter Zellen	14
2.3.6	Transformation von <i>E. coli</i>	15
2.3.7	Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	16
2.3.8	Plasmidpräparation aus Bakterienzellen	16
2.3.9	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	17
2.3.10	<i>In-vitro</i> -Manipulation von DNA	17
2.3.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.3.12	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	19
2.3.13	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.3.14	Real-time quantitative PCR	20
2.3.14.1	RNA-Isolierung	20
2.3.14.2	cDNA-Synthese	20
2.3.14.3	Prinzip und Durchführung der Real-time quantitativen PCR	21
2.3.15	Northern Blot	22
2.3.15.1	RNA-Isolierung	22

2.3.15.2	Formaldehyd-Gele zur Auftrennung von Gesamt-RNA	23
2.3.15.3	Transfer von RNA-Molekülen auf Nylonmembranen	24
2.3.15.4	Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	24
2.3.15.5	Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden	24
2.3.15.6	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	25
2.3.16	GUS-Färbung	26
2.3.17	DNA-Sequenz-Analyse	27
2.3.18	Transformation von Arabidopsis	27
2.4	Computergestützte Analysen	27
2.5	Physiologische und biochemische Methoden	28
2.5.1	Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts	28
2.5.2	Bestimmung des totalen Wassergehalts	28
2.5.3	Blattscheibentest zur Glukoseveratmung	28
2.5.4	Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II	29
2.5.5	Quantitative Metaboliten-Bestimmung	29
2.5.5.1	Extraktion von Aminosäuren und Zucker	29
2.5.5.2	Extraktion von Karbonsäuren und anorganischen Ionen	30
2.5.5.3	Extraktion und Quantifizierung von Stärke	30
2.5.5.4	Quantifizierung von Zuckern, Karbonsäuren und anorganischen Ionen	30
2.5.5.5	Quantifizierung von Aminosäuren	31
2.5.6	Bestimmung der Stomata-Aperturen	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Weiterführende Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Regulation der Stomata-Apertur und bei der Trockentoleranz	32
3.2	Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Regulation des Blühzeitpunkts	39
3.3	Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Salztoleranz	41
3.4	Herstellung <i>TDT</i> überexprimierender Pflanzen	42
3.5	Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der TMT-Familie unter Kältestress	44
3.6	Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der TMT-Familie unter Trockenstress	48
3.7	Sequenz-Analysen zu den GLUT-Homologen ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP	49
3.8	Untersuchungen zur Regulation der Geninduktion von <i>ERD6.5</i> und <i>ERD6.7</i>	51
3.9	Molekulare und physiologische Charakterisierung von <i>ERD6.5</i> bzw. <i>ERD6.7</i> defizienten Pflanzen	54
3.10	Analysen zur heterologen Expression von <i>BvIMP</i> in Arabidopsis	59

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Beitrag des TDT zur Regulation der Stomata-Apertur und Trockentoleranz	62
4.2	Funktion des TDT in der Regulation des Blühzeitpunkts	66
4.3	Beitrag des TDT zur Salztoleranz	67
4.4	Beitrag der TMT-Familie zur Kältetoleranz	67
4.5	Beitrag der TMT-Familie zur Trockentoleranz	71
4.6	Funktion der GLUT-Homologe ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP	71
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>86</b>
8.1	Abkürzungen	86
8.2	Symbole für Aminosäuren	89
8.3	AGI- bzw. Accession-Nummern	89
8.4	Proteinsequenzen	90
8.5	Klonierungsstrategie zur Expression von <i>BvIMP</i> in Arabidopsis	92
8.6	Spezifizierung der angewandten HPLC-Methoden	93
8.7	Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen und Publikationen	94
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Eidesstattliche Versicherung	

## 1 Einleitung

### 1.1 Überblick zu den Funktionen pflanzlicher Vakuolen

Vakuolen stellen neben Plastiden und Zellwänden eines der drei wesentlichen Merkmale dar, die Pflanzenzellen von Tierzellen unterscheiden. Sowohl der Vakuoleninhalt, der Zellsaft, als auch die umgrenzende einfache Elementarmembran, der Tonoplast, gehen aus dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat hervor (Raven et al., 2000). Die zentrale Vakuole ist das größte Kompartiment ausdifferenzierter Pflanzenzellen und kann bis zu 80% des Zellvolumens einnehmen. Sie speichert Karbonsäuren, Aminosäuren, Zucker, Sekundärmetabolite und anorganische Ionen. Osmotisch aufgenommenes Wasser erzeugt den Turgordruck, der eine Vergrößerung der Zellen und die strukturelle Festigkeit krautiger Pflanzen ermöglicht (Taiz und Zeiger, 2006). Der Transport von Wasser über die Vakuolenmembran erfolgt vorwiegend über die Isoformen der TIP-Familie (*tonoplast intrinsic proteins*; Jauh et al., 1999).

Kleinere spezialisierte Vakuolentypen wie lytische Vakuolen, die verschiedene Hydrolasen enthalten, und Proteinspeichervakuolen können in manchen Zellen gleichzeitig vorkommen; in reifen Geweben bilden sie durch Fusion die zentrale Vakuole, die die Funktionen der Vorstufen beibehält (Carter et al., 2004). Die Tonoplasten-gebundene H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) und die H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase energetisieren den Tonoplasten, indem sie unter Verbrauch von ATP bzw. Pyrophosphat Protonen in die Vakuole transportieren und somit eine *proton motive force* aufbauen. Daraus resultiert eine Membranpotentialdifferenz am Tonoplasten von 20 bis 30 mV sowie eine pH-Differenz von 1,5 bis 2 pH-Einheiten, wobei der pH in der Vakuole ca. 5,5 und im Zytosol 7,0 bis 7,5 beträgt. Die elektrische Komponente der *proton motive force* bildet die Grundlage für den vakuolären Import von Anionen, während die pH-Differenz die Akkumulation von Kationen und Zuckern über einen Protonen-Antiport gewährleistet (Taiz und Zeiger, 2006). So erfolgt auch die vakuoläre Speicherung von Schwermetall-Ionen wie Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> über einen Protonen-Antiport, wodurch ihre toxischen Effekte im Zytosol minimiert werden (Martinoia et al., 2007). Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die als *second messenger* wirken (Kap. 1.2), werden sowohl über einen Protonen-Antiport (Hirschi et al., 1996) als auch über eine Ca<sup>2+</sup>-ATPase in die Vakuole transportiert (Geisler et al., 2000). ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) nutzen ebenfalls direkt die Energie der ATP-Hydrolyse, um unabhängig von der elektrochemischen Potentialdifferenz ihre Substrate zu transportieren. Bei den Substraten handelt es sich um große organische Anionen wie die als Blüten- und Fruchtfarbstoffe wirkenden Anthocyane und einige Herbizide, die für den Transport in die Vakuole zumeist an das Tripeptid Glutathion (Glu-Cys-Gly) gebunden werden. Die Einlagerung von Herbiziden in die Vakuole trägt zu deren Entgiftung und somit

zu Herbizid-Resistenzen bei. Die vakuoläre Akkumulation von Anthocyanen bewirkt einen UV-Schutz und erfüllt ökologische Funktionen, insbesondere das Anlocken von Tieren zum Bestäuben und zur Verbreitung von Samen (Tanaka et al., 2008).

## 1.2 Kälte, Versalzung und Trockenheit: abiotischer Stress für Pflanzen

Abiotischer Stress wie zum Beispiel Kälte, hoher Bodensalzgehalt oder Trockenheit beeinträchtigt Wachstum und Fortpflanzung der betroffenen Pflanzen. Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen als sessile Organismen jedoch komplexe Signal-Transduktionen und physiologische Anpassungsfähigkeiten entwickelt, die die Überlebenswahrscheinlichkeit unter suboptimalen Wachstumsbedingungen erhöhen. Stress-Stimuli werden an Rezeptoren der Plasmamembran perzipiert und in ein Signal übersetzt, das zur Freisetzung bzw. Bildung von *second messengern* führt; zu diesen gehören u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, reaktive Sauerstoffspezies und Inositolphosphate. Die *second messenger* bewirken ihrerseits eine Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Darauf reagieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren wie Calmodulin, die keine enzymatische Aktivität aufweisen und ihre Konformation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ändern. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren interagieren mit bestimmten Kinasen, die wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren. Ihre Targets sind *early-response* Gene, die innerhalb von Minuten induziert werden. Sie kodieren Transkriptionsfaktoren, welche die *late-response* Gene induzieren. Die *late-response* Gene kodieren zum Beispiel Enzyme der Osmolyt- und Antioxidantien-Biosynthesen, Chaperone, Proteasen oder membranstabilisierende Proteine, die zellulären Schäden entgegenwirken (Mahajan und Tuteja, 2005). Bei osmotischem Stress, ausgelöst durch Trockenheit oder hohe Bodensalzgehalte, werden zudem auf bisher noch unbekannt Weise Gene induziert, die an der Biosynthese von Abscisinsäure (ABA, abscisic acid) beteiligt sind. Dieses Phytohormon kontrolliert die Expression weiterer Gene, die bei abiotischem Stress von Bedeutung sind (Zhu, 2002), und bewirkt zudem das Schließen der Stomata bei Trockenheit, indem es an einen Rezeptor der Schließzellen-Plasmamembran bindet und einen Turgor-Verlust durch den Export von Ionen aus den Schließzellen auslöst (Ma et al., 2009). Tiefe Temperaturen bewirken mit dem Erreichen des Gefrierpunkts eine verringerte Wasserverfügbarkeit für die Pflanzen. Daher ist unter Frost-Bedingungen auch die Induktion von Genen für Trockentoleranz entscheidend (Llorente et al., 2000).

Im Folgenden soll kurz skizziert werden, wie Kälte, Bodenversalzung und Trockenheit Pflanzen schädigen und welche physiologischen bzw. biochemischen Anpassungen dabei erfolgen. Kälte oberhalb  $0^\circ\text{C}$  (*chilling stress*) bewirkt neben der Denaturierung von Proteinen den Übergang der Zellmembranen von einem semi-fluiden in einen kristallinen Zustand, der zu gestörten Transportprozessen und Kompartimentierungen von Metaboliten oder

Nährelementen führt (Steponkus, 1984). Dadurch werden die Photosynthese und weitere Stoffwechselwege beeinträchtigt. Zu den phänotypischen Symptomen zählen u.a. Welke, Chlorosen oder Nekrosen. Temperaturen unterhalb 0°C (*freezing stress*) führen zusätzlich zur Eisbildung im Apoplasten, was wiederum eine Dehydrierung der Zellen bedingt. Dehydrierung und Eiskristalle zerstören schließlich die Zellmembranen. Die Membranen von Pflanzen mit hoher Kältetoleranz enthalten einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren, so dass sie erst bei tieferen Temperaturen in den schädlichen kristallinen Zustand übergehen. Eine Kälteperiode oberhalb 0°C führt in vielen Pflanzen zu einer Erhöhung der Frosttoleranz. Diese Kälte-Akklimatisierung umfasst z.B. die Akkumulation von Saccharose, Glukose und Prolin, die Membranen und Proteine stabilisieren (Patton et al., 2007), sowie den Austausch von gesättigten gegen ungesättigte Fettsäuren in den Membranen (Mahajan und Tuteja, 2005).

Zahlreiche Gebiete der Erde sind dauerhaft oder saisonal wegen zu geringer Niederschläge von Trockenheit betroffen. Wenn Wassermangel in der Dehydrierung von Pflanzenzellen resultiert, werden die Membranen porös und verlieren ihre Selektivität, so dass zelluläre Kompartimentierungen zerstört werden. Zudem neigen unter diesen Bedingungen Proteine zur Denaturierung, die durch eine passiv erhöhte Elektrolyten-Konzentration im Protoplasma gefördert wird. Eine erste Reaktion zur Vermeidung von Dehydrierung ist das über ABA vermittelte Schließen der Stomata, wodurch einer übermäßigen Transpiration entgegengewirkt wird. Da hierbei gleichzeitig die CO<sub>2</sub>-Aufnahme reduziert wird, ergibt sich bei länger anhaltender Trockenheit eine Reduktion der Photosyntheserate und somit ein vermindertes Wachstum. Die spätere Akkumulation von Ionen und Zuckern in der Vakuole sowie die Synthese kompatibler Solute, die hohe Konzentrationen im Zytosol erreichen, stellen eine osmotische Anpassung für eine verstärkte Wasseraufnahme dar. Kompatible Solute wirken stabilisierend auf Proteine und Membranen. Zu ihnen gehören artabhängig Glycinbetain, Prolin, Sorbitol und Saccharose (Schwacke et al., 1999). Darüber hinaus akkumulieren im Zytosol Dehydrine, die wahrscheinlich wie die kompatiblen Solute membranstabilisierend wirken (Puhakainen et al., 2004), sowie Hitzeschockproteine, die als molekulare Chaperone während der De- und Rehydrierung die Tertiärstruktur anderer Proteine stabilisieren und Protein-Aggregationen minimieren (Mahajan und Tuteja, 2005). Auf Ebene der Evolution stellt der Crassulaceen-Stoffwechsel (CAM) eine besondere Anpassung an ein trockenes Klima dar. CAM-Pflanzen wie zum Beispiel Kakteen öffnen nur nachts die Stomata, so dass die Transpiration geringer ausfällt als bei einer Öffnung am Tag. Das nachts aufgenommene CO<sub>2</sub> wird in Form von Malat fixiert und in den Vakuolen gespeichert. Tagsüber – bei geschlossenen Stomata – wird CO<sub>2</sub> aus Malat freigesetzt und dem Calvin-Zyklus zugeführt. In manchen sukkulenten Arten erfolgt der CAM nicht

konstitutiv, sondern wird erst durch Trockenheit oder Bodenversalzung induziert (Hanscom und Ting, 1978).

Pflanzen an Meeresküsten oder in ariden Gebieten, die künstlich bewässert werden, sind hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt. Insbesondere  $\text{Na}^+$ -Ionen sind aus folgenden Gründen schädlich (Zhu, 2002; Mahajan und Tuteja, 2005): 1.) Der Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zellen reduziert das Membranpotential. 2.) Hohe  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen im Zytosol können Proteine inaktivieren und die Proteinsynthese hemmen. 3.) Ein Überangebot an  $\text{Na}^+$ -Ionen im Boden führt zu einer verstärkten Konkurrenz zwischen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -Ionen an den wenig selektiven  $\text{K}^+$ -Carriern in den Membranen der Wurzeln, so dass die Aufnahme von  $\text{K}^+$ -Ionen zugunsten der Aufnahme von  $\text{Na}^+$ -Ionen eingeschränkt wird.  $\text{K}^+$ -Ionen sind ihrerseits für den pflanzlichen Stoffwechsel von großer Bedeutung, weil sie insbesondere Enzyme aktivieren, die an der Zellatmung und Photosynthese beteiligt sind. 4.) Der osmotische Effekt der Ionen im Bodenwasser erschwert die Wasseraufnahme über die Wurzeln. Daher ist ein hoher Bodensalzgehalt diesbezüglich mit Trockenheit vergleichbar. Viele Pflanzen, darunter *Arabidopsis thaliana*, minimieren Salzschäden, indem  $\text{Na}^+$ -Ionen in den Vakuolen kompartimentiert werden und die gleichen osmotischen Anpassungen erfolgen, die auch bei Trockenheit einsetzen.

### 1.3 Funktion vakuolärer Transportproteine bei Kälte, Versalzung und Trockenheit

Vakuoläre Transportproteine tragen auf vielfältige Weise zu Wachstum und Überlebensfähigkeit der Pflanzen bei Kälte, Bodenversalzung oder Trockenheit bei. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Regulation der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in abiotischen oder biotischen Stress-Situationen wirken als *second messenger* und induzieren zelluläre Stress-Antworten. Da die Vakuole  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen speichert, ist sie an der Kontrolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol und somit an der Regulation von Stress-Antworten beteiligt (Martinoia et al., 2007). Hierbei wird  $\text{Ca}^{2+}$  über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Geisler et al., 2000) und verschiedene  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter (Hirschi et al., 2004) in die Vakuole transportiert, während der Transport aus der Vakuole in das Zytosol über Kanäle erfolgt. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  über den vakuolären Kanal TCP1 in den Schließzellen ist an dem Schließen der Stomata beteiligt (Peiter et al., 2005); dies ermöglicht eine Reduktion der Transpirationsrate und somit einen verringerten Wasserverlust insbesondere bei Wassermangel.

Auch für die reversible vakuoläre Speicherung von  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen wurden grundlegende Funktionen im abiotischen Stress gezeigt: Die Überexpression der  $\text{H}^+$ -Pyrophosphatase AVP1 in *Arabidopsis* bewirkt eine erhöhte Trocken- und Salztoleranz, indem über einen verstärkten Protonen-Antiport mehr  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Vakuole importiert werden

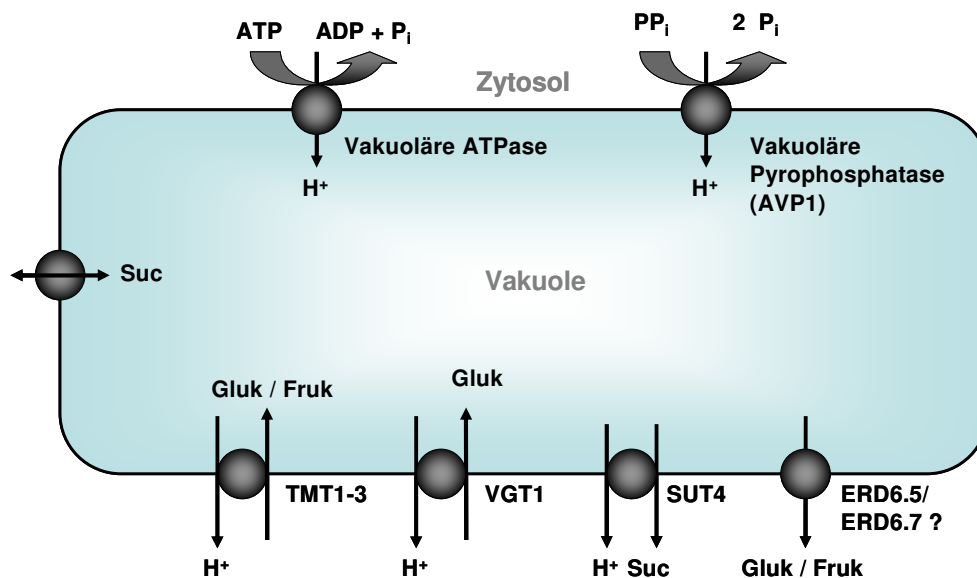


können (Gaxiola et al., 2001). Auf diese Weise wird zum Einen verhindert, dass  $\text{Na}^+$ -Ionen im Zytosol toxische Konzentrationen erreichen; zum Anderen führt die erhöhte Kationen-Akkumulation in der Vakuole zu einer osmotisch gesteigerten Wasseraufnahme über die Wurzeln. Eine Erhöhung der Salztoleranz konnte ebenfalls mit der Überexpression des vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters AtNHX1 erreicht werden, weil die erhöhte Transportaktivität zu einer gesteigerten Aufnahme von  $\text{Na}^+$  in die Vakuole führt (Apse et al., 1999). Die Expression des tonoplastidären Aquaporins PgTip1 aus *Panax ginseng* in Arabidopsis führte aufgrund vergrößerter Vakuolen zu einer erhöhten Aufnahme-Kapazität für Ionen und daher zu einer erhöhten Salztoleranz (Peng et al., 2007).

#### 1.4 Reversible Speicherung von Zuckern in der Vakuole

Zucker sind als die primären Produkte der Photosynthese nicht nur Substrate des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels, sondern wirken zusätzlich als Signalmoleküle (Rolland et al., 2002). Während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung wirken Zucker reprimierend auf die Nährstoff-Mobilisierung, Hypokotyl-Elongation sowie Kotyledonen- und Sprossentwicklung. Für adulte Pflanzen wurde nachgewiesen, dass erhöhte Zuckergehalte die Photosynthese hemmen und den Übergang in die Blühphase verzögern. Da die Signalwirkung von Zuckern im Zytosol ausgeht, kann eine reversible Zucker-Speicherung in der Vakuole diese Signale regulieren. Einige Proteine, die den Zucker-Transport über den Tonoplasten vermitteln oder zumindest hierfür postuliert werden, sind in Arabidopsis identifiziert worden (Abb. 1.1). Der vakuoläre Import von Glukose und Fruktose erfolgt sowohl über VGT1 (Vacuolar Glukose Transporter 1; Aluri und Büttner, 2007) als auch über die drei Isoformen der TMT-Familie (Tonoplastidäre Monosaccharid-Transporter; Wormit et al., 2006). Die Induktion der TMT-Gene bei abiotischem Stress vermittelt eine vakuoläre Zucker-Akkumulation (Wormit, 2006). Pflanzen, in denen VGT1 ausgeschaltet ist, zeigen eine reduzierte Keimung und eine verzögerte Blühphase (Aluri et al., 2007). Bisher ist kein Transportprotein für den vakuolären Saccharose-Import identifiziert worden, während für den Saccharose-Export AtSUT4 als Protonen-Symporter postuliert wird (Neuhaus, 2007). Der Import von Saccharose in die Vakuole erfolgt womöglich über eine erleichterte Diffusion (Kaiser und Heber, 1984). Transportproteine, die Glukose und Fruktose aus der Vakuole exportieren, sind ebenfalls noch nicht identifiziert. Hierfür kommen allerdings zwei Proteine, ERD6.5 und ERD6.7, in Frage: Sie sind im Tonoplasten lokalisiert (Jaquinod et al., 2007) und zeigen hohe Sequenzähnlichkeit zu GLUT-Proteinen aus Säugetieren, die einen energieunabhängigen Glukose-Transport vermitteln (Mueckler, 1994). Daher erscheint es möglich, dass ERD6.5 und ERD6.7 als *Facilitator* einen vakuolären Glukose- oder Fruktose-Export vermitteln (Büttner, 2007). Die Proteine gehören zur ERD6-

*like*-Genfamilie, die in Arabidopsis 19 Mitglieder umfasst und nach dem ERD6-Protein (early-responsive to dehydration) benannt ist. ERD6 wurde als Kälte- und Trockenstress-induzierbarer putativer Zucker-Transporter charakterisiert (Kiyosue et al., 1998). Das Ortholog von ERD6.5 und ERD6.7 aus der Zuckerrübe, BvIMP (Beta vulagaris Integral Membrane Protein), wurde ebenfalls in der Vakuolenmembran lokalisiert (Chiou und Bush, 1996). Die Identifizierung der Transportsubstrate ist auch hierbei bisher nicht gelungen. Die *TMT*-Gene, *VGT1* sowie die *ERD6-like*-Gene zählen zu der *MST(-like)* Genfamilie (monosaccharide transporter -like) von Arabidopsis, die insgesamt 53 Gene für putative und charakterisierte Monosaccharid-Transporter umfasst (Büttner, 2007).

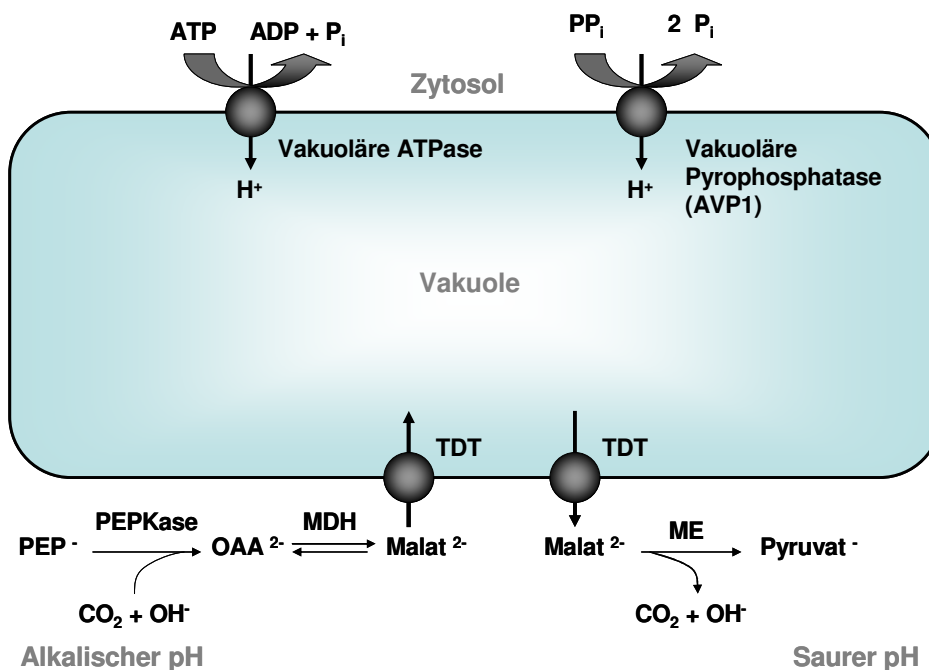


**Abbildung 1.1: Überblick zum vakuolären Zuckertransport in Arabidopsis.** Dargestellt sind die Transportprozesse für Glukose (Gluk), Fruktose (Fruk) und Saccharose (Suc) sowie die entsprechenden charakterisierten oder putativen Transportproteine. Die ATPase und die Pyrophosphatase energetisieren den Import der Hexosen mittels Protonen-Antiport und den Export von Saccharose mittels Protonen-Symport. Der Export von Glukose und Fruktose könnte wie der Import von Saccharose über eine erleichterte Diffusion stattfinden.

### 1.5 Reversible Speicherung von Malat in der Vakuole

Malat, Citrat und Fumarat stellen die Salze der am stärksten akkumulierten Karbonsäuren in Vakuolen dar. Insbesondere für Malat wurden bisher einige grundlegende Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel aufgeklärt (Martinoia und Rentsch, 1994; Patonnier et al., 1999), von denen nachfolgend fünf Beispiele aufgeführt sind: 1.) Malat ist ein Intermediat des Citrat-Zyklus. Am Tag akkumuliertes Malat dient nachts als Substrat der Zellatmung. 2.) Vor allem in C4- und CAM-Pflanzen wirkt Malat als Speicher für CO<sub>2</sub> und Reduktionsäquivalent; in dieser Funktion ermöglicht Malat die räumliche (in C4-Pflanzen) bzw. zeitliche (in CAM-Pflanzen) Trennung von CO<sub>2</sub>-Fixierung und Calvin-Zyklus, was unter ariden Bedingungen

eine hohe Wassernutzungseffizienz gewährleistet. 3.) Die osmotische Wirkung von Malat in den Schließzellen ist eine Grundlage für das Öffnen und Schließen der Stomata. Bei Wassermangel führt eine Malat-Akkumulation in anderen Zelltypen zu einer osmotischen Anpassung. 4.) Malat ist an der Regulation des zytosolischen pH-Werts beteiligt, da die Synthese Hydroxylionen verbraucht, während beim Malat-Abbau Hydroxylionen freigesetzt werden. 5.) Nehmen Wurzeln mehr Kationen als Anionen auf, können daraus resultierende Ladungsungleichgewichte über die Synthese von Malat ausgeglichen werden; ein Überschuss an aufgenommenen Anionen kann durch Abbau von Malat kompensiert werden. In Arabidopsis sind bisher zwei Transportproteine identifiziert worden, die Malat über die Vakuolenmembran transportieren. Dabei handelt es sich um den Carrier AtTDT (*Arabidopsis thaliana* Tonoplast Dicarboxylate Transporter; Emmerlich et al., 2003) und den Kanal AtALMT9 (*Arabidopsis thaliana* aluminium-activated malate transporter 9; Kovermann et al., 2007). Die vakuoläre Speicherung von Malat beeinflusst nachweisbar physiologische Prozesse, an denen das Karboxylat beteiligt ist. So führt das Ausschalten des TDT-Gens zu einer beeinträchtigten Regulation des zytosolischen pH-Werts (Hurth et al., 2005; Abbildung 1.2) und zu veränderten Öffnungsweiten der Stomata (Hurth, 2005). Aufgrund der physiologischen Daten wird angenommen, dass TDT Malat nicht nur in die Vakuole, sondern auch aus der Vakuole in das Zytosol transportieren kann (Hurth et al., 2005).



**Abbildung 1.2: Funktion des TDT in der Regulation des zytosolischen pH-Werts (nach Hurth et al., 2005).** Bei alkalischem pH wird Malat unter Verbrauch von Hydroxylionen synthetisiert und über TDT in die Vakuole zur Speicherung transportiert. Bei saurem pH wird Malat über TDT aus der Vakuole in das Zytosol transportiert, wo es unter Freisetzung von Hydroxylionen in Pyruvat umgesetzt wird. PEP<sup>-</sup>: Phosphoenolpyruvat; OAA<sup>2-</sup>: Oxalacetat; OH<sup>-</sup>: Hydroxylionen; PEPKase: zytosolische Phosphoenolpyruvatkarboxylase; MDH: zytosolische Malatdehydrogenase; ME: zytosolisches Malatenzym

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem Hintergrund grundlegender Analysen zum vakuolären Malat-Transporter TDT (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005; Hurth, 2005) und zu den vakuolären Mononosaccharid-Transportern der TMT-Familie (Wormit et al., 2006; Wormit, 2006) wurde die biochemische und physiologische Funktion dieser Proteine schwerpunktmäßig unter den abiotischen Stressfaktoren Trockenheit, Versalzung und Kälte genauer untersucht. Zudem erfolgten Untersuchungen zu den putativen vakuolären Zucker-Transportern ERD6.5, ERD6.7 und zu deren Ortholog BvIMP aus *Beta vulgaris* mit dem Ziel, ihre Funktion für den pflanzlichen Zucker-Stoffwechsel insbesondere unter Kältestress-Bedingungen herauszuarbeiten. Genexpressionsanalysen mittels Real-time quantitativer PCR, GUS-Färbungen und Northern-Blots sollten ebenso zur Aufklärung der physiologischen Funktionen beitragen wie der metabolische und phänotypische Vergleich zwischen Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionspflanzen (Knockout-Mutanten). Für biochemische und physiologische Charakterisierungen wurden Pflanzen gentechnisch so verändert, dass TDT unter der Kontrolle eines schließzellenspezifischen Promotors bzw. des 35S-Promotors steht. Gentechnische Arbeiten dienten auch als Grundlage zur Untersuchung von BvIMP mittels heterologer Expression in *Arabidopsis* und zur Bestimmung der Promotoraktivität des *ERD6.5*-Gens.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die meisten Untersuchungen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. verwendet (Tab. 2.1). Die physiologischen Analysen zum vakuolären Malat-Transporter AtTDT erfolgten an Wildtyp-Pflanzen der Varietät Wassilewskija, zwei Linien von T-DNA-Insertionsmutanten für das entsprechende Gen (*tdt1-1* bzw. *tdt1-2*), einer Linie, die TDT im *tdt1-1*-Hintergrund unter der Kontrolle des schließzellenspezifischen *Myb60*-Promotors exprimiert ( $P_{Myb60} : TDT(td1-1)$ ), und Pflanzen, in denen für histochemische Studien zur Promotoraktivität der *TDT*-Promotor das Gen für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) reguliert ( $P_{TDT} : GUS$ ). Für weitere Projekte wurden ausschließlich Pflanzen der Varietät Columbia untersucht. In den *TMT*-Triplemutanten, die für die Untersuchungen an den tonoplastidären Monosaccharid-Transportern (TMT) verwendet wurden, sind alle drei *TMT*-Gene durch T-DNA-Insertionen ausgeschaltet (Wormit et al., 2006). Für die Charakterisierung der putativen Zuckertransporter ERD6.5 und ERD6.7 wurden zwei T-DNA-Insertionslinien (*erd6.5-1* und *erd6.5-2*) bzw. eine T-DNA-Insertionslinie (*erd6.7-1*) verwendet. Zur Untersuchung der Promotoraktivität von *ERD6.5* wurden entsprechende GUS-Pflanzen ( $P_{ERD6.5} : GUS$ ) hergestellt. Um die Funktion des zu ERD6.5 und ERD6.7 homologen Transportproteins BvIMP aus *Beta vulgaris* aufzuklären, wurden transgene Linien von *Arabidopsis* erzeugt, in denen BvIMP unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor heterolog exprimiert wird ( $35S :: BvIMP$ ). Die AGI- und Accession-Nummern der untersuchten Gene sowie die entsprechenden Protein-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (Kap. 8.3 und Kap. 8.4).

**Tab. 2.1: Übersicht zu den untersuchten Mutanten von *Arabidopsis thaliana***

Bezeichnung	Resistenz	Beschreibung, Referenz
<i>tdt1-1 / tdt1-2</i>	Kan <sup>r</sup>	<i>TDT</i> -Knockout-Linien (Emmerlich et al., 2003)
$P_{TDT}$ :GUS	BASTA <sup>r</sup>	Mit <i>TDT</i> -Promotor regulierte $\beta$ -Glucuronidase, <i>TDT</i> -Promotor:GUS-Pflanzen (Hurth, 2005)
$P_{Myb60}$ :TDT ( <i>tdt1-1</i> )	Hyg <sup>r</sup>	Expression von <i>TDT</i> unter Kontrolle des <i>Myb60</i> -Promotors in <i>tdt1-1</i> (diese Arbeit)
<i>tmt1-2-3</i>	Basta <sup>r</sup> + Kan <sup>r</sup>	<i>TMT</i> -Triplemutante (Nullmutante) (Wormit et al., 2006)
<i>erd6.5-1 / erd6.5-2</i>	Sulf <sup>r</sup>	<i>ERD6.5</i> -Knockout-Linien (Awwad, 2008; diese Arbeit)
$P_{ERD6.5}$ :GUS	BASTA <sup>r</sup>	Mit <i>ERD6.5</i> -Promotor regulierte $\beta$ -Glucuronidase, <i>ERD6.5</i> -Promotor:GUS-Pflanzen (diese Arbeit)
<i>erd6.7-1</i>	Kan <sup>r</sup>	<i>ERD6.7</i> -Knockout-Linie (Hannich, 2009)
<i>35S::BvIMP</i>	Kan <sup>r</sup>	<i>BvIMP</i> exprimierende Linien (Awwad, 2008; diese Arbeit)

### 2.1.2 Pflanzenanzucht auf Erde

Für die Anzucht auf Erde wurde ED-73 Einheitserde verwendet. In den Klimakammern erfolgte die Pflanzenanzucht bei einer Temperatur von 20°C und einer Tageslänge von 10 Stunden (Kurztag); die Lichtintensität betrug 100  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . In den Klimaschränken (Intellus Environmental Controller, Percival CLF Plant Climatics, Emersacker) wurden je nach Untersuchung eine Temperatur von 22°C (Standardbedingungen) bzw. 4°C (Kältebehandlung) und eine Tageslänge von 10 Stunden (Kurztag) bzw. 16 Stunden (Langtag) eingestellt; die Lichtintensität in den Klimaschränken war so hoch wie diejenige in den Klimakammern.

#### ED-73 Einheitserde:

N	300 mg/l
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	300 mg/l
K <sub>2</sub> O	600 mg/l
KCl	3 g/l
pH-Wert (CaCl <sub>2</sub> )	6,0

### 2.1.3 Oberflächensterilisation der Samen

Die Oberflächensterilisation der Samen erfolgte für die Pflanzenanzucht auf Agarplatten. Hierzu wurden die Samen in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gegeben und für 2 min in einem Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) unter Schütteln (1000 rpm) inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (30 s, 21 000 g), der Überstand verworfen und die Samen mit 500 µl 15% (v/v) Natriumhypochlorit versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min unter ständigem Schütteln (10 min, 22° C, 1000 rpm) in einem Thermomixer wurde zentrifugiert (30 s, 21.000 g) und der Natriumhypochlorit-Überstand verworfen. Die Samen wurden anschließend dreimal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen.

### 2.1.4 Keimungstests

Für die Keimungstests wurden die Samen direkt nach der Sterilisation auf Platten mit MS-Medium in regelmäßigen Abständen aufgetragen. Pro Platte wurden jeweils 26 Samen von Wildtyp-Pflanzen und Mutanten ausgesät. Hierbei erfolgte keine Stratifikation.

#### MS-Medium:

2,203 g/l	Murashige Skoog Medium mit Vitaminen
0,05% (w/v)	MES pH 5,7 (KOH)
0,8% (w/v)	Agar

## 2.2 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Duchefa (Harlem, Niederlande), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), NEB (Schwalbach), Promega (Mannheim), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Für die Klonierung und Mutagenese von Plasmidvektoren wurden *E.coli*-Zellen des Stammes XL1-blue (Bullock et al., 1987) verwendet. Die Herstellung transgener Pflanzen erfolgte mittels Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes GV3101 (Koncz und Schell, 1986).

### 2.3.2 Verwendete Vektoren und Konstrukte

Tabelle 2.2 führt die verwendeten Vektoren bzw. Konstrukte auf, die zur Klonierung, Expression oder Transformation herangezogen wurden.

**Tabelle 2.2: Übersicht zu den verwendeten Vektoren und Konstrukten**

Vektor	Merkmale	Referenz
pBSK	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup> , Klonierungsvektor	Bullock et al., 1987
pCambia1200	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , Rif <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup> , Pflanzentransformation	Hajdukiewicz et al., 1994
pHannibal	Amp <sup>r</sup> , Klonierungsvektor, CaMV 35S-Promotor	Gleave, 1992
pART27	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , Rif <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Pflanzentransformation	Gleave, 1992
pGPTV	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , Kan <sup>r</sup> , Promotor-GUS-Analyse	Becker et al., 1992

Konstrukt	Vektor und Insert	Referenz
pMH45	pGPTV, Promotor von <i>TDT</i>	Hurth, 2005
pSW7	pCambia1200, cDNA von <i>TDT</i>	diese Arbeit
pSW8	pGPTV, Promotor von ERD6.5	diese Arbeit
pKA4	pART27, cDNA von <i>BvIMP</i>	Awwad, 2008

### 2.3.3 Anzucht von Bakterien

*E.coli*-Zellen wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen in YT-Medium (Sambrook et al., 2001) bzw. nach Transformation in  $\psi$ B-Medium (Hanahan, 1983) angezogen. *A. tumefaciens*-Zellen des Stammes GV3101 wurden unter aeroben Bedingungen bei 30°C in YEB-Vollmedium angezogen.

#### YT-Medium:

0,8% (w/v)	Pepton
0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,25% (w/v)	NaCl, pH 7,0 (NaOH)

#### $\psi$ B-Medium:

2,0% (w/v)	Pepton
0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,4% (w/v)	MgSO <sub>4</sub>
10 mM KCl	pH 7,6 (KOH)



YEB-Medium:

0,5% (w/v)	Beef-Extrakt
0,5% (w/v)	Pepton
0,1% (w/v)	Hefe-Extrakt
2 mM	MgSO <sub>4</sub>

Agarplatten der verwendeten Medien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Die Medien wurden bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Zugabe geeigneter Antibiotika (Tab. 2.3). Zur Aufbewahrung der selektierten Bakterienklone wurden entsprechende Übernachtskulturen mit Glycerin (15% (v/v)) versetzt und bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 2.3: Konzentration der eingesetzten Antibiotika**

Antibiotikum	Konz. für <i>E. coli</i> [µg/ml]	Konz. für <i>A. tumefaciens</i> [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	200	-
Chloramphenicol (CIm)	25	25-50
Gentamycin (Gen)	-	25
Kanamycin (Kan)	25	25
Rifampicilin (Rif)	100	100
Tetrazyclin (Tet)	10	1-2

### 2.3.4 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide sind kurze einzelsträngige DNA-Fragmente, die hier als Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) und für Sequenzierungsanalysen verwendet wurden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg). Tabelle 2.4 führt die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide auf.

**Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide (Primer)**

Name	Sequenz 5' 3'
19450-rt.down	GCATGAAATACAGACACAGGG
19450-rt.up	GAATGGGACCAATTCCATGG
35S_fwd_neu	CTCATCAAGACGATCTACCCG
75220.rt-down2	TTCTCATTGGGAATGGGACC
75220.rt-up2	CTTGGCCAAAACAGAGAGGG
At1g19450for_NdeI	TTTCATATGAGTTTTAGGGATGATAATACGG
At1g19450gusfor	TCTAGATCAATATCAACGAGGTAGCG
At1g19450gusrev	GGGCCTCTTCCGTATTATCATCCC
At1g19450rev_BamHI	TTTGGATCCTCATCTGAACAAAGCTTGGATC
AtEF-1α for	GAGACCACCAAGTACTACTGCAC
AtEF-1α rev	GTTGGTCCCTTGTACCAGTCAAG
BvIMP_for_XhoI	TTTCTCGAG ATGAGTTCAGATTCAGAAGC
BvIMP_rev_HindIII	TTTAAGCTTTTATCTTCTGAAGGACC
dtip.rt-down	GTCATGGTTTTGCTCTCTTCG
dtip.rt-up	CCTACTAGTGCGAAATGAAACC
LBP	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
NaDC-downXhoI	GGAATACTCGAGATGAACGGTGG
NaDC-seq.up	CCCAAGAGTGGGCATCAAGATGG
NaDC-rt.down	CTACGTTATGCATCCACATGC
NaDC-rt.up	TGTGTCTATGCGTAGATCTCG
NaDC-upHindIII	TGGCTTAAGCTTCTAAACTCCTCCC
pHan-NaDC.down	TCCCGGGTCGTATGTTGTGTGG
pHan-NaDC.up	AGTCACGACGTCGACAAACGACG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

### 2.3.5 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Bakterienzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, fremde DNA aufnehmen zu können. Als Transformation wird dabei der Vorgang bezeichnet, bei dem fremde DNA in lebende Zellen eingefügt wird. Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurde eine Übernachtskultur in 100 ml  $\psi$ B-Medium (Kap. 2.3.3) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden die Zellen für 45 Minuten auf Eis abgekühlt und sedimentiert (7000 g, 10 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 40 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Das Sediment wurde in 4 ml TFB2-Medium

aufgenommen. Die aliquotierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

TFB1-Puffer:

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
30 mM	KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15% (v/v)	Glycerin

TFB2-Puffer:

75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
15% (v/v)	Glycerin

Der pH von TFB1 wurde auf 5,8 (verdünnte Essigsäure) und der pH von TFB2 auf 7 (NaOH) eingestellt. Anschließend wurden beide Puffer sterilfiltriert. Zur Herstellung von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen wurde zunächst eine Übernachtskultur in YEB-Medium angezogen. Mit dieser Übernachtskultur wurden anschließend 200 ml YEB-Medium (+Rifampicin) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei  $30^{\circ}\text{C}$  unter aeroben Bedingungen bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 *g*, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert, in TE-Medium gewaschen und in YEB-Medium (+Rifampicin) resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

TE-Medium:

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

### 2.3.6 Transformation von *E. coli*

In dieser Arbeit wurden kompetente *E.coli*-Zellen durch die so genannte Hitzeschock-Transformation transformiert. Hierzu wurde ein Aliquot von 200  $\mu\text{l}$  kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von maximal 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 20  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock in einem Wasserbad bei  $42^{\circ}\text{C}$  für eine Dauer von einer Minute, wodurch die direkte Aufnahme von Fremd-DNA in die Bakterienzellen erleichtert wurde. Im Anschluss wurden die Zellen für

5 min auf Eis gelagert und danach in 800 µl nicht selektivem  $\psi$ B-Medium für eine Stunde bei 37°C aerob angezogen. In dieser Zeit wurde es den transformierten Zellen ermöglicht, das Plasmid-kodierte Ampicillin-Resistenzgen ( $\beta$ -Lactamase) zu exprimieren. Zur Selektion wurden die transformierten Zellen zunächst bei 5000 g sedimentiert und überschüssiges Medium bis auf 200 µl verworfen. Nach dem Resuspendieren der Zellen wurden diese auf selektiven YT-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

### 2.3.7 Transformation von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen

Ein Aliquot kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 0,5–2 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach 5 min bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Vollmedium wurden die Zellen für 4–6 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. In dieser Zeit wurde es den Zellen ermöglicht, die Plasmid-kodierte Antibiotika-Resistenz auszubilden. Durch mehrfache Verdünnungsausstriche wurden selektierte Kolonien vereinzelt. Dieser Schritt ist notwendig, weil nicht-transformierte *A. tumefaciens*-Zellen bedingt durch *cross-feeding* auch sekundär Kolonien bilden können.

### 2.3.8 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen

Molekularbiologische Arbeiten wie DNA-Sequenzierungen, Restriktionsanalysen und Ligationen erfordern die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen. Die Plasmid-Isolierung beruht dabei auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Da für DNA-Sequenzierungen bzw. Klonierungen besonders reine Plasmid-DNA benötigt wird, wurde hierfür die Plasmid-Isolierung mit Hilfe des QIAprep-Spin-Kits (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Für Restriktionsanalysen wurde die Plasmid-Isolierung in Form einer Mini-Plasmid-Präparation durchgeführt. Hierbei wurden für die Isolierung von high-copy-Plasmiden 1,5 bis 3 ml Übernachtskultur und für die Isolierung von low-copy-Plasmiden 3 bis 5 ml Übernachtskultur verwendet. Durch Zentrifugation für 2 min bei 7000 g und 4°C wurden die Bakterien sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl P1-Puffer mit 1 mg/ml DNase freier RNase (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte im Anschluss durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (Qiagen, Hilden). Dieser enthält Natriumdodecylsulfat (SDS). Frei werdende Proteine sowie chromosomale DNA werden bei diesem Schritt durch NaOH denaturiert. Diese Reaktion wurde nach spätestens 5 min durch Hinzufügen von 200 µl P3-Puffer (Qiagen, Hilden) gestoppt. Proteine und chromosomale DNA fielen nach mehrmaligem Invertieren und 10 min Inkubation auf Eis durch das enthaltene Kaliumacetat als Salz-Detergens-Komplexe aus und ließen sich durch Zentrifugation sedimentieren (20 000 g, 20 min, 4°C). Die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Der nach anschließender

Zentrifugation (12 000 *g*, 15 min, 4°C) entstandene Plasmid-DNA-Niederschlag wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 80 µl Wasser resuspendiert.

P1-Puffer:

25 mM	Tris-HCl, pH 8
10 mM	EDTA
1 mg/ ml	DNase freie RNase

P2-Puffer:

0,2 N	NaOH
1% (w/v)	SDS

P3-Puffer:

3 M Kaliumacetat  
pH 5,8 (Essigsäure)

### 2.3.9 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die genaue Konzentration der isolierten Plasmid-DNA war für die weiteren Arbeiten wie Sequenzanalysen oder *in-vitro*-Manipulation von DNA (Kap. 2.3.10) notwendig. Diese wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop® ND-1000 (PepqLab, USA) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Es wurde jeweils 1 µl der zu bestimmenden Lösung eingesetzt.

### 2.3.10 *In-vitro*-Manipulation von DNA

Unter *In-vitro*-Manipulation versteht man das gezielte Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen und das kontrollierte Zusammenfügen von DNA-Fragmenten durch Ligasen. Dadurch ist man in der Lage, Konstrukte von Vektoren und ausgewählten Genen zu erzeugen. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Auftrennung der geschnittenen DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.3.12). Die ausgefallenen Fragmente konnten im Anschluss mit dem Nucleo-Spin-Extract II-Kit™ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert werden. Hierbei wird die DNA an einer Silika-Membran unter hohen Salzkonzentrationen absorbiert. Durch Waschen der Membran können Agaroserückstände, Proteine und Salze entfernt werden. Die DNA kann durch einen leicht alkalischen Puffer von der Membran eluiert werden.

### 2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) versteht man die spezifische *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1988). Die Spezifität der Amplifikation wird bedingt durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, die die zu amplifizierende Region (*Template*) flankieren. Für die Synthese neuer DNA-Stränge, die von einer DNA-Polymerase katalysiert wird, sind Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in den Reaktionsansätzen enthalten.

Die Reaktion beginnt mit einer Denaturierung der Doppelstränge bei 94°-95°C, um eine spätere Bindung von Primer und DNA-Polymerase zu ermöglichen. Daran schließt sich die Annealing-Phase bei 45°C-68°C an, in der sich Polymerase, Primer und Template zusammenlagern. Die Annealing-Temperatur liegt in der Regel ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Elongation, das heißt die eigentliche Amplifikation des Templates, erfolgt in der Regel bei 72°C und richtet sich nach dem Temperatur-Optimum der verwendeten thermostabilen Polymerase. Die Spezifität der PCR wird durch die Wahl der Primer und die Annealing-Temperatur bestimmt. Die Genauigkeit und Geschwindigkeit der Amplifikation wird durch die gewählte Polymerase festgelegt. Für Nachweis-Reaktionen wurde die *Taq*-Polymerase und für Klonierungen die *Pfu*-Polymerase verwendet.

Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem thermostabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* und besitzt ein Temperaturoptimum bei 72°C und ein pH-Optimum größer pH 8. Vorteil dieser Polymerase ist die Syntheserate, welche bei durchschnittlich 2800 Nukleotiden • min<sup>-1</sup> liegt (Mühlhardt, 2006). Die *Pfu*-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* und besitzt eine Syntheserate von 550 Nukleotiden • min<sup>-1</sup>. Die *Pfu* ist demnach langsamer als die *Taq*, jedoch mit einer Fehlerhäufigkeit von einer falschen Base pro 10<sup>6</sup> eingebaute Basen wesentlich genauer als die *Taq*, welche eine zehnmal so hohe Fehlerhäufigkeit aufweist (Mühlhardt, 2006). Die *Pfu*-Polymerase produziert keine unspezifischen Überhänge und ist auch temperaturstabiler als die *Taq*.

Alle PCR-Ansätze wurden in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) inkubiert. Ein PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl) enthielt standardmäßig 10-100 ng DNA-Template, 200 µM dNTPs, jeweils 50 pmol Oligonukleotid-Primer (sense und antisense), zehnfach-PCR-Puffer und 2 Units DNA-Polymerase.

Die gewählten PCR-Programme bestanden aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung	5 min	95 °C	} 30x
2. Denaturierung	1 min	95 °C	
3. Anlagerung der Primer	30 sec	X °C	
4. Strangverlängerung	Y min	72 °C	
5. Abschlussverlängerung	10 min	72 °C	
	∞	4 °C	

Die Annealingtemperatur (X °C) richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer. Die Elongationszeit (Y min) war bedingt durch die Länge des zu amplifizierenden Fragments und durch die verwendete Polymerase.

### 2.3.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäure-Molekülen aufgrund ihrer Größe. Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Dabei laufen kleinere Fragmente schneller durch die Gelmatrix als größere. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist abhängig von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Als Gelmatrix verwendet man Agarose, ein lineares Polymer, das durch Aufkochen im Wasser gelöst wird. Beim Erkalten der Lösung lagern sich die Polysaccharid-Ketten zu Faserbündeln zusammen. Durch die Störungen der Monomeren-Ketten entstehen Unterbrechungen in den Faserbündeln, und es kommt zur Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen. In diesem Netzwerk laufen die kleineren Moleküle aufgrund der besseren Beweglichkeit schneller durch die Gelporen als die größeren. Nach der Auftrennung durch die Gelelektrophorese lassen sich die Nukleinsäuren unter UV-Licht ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar machen. Abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente wurden 1-1,5%ige Agarose-Gele hergestellt. Die Agarose wurde mit TAE-Puffer aufgekocht, unter Rühren auf unter 50 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt. Zur Markierung der Lauffront wurde den Proben 10x TAE-Ladepuffer zugegeben. Als Größenstandard wurde  $\lambda\text{PstI}$  Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit TAE-Puffermedium gefüllten horizontalen Gelelektrophoresekammer bei einer angelegten Spannung von ca. 120 mV.

50-fach TAE-Puffermedium:

2 M Tris, pH 8,0 (HCl)

2 M CH<sub>3</sub>COOH

0,1 M EDTA

10-fach Ladepuffermedium:

30% (v/v) Glycerin

0,25% (v/v) Bromphenolblau

in 10-fach TAE-Puffer ansetzen

Agarosegel:

1-1,5% (w/v) Agarose in 1-fach TAE-Puffer

0,5 µg • ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid

**2.3.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der Trennung der DNA-Moleküle mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.3.12) wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter UV-Licht ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II-Kits (Macherey & Nagel, Düren) gemäß den Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

**2.3.14 Real-time quantitative PCR****2.3.14.1 RNA-Isolierung**

Zur RNA-Isolierung für eine anschließende Real-time quantitative PCR wurde das RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten ca. 100 mg gemörsertes Blattmaterial. Um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein Verdau mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

**2.3.14.2 cDNA-Synthese**

Für die Real-time quantitative PCR wurde RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) nach den Empfehlungen des Herstellers synthetisiert.



### 2.3.14.3 Prinzip und Durchführung der Real-time quantitativen PCR

Die gewonnene cDNA diente als Template für Expressionsanalysen mittels RTQ-PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction). Die Amplifikation wurde mit dem IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) in einem *Lightcycler* (MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad) durchgeführt. Nach jedem Elongationszyklus wird hierbei die Fluoreszenz aufgrund der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green in die doppelsträngige DNA bestimmt. Die Ansätze für die RTQ-PCR bestanden aus folgenden Komponenten:

10 µl	IQ™ SYBR® Green Supermix
1 µl	Primer, forward (10 pmol)
1 µl	Primer, reverse (10 pmol)
1 µl	cDNA
7 µl	H <sub>2</sub> O

Die Temperatur-Zyklen wurden folgendermaßen gewählt:

Zyklus 1:	95°C	3 min	
Zyklus 2:	95°C	15 sec	} 40x
	58°C	25 sec	
	72°C	40 sec	
Zyklus 3:	95°C	1 min	
Zyklus 4:	58°C	1 min	
Zyklus 5:	50°C	10 sec	91x

Als Quantifizierungsmaß dient der so genannte CT-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus); dieser markiert den Punkt, an dem sich das Fluoreszenz-Signal innerhalb der Probe von einem definierten Schwellenwert, der sich aus dem Hintergrund-Rauschen ergibt, abhebt. Die Spezifität der eingesetzten Primer wird durch die Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR kontrolliert. In der Regel wird die Transkript-Menge eines untersuchten Gens auf die Transkript-Menge eines *house-keeping* Gens bezogen, dessen Transkriptionsrate annähernd konstant ist. Bei dem hier verwendeten *house keeping*-Gen handelt es sich um den Elongationsfaktor *EF-1α*. Diese Form der Quantifizierung wird als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet (Rasmussen et al., 2001). Die relative Transkript-Menge wird ermittelt, indem man zunächst die Anzahl der DNA-Kopien vor der PCR ( $N_0$ ) berechnet (Formel 1). Hierbei wird auch die PCR-Effizienz (E) berücksichtigt, die über eine cDNA-Verdünnungsreihe für die verwendeten Primerpaare bestimmt wird. Die relative Transkript-

Menge ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen  $N_0$  der Probe und  $N_0$  des Referenz-Gens (hier  $EF-1\alpha$ ). Für den IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, München) gilt, dass die gemessene Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge der amplifizierten DNA ( $N_n$ ) ist, so dass  $N_n$  gleich 1 gesetzt werden kann.

$$N_0 = \frac{N_n}{E^{CT}} \text{ (Formel 1)}$$

$N_0$ : Anzahl der DNA-Kopien vor Beginn der PCR

$N_n$ : Anzahl der DNA-Kopien nach n Zyklen

E: Faktor der PCR-Effizienz

$C_T$ : Anzahl der Zyklen

### 2.3.15 Northern Blot

#### 2.3.15.1 RNA-Isolierung

Für die Northern Blot-Analyse wurde RNA nach einem modifizierten Protokoll der Firma Gentra Systems Inc. (Minneapolis, USA) isoliert. Die Methode beruht auf der phenol- und chloroformfreien Entfernung von Proteinen und DNA. Die nachfolgende Präzipitation der RNA erfolgte durch eine Isopropanolfällung. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde zunächst in Stickstoff gemörsert und jeweils ca. 150 mg in 700  $\mu$ l Zellysepuffer mit einem Potter (B. Braun AG, Melsungen) homogenisiert. Nach der Zellyse wurden 200  $\mu$ l Präzipitationspuffer zugegeben, invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das entstehende Präzipitat wurde anschließend durch eine Zentrifugation (18 000 g, 5 min, 4°C) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA konnte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol (700  $\mu$ l) gefällt werden. Die Fällung erfolgte bei RT für 15 min. Die RNA wurde dann durch Zentrifugation bei 18 000 g (5 min, 22°C) pelletiert und im Anschluss mit 300  $\mu$ l Ethanol (70-75%) gewaschen. Nach Trocknung der isolierten RNA unter der Sterilbank wurde diese in 30  $\mu$ l Wasser gelöst. Optimiert wurde der Lösungsvorgang der RNA durch 5-minütige Inkubation bei 65°C. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spektralphotometer NanoDrop® ND-1000 (Peachlab, USA) (Kap. 2.3.9).

#### Zellysepuffer:

2% (w/v)	SDS
68 mM	(tri-) Na-Citrat
132 mM	Zitronensäure
10 mM	EDTA
pH 3,5	

Protein-Präzipitationspuffer:

4M            NaCl  
17 mM        (tri-) Na-Citrat  
33 mM        Zitronensäure  
pH 3,5

**2.3.15.2 Formaldehyd-Gele zur Auftrennung von Gesamt-RNA**

Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem 1,1%-igen formaldehydhaltigen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 825 mg Agarose in 62 ml Wasser und 7,5 ml 10x MOPS-Puffer aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und 5,5 ml Formaldehyd zugegeben. Nach Durchmischen wurde die Lösung in eine Gelapparatur gegeben. Pro Spur wurden 8 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Die dazu benötigte Menge an RNA-Lösung wurde hierzu in x µl Wasser (ad 20 µl) gelöst und mit 20 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Vor Auftragen dieser Lösung auf das Gel wurden die Sekundärstrukturen der RNA bei 60°C (5 min) denaturiert, dann die Proben auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der RNA fand in 1x MOPS-Puffer bei 70 Volt (ca. 4 Volt/cm) statt. Nach Beenden der Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht ( $\lambda=320$  nm) kontrolliert (rRNA Kontrolle). Um die RNA vor dem Abbau durch RNasen zu schützen, wurden alle Puffermedien mit DEPC versetzt (Endkonzentration 0,1%) und nach Inkubation über Nacht autoklaviert, so dass überschüssiges DEPC inaktiviert wurde. Die Gelkammern und Taschenkämme wurden vor Verwendung mit Ethanol abgewaschen und eine Stunde in einer wässrigen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert. Außerdem wurden RNase-freie Glaswaren (8 h bei 180°C gebacken) sowie sterile Kunststoffartikel verwendet.

10x MOPS Puffer:

200 mM       MOPS  
50 mM        Natriumacetat  
10 mM        EDTA  
pH 6,8 (NaOH)

RNA-Probenpuffer (pro 20 µl):

3 µl    10-fach MOPS  
5 µl    Formaldehyd  
10 µl   Formamid  
2 µl    Glycerin/Bromphenolblau  
1 µl    Ethidiumbromid

### 2.3.15.3 Transfer von RNA-Molekülen auf Nylonmembranen

Nachdem die Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt worden war, konnte sie auf eine Nylonmembran (Nytran-Plus, Schleicher & Schuell, Germany) transferiert werden. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung mit einer genspezifischen [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde. Das Formaldehydgel wurde nach Auftrennung der RNA zweimal für 15 min in Wasser gewaschen und anschließend zur Äquilibration 15 min in 10x SSC-Puffermedium inkubiert. Die RNA lag im Formaldehydgel in denaturiertem Zustand vor und wurde durch die hohe Salzkonzentration des Transferpuffers aus dem Agarosegel gelöst, durch einen Kapillarstrom (erzeugt durch saugfähiges Papier) mobilisiert und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 22 °C mit 10x SSC-Puffermedium. Der RNA-Transfer konnte unter UV-Licht ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ ) kontrolliert werden.

#### 10x SSC:

0,15 M	Natriumcitrat (pH 7,0)
1,5 M	NaCl

### 2.3.15.4 Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Nukleinsäuren wurden kovalent an Nylonmembranen gebunden (*cross linking*), indem sie UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm ( $120 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) in einem UV-Ofen (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgesetzt wurden.

### 2.3.15.5 Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden

Für die Herstellung radioaktiver DNA-Sonden wurden 100 bis 250 ng Template-DNA eingesetzt. Die DNA wurde hierfür bei 95 °C denaturiert und nach Abkühlung auf Eis mit 3  $\mu\text{l}$  5-fach Markierungsmix und 2  $\mu\text{l}$  [<sup>32</sup>P]-dCTP ( $3000 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ , Amersham Biosciences, Freiburg) versetzt. Durch den Einbau von radioaktiv-markiertem [<sup>32</sup>P]-dCTP wurde die DNA während der *in vitro*-Synthese des komplementären Stranges markiert. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die jeweils aus sechs Nukleotiden bestanden und deren Basensequenz zufällig war (*random priming*). Die Synthese der DNA-Sonde erfolgte bei 37 °C. Durch Zugabe von 35  $\mu\text{l}$  TEN wurde die Polymerase-Reaktion nach 30 min abgestoppt. Mittels einer Gelfiltrations-Chromatographie (Probe Quant™ G-50 Micro Columns, Amersham Biosciences, Freiburg) konnten nicht eingebaute Nukleotide von der neusynthetisierten DNA-Sonde entfernt werden.

5-fach Markierungsmix:

250 mM	Hepes-KOH (pH 7,0)
50 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5 mM	DTE
10 mM	Spermidin
125 µM	dATP
125 µM	dGTP
125 µM	dTTP
0,5%	Triton X100
1 µg/µl	BSA
0,2 µg/µl	Randomprimer (dN9)
0,0025 U/µl	anorg. Pyrophosphatase
1 U/µl	Klenow DNA-Polymerase
45%	Glycerin

TEN:

10 mM Tris,	pH 7,5 (HCl)
1 mM	EDTA
100 mM	NaCl

**2.3.15.6 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden**

Die Expressionsanalysen erfolgten unter Verwendung einer für das Gen spezifischen und radioaktiv markierten Sonde. Hierzu wurde der Northern Blot mit Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) für 60 min bei 65°C in einem Hybridisierungssofen (Biometra GmbH, Göttingen) vorhybridisiert, um unbesetzte Membranbindestellen abzusättigen. Die DNA-Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Um unspezifisch gebundene DNA-Sonden von der Membran zu entfernen, wurde diese zweimal für 30 min mit vorgewärmtem Waschpuffermedium I bei 65°C und einmal für 15 min mit Waschpuffermedium II bei RT inkubiert.

Nach kurzem Trocknen der Nylonmembran wurde diese für 1-3 Tage auf einem Packard MP Storage Phosphor Screen (Packard, Darmstadt) in einer lichtundurchlässigen Expositionskassette (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Die Auswertung erfolgte am Cyclone™-Storage-Phosphor-System-Scanner (Packard, Darmstadt) mit dem Computerprogramm OptiQuant™ (Packard, Darmstadt).

Churchpuffer:

250 mM	di-Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1 mM	EDTA
1% (w/v)	BSA
7% (w/v)	SDS

Waschpuffermedium I:

40 mM	di-Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1 mM	EDTA
0,5% (w/v)	BSA
5% (w/v)	SDS

Waschpuffermedium II:

40 mM	di-Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1 mM	EDTA
1% (w/v)	SDS

**2.3.16 GUS-Färbung**

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Promotoraktivität wurde der Promotorbereich des zu untersuchenden Gens mit einem Reporter-gen fusioniert und die Expression *in planta* histochemisch analysiert. Beim Reporter-gen handelt es sich um das *uidA*-Gen (aus *E. coli*), welches für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert. Zum Nachweis der Reporter-gen-Aktivität wurde das zu untersuchende Pflanzengewebe mit dem synthetischen Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid) infiltriert, welches nach oxidativer Kondensation und Spaltung einen blauen Farbniederschlag am exakten Syntheseort liefert. Hierfür wurde das Pflanzenmaterial zunächst mit 90% (v/v) Aceton für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe 20 min in Färbepuffer ohne X-Gluc inkubiert und anschließend 20 min in Färbepuffer mit 2 mM X-Gluc infiltriert. Nach einer Inkubation über Nacht (bei 37°C) konnten pflanze-eigene Farbreste durch 30-minütige Waschschr- itte mit jeweils 20%, 35%, 50% und 75% (v/v) Ethanol entfernt werden. Anhand der verbleibenden Blaufärbungen ließ sich die gewebespezifische Promotoraktivität unter Verwendung des Stereomikroskops Leica MZ10F (Leica Camera AG, Solms) nachweisen.

Färbepuffer:

50 mM	Natrium-Phosphat
1% (v/v)	Triton X100
10 mM	Kalium-Ferrocyanid
10 mM	Kalium-Ferricyanid

**2.3.17 DNA-Sequenz-Analyse**

Zur Überprüfung der klonierten DNA-Konstrukte auf ihre Richtigkeit wurden Sequenzanalysen nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger, 1977) durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgten im Westpfalz-Klinikum (Kaiserslautern).

**2.3.18 Transformation von Arabidopsis**

Arabidopsis wurde mit der *floral dip* Methode transformiert (Clough und Bent, 1998). Dazu wurden zunächst 250 ml einer Übernachtskultur transformierter Agrobakterien (Kap. 2.3.7) bei 3000 *g* für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Agrobakterien wurden in 500 ml 5%iger Saccharose-Lösung mit 0,01% (v/v) Silwet L77 (BASF, Ludwigshafen) resuspendiert. Danach wurden die Pflanzen mit ihren Blütenständen in die Agrobakterien-Suspension für ca. 20 s getaucht und für zwei Tage im Schwachlicht inkubiert. Schließlich konnten die transformierten Pflanzen bis zur Samenreife unter Langtag-Bedingungen gehalten werden.

**2.4 Computergestützte Analysen**

Die hier analysierten Gensequenzen entstammen den Datenbanken NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und Aramemnon (Schwacke et al., 2003; <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>). DNA- und Proteinsequenzen wurden mithilfe des Programms Clone Manager (Version 7) untersucht. Expressionstudien bezüglich der Gewebe- und Entwicklungsspezifität wurden mit den Datenbanken Genevestigator (Zimmermann et al., 2004; [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)) und Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007; <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) durchgeführt. Cis-Elemente wurden mithilfe der Datenbank PLACE (Higo et al., 1999; [www.dna.affrc.go.jp/PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/)) identifiziert. Poteinsequenz-Alignments wurden mit dem Programm ClustalW (Thomson et al., 1994; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) erstellt und mit GENEDOC (Nicholas und Nicholas, 1997) nachbearbeitet.

## 2.5 Physiologische und biochemische Methoden

Die Untersuchungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, an adulten Pflanzen im Alter von fünf bis sechs Wochen ca. fünf Stunden nach Beginn der Lichtphase.

### 2.5.1 Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts

Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden von den zu untersuchenden Pflanzen die Blätter abgeschnitten und direkt auf einer Feinwaage (Sartorius Analytik, Göttingen) abgewogen. Anschließend wurden die Blätter bei 60°C zwei Tage getrocknet. Danach erfolgte die Erfassung des Trockengewichts.

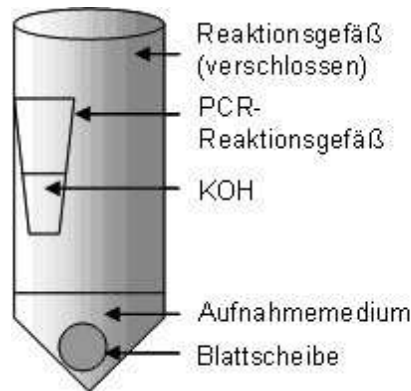
### 2.5.2 Bestimmung des totalen Wassergehalts

Zur Bestimmung des totalen Wassergehalts von Blättern wurde die Differenz zwischen Frischgewicht und Trockengewicht gebildet und durch das Frischgewicht geteilt. Der so ermittelte Wert ist dimensionslos.

### 2.5.3 Blattscheibentest zur Glukoseveratmung

Um die Veratmung applizierter Glukose zu untersuchen, wurden Blattscheiben in ein Medium gegeben, welches radioaktiv-markierte [<sup>14</sup>C]-Glukose enthielt. Während einer Inkubation im Dunkeln nahmen diese die radioaktive Glukose auf und veratmeten sie. Diese Veratmung wurde von Wildtyp und *TMT*-Triplemutanten bei Kältestress vergleichend gemessen. Als Kontrolle dienten bei 22°C gehaltene Pflanzen der jeweiligen Genotypen. Hierzu wurde mit einem Korkbohrer (Ø 5 mm) jeweils eine Blattscheibe ausgestochen. Die Blattscheibe wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl Aufnahmemedium überführt. Darüber wurde im Innern des Reaktionsgefäßes ein PCR-Reaktionsgefäß mittels Vaseline angebracht, in dem sich 50 µl 1 N KOH (frisch angesetzt) befanden (Abb. 2.1). Die KOH-Lösung absorbierte das bei der Veratmung entstandene CO<sub>2</sub>. Der Versuch wurde nach 3, 6 und 12 h durch Zugabe von 100 µl 2 N HCl in das Aufnahmemedium gestoppt. Bevor das abgefangene radioaktive CO<sub>2</sub> mit Hilfe eines Szintillationszählers (2500 TR, Packard, Frankfurt/M.) quantifiziert werden konnte, wurden die Proben 12 h bei 22°C inkubiert, damit sämtliches CO<sub>2</sub> in der KOH-Lösung aufgenommen werden konnte. Anschließend wurde die KOH-Lösung in 4 ml Szintillationscocktail (Rotiszint® Eco plus, Roth, Karlsruhe) überführt. Im Szintillationszähler wurden die Zerfälle pro Minute gemessen.



Aufnahmemedium:100  $\mu$ M Glukose1  $\mu$ Ci/100 $\mu$ l [ $^{14}$ C]-Glukose**Abb.2.1 : Versuchsaufbau zur Veratmung applizierter Glukose****2.5.4 Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II**

Durch Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz können Aussagen über den aktuellen Status des Photosystems II gemacht werden. Das IMAGING-PAM (Puls-Amplituden-Modulation) Chlorophyll Fluorometer (Waltz, Effeltrich) dient zur *in vivo* Messung der Chlorophyllfluoreszenz. Störungen des Photosyntheseapparates können über definierte Chlorophyllfluoreszenz-Parameter nach Bestrahlung mit Lichtpulsen sichtbar gemacht werden. Mit dem Fluorometer wird die Grundfluoreszenz  $F_o$ , die maximale Fluoreszenz  $F_m$ , die variable Fluoreszenz ( $F_v = F_m - F_o$ ) und die optimale Quantenausbeute des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) erfasst. Das IMAGING-PAM Chlorophyll Fluorometer ermöglicht Bildaufnahmen der photosynthetischen Aktivität von Blättern. Für die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II (Verhältnis zwischen der Anzahl der absorbierten und emittierten Photonen) wurden die untersuchten Pflanzen (Wildtyp und *TMT*-Nullmutante) zuvor für eine Woche bei 4°C in einem Klimaschrank gehalten. Zur Kontrolle dienten Pflanzen, die bei 22°C wuchsen.

**2.5.5 Quantitative Metaboliten-Bestimmung****2.5.5.1 Extraktion von Aminosäuren und Zucker**

Um Zucker und Aminosäuren aus dem Pflanzenmaterial zu extrahieren, wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 500  $\mu$ l Ethanol (80%) versetzt und gevortext. Anschließend wurde das Gemisch 60 min bei

80 °C im Thermomixer gekocht und geschüttelt, um Zucker und Aminosäuren in Lösung zu bringen. Der Ansatz wurde für 10 min bei 18 000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das zurückgebliebene Pellet konnte für eine anschließende Stärkeextraktion bei –20 °C aufbewahrt werden. Der Überstand wurde für 3 h bei 60 °C und 200 mbar in einer RC1010 Speed-Vac (Jouan, Winchester, VA) getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 100 µl Wasser aufgenommen und 20 min bei 30 °C im Thermomixer geschüttelt.

### **2.5.5.2 Extraktion von Karbonsäuren und anorganischen Ionen**

Um den Gehalt von Karbonsäuren und anorganischen Ionen zu ermitteln, wurden je 100 mg gemörserteres Pflanzenmaterial in 1 ml deionisiertem Wasser aufgenommen und geschüttelt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, um die enthaltenen Enzyme zu inaktivieren. Danach wurden die Proben für 10 min bei 20 000 g zentrifugiert. Für die anschließenden Untersuchungen wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **2.5.5.3 Extraktion und Quantifizierung von Stärke**

Zur Extraktion der Stärke wurde das nach der Zuckerextraktion verbliebene Pellet (Kap. 2.5.5.1) zweimal mit 500 µl Ethanol (80%) und einmal mit 500 µl Natriumacetat (50 mM, pH 4,7) gewaschen. Das Pellet wurde mit 500 µl Natriumacetat (50 mM, pH 4,7) versetzt und 40 min autoklaviert, um die Bindungen der Stärkemoleküle zu lösen. Danach folgte eine enzymatische Spaltung der Stärke in Glukose durch Zugabe von jeweils 5 U  $\alpha$ -Amylase und 5 U Amyloglukosidase (Inkubation 2 h bei 37 °C und 900 rpm). Zum anschließenden Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz 15 min bei 95 °C aufgeköcht und nach dem Abkühlen für 10 min bei 20 000 g zentrifugiert. Anschließend konnte die Glukose-Konzentration im Überstand als Quantifizierung des Stärkegehalts bestimmt werden (Kap. 2.5.5.4).

### **2.5.5.4 Quantifizierung von Zuckern, Karbonsäuren und anorganischen Ionen**

Die Konzentrationen von Zuckern, Karbonsäuren und anorganischen Ionen wurden mit Hilfe der Ionenchromatographie ermittelt. Die Ionenchromatographie ist eine Form der HPLC (high performance liquid chromatography), bei der als stationäre Phase ein Ionenaustauscher (meist auf Basis eines Polymermaterials) eingesetzt wird. Die maßgeblichen Wechselwirkungen sind Kationen- bzw. Anionenaustausch. Als mobile Phase werden abhängig von der jeweiligen Trennung saure oder basische Puffer eingesetzt. Die genauen Geräte-Einstellungen und Parameter richteten sich nach den zu untersuchenden Substanzen (Anhang, Kap. 8.6).

### 2.5.5.5 Quantifizierung von Aminosäuren

Für die Quantifizierung der Aminosäuren wurden die entsprechenden Extrakte (Kap. 2.5.5.1) mit dem fluoreszierenden Reagenz AQC (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat) derivatisiert. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit einem HPLC-System, das u.a. folgende Komponenten enthält: P680 HPLC Dionex Pumpe, ASI 100 Dionex Autosampler, RF 2000 Fluoreszenzdetektor, UCI 50 Dionex Interface und UV Detektor UVD 170 U Dionex. Die Auftrennung wurde mit Hilfe eines Gradienten von Laufmittel A zu Laufmittel B vollzogen, wobei der Fluss  $1 \text{ ml min}^{-1}$  betrug (Tab. 2.5). Anfangs bestand der Gradient vollständig aus Laufmittel A. In den ersten 55 min stieg die Konzentration von Laufmittel B auf 15% an. In den folgenden 10 min wurde der Anteil des Laufmittels B linear auf 60% erhöht und fiel danach wieder auf 0%.

**Tabelle 2.5: Daten zur HPLC-Methode für die Bestimmung der Aminosäure-Gehalte**

Gerät/ Parameter	Spezifizierung
Säule	Nucleodur cc 250/4 100-5 c18 ec
Flussrate	1 ml/min
Laufmittel A	100 mM Natriumacetat, pH 5,2
Laufmittel B	100% Acetonitril
Temperatur	37°C

### 2.5.6 Bestimmung der Stomata-Aperturen

Für die Ausmessung der Stomata-Aperturen wurden zunächst Blätter geerntet und mithilfe einer feinen Pinzette Teile der unteren Epidermis abgelöst. Nach Übertragung der Epidermis auf einen Objektträger wurde die Öffnungsweite der Stomata bei 400facher Vergrößerung an einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) erfasst. Mit der am Mikroskop befindlichen Kamera AxioCam MR (Carl Zeiss, Jena) wurden digitale Bilder aufgenommen. Unter Verwendung des Programms Axiovision (Version 4.3, Carl Zeiss, Jena) konnten danach Länge und Breite der Spaltöffnungen gemessen werden. Der aus den Messwerten gebildete Quotient aus Breite und Länge diente als Maß für die Öffnungsweite der Stomata.

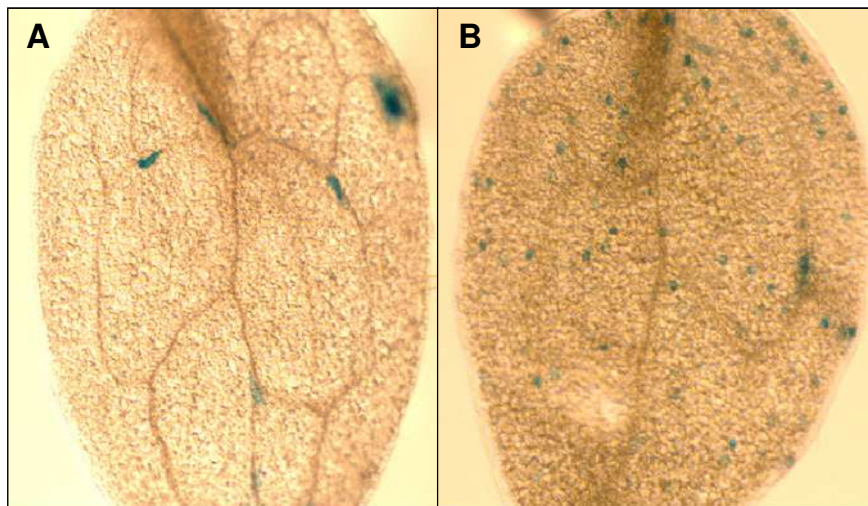
### 3 Ergebnisse

Vakuolen übernehmen in Pflanzen zahlreiche Funktionen wie zum Beispiel die Speicherung von Metaboliten und Nährelementen oder die Regulation des Zellurgors (Taiz und Zeiger, 2006). Transportproteine in der Vakuolenmembran vermitteln hierbei die notwendigen Transportprozesse zwischen Vakuole und Zytosol. In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Funktion verschiedener tonoplastidärer Transportproteine insbesondere unter abiotischem Stress wie Kälte, Trockenheit und Bodenversalzung untersucht. Die Untersuchungen zu dem Malat-Transporter TDT und zu den tonoplastidären Monosaccharid-Transportern bauten auf früheren Arbeiten aus der AG Pflanzenphysiologie (TU Kaiserslautern) auf (Hurth, 2005; Wormit, 2006). Weniger Daten lagen für die putativen Zuckertransporter AtERD6.5 und AtERD6.7 sowie für das Ortholog aus *Beta vulgaris* vor, deren heterologe Expression in Hefe bzw. Oocyten keine funktionelle Charakterisierung ermöglicht hatte (Chiou und Bush, 1996; Hannich, 2009). Bekannt war jedoch bereits die Lokalisation im Tonoplasten (Chiou und Bush, 1996; Jaquinod et al., 2007). In dieser Arbeit wurde mit entsprechenden Knockout-Linien überprüft, welchen Einfluss ERD6.5 und ERD6.7 auf den Zucker-Stoffwechsel haben, um Hinweise auf ihre Transportsubstrate zu erhalten. Zudem erfolgte eine erste funktionelle Charakterisierung des Orthologs aus *Beta vulgaris* mittels heterologer Expression in Arabidopsis. Die hier vorgestellten Untersuchungen zu den TMT-Proteinen und ERD6-Homologen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Sara Andes und Dipl.-Biol. Khader Awwad, deren Diplomarbeiten von mir betreut wurden (Andes, 2008; Awwad, 2008).

#### 3.1 Weiterführende Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Regulation der Stomata-Apertur und bei der Trockentoleranz

Die Vakuolen von Schließzellen akkumulieren tagsüber Malat-Anionen als Produkte des Stärke-Abbaus zusammen mit Kalium-Kationen, was zu einem osmotischen Wassereinstrom in die Schließzellen und somit zum Öffnen der Stomata führt. Im Verlauf der Nacht werden Malat- und Kalium-Ionen aus der Vakuole der Schließzellen exportiert. Malat wird im Anschluss teils in Stärke umgewandelt und teils wie die Kalium-Kationen in den Apoplasten transportiert. Diese Vorgänge tragen zu einem osmotischen Wasserverlust der Schließzellen und somit zu einem Schließen der Stomata bei (Roelfsema und Hedrich, 2005). GUS-Analysen zeigten eine starke Promotoraktivität für den vakuolären Malat-Transporter in den Schließzellen. Anschließende Arbeiten an einer *TDT*-Knockout-Linie indizierten, dass die Aktivität des Transporters sowohl zum Öffnen als auch zum Schließen der Stomata beiträgt. Daher wurde postuliert, dass TDT beim Öffnen der Stomata Malat in die Vakuolen der Schließzellen transportiert und beim Schließen der Stomata den Malat-Transport in umgekehrter Richtung vermittelt (Hurth, 2005). Diese Export-Funktion wurde bereits im

Zusammenhang mit der durch TDT vermittelten zytosolischen pH-Regulation angenommen (Hurth et al., 2005). Weitere GUS-Analysen von Dr. Oliver Trentmann (Abteilung Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) deuteten darauf, dass die schließzellenspezifische *TDT*-Induktion nicht konstitutiv erfolgt, denn bei hoher Luftfeuchtigkeit ist die Promotoraktivität in den Schließzellen deutlich geringer als bei niedriger Luftfeuchtigkeit (Abb. 3.1).

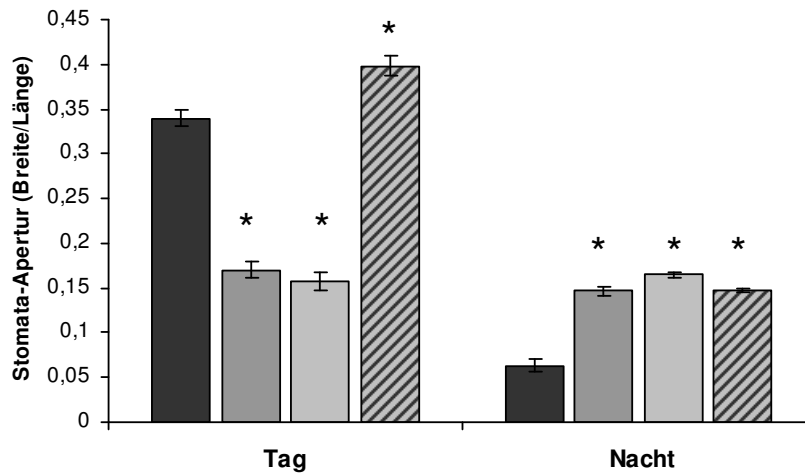


**Abb. 3.1: GUS-Analysen zur Promotoraktivität des *TDT* in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit.** Die Untersuchungen erfolgten nach dreiwöchiger Anzucht bei gesättigter Luftfeuchtigkeit (A) und 16 Stunden nach Abnahme der relativen Luftfeuchtigkeit auf 70% (B).

Um die Funktion des TDT für die Regulation der Stomata-Apertur im diurnalen Rhythmus zu überprüfen, erfolgten Untersuchungen an einer zweiten Knockout-Linie und der Komplementationsmutante  $P_{Myb60}:TDT(tdt1-1)$ , in der TDT unter der Kontrolle des schließzellen-spezifischen Promotors für den Transkriptionsfaktor Myb60 steht (Cominelli et al., 2005). Die  $P_{Myb60}:TDT(tdt1-1)$ -Pflanzen wurden erzeugt, um eine ausschließliche Expression des *TDT*-Gens in den Schließzellen zu erzielen. Der natürliche *TDT*-Promotor wird zwar ebenfalls stark in den Schließzellen induziert, aber bereits unter Standardbedingungen ist die Aktivität des TDT in Mesophyllzellen nachweisbar (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005). Das Plasmid-Konstrukt für die Erzeugung der Hygromycin-resistenten Komplementationsmutanten wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Martinoia (Universität Zürich) kloniert. Hier wurde auch die Schließzellenspezifität des für die Komplementation verwendeten *Myb60*-Promotorbereichs mit einem entsprechenden GUS-Konstrukt überprüft.

Das Längen-Breiten-Verhältnis der Stomata der Wildtyp-Pflanzen lag tagsüber bei 0,34 und nachts bei 0,07, während die beiden Knockout-Linien mit einem Längen-Breiten-Verhältnis von ca. 0,16 eine vom Tagesverlauf nahezu unbeeinflusste Stomata-Apertur aufwiesen. Die Stomata der Komplementationsmutante waren tagsüber und nachts weiter geöffnet als die

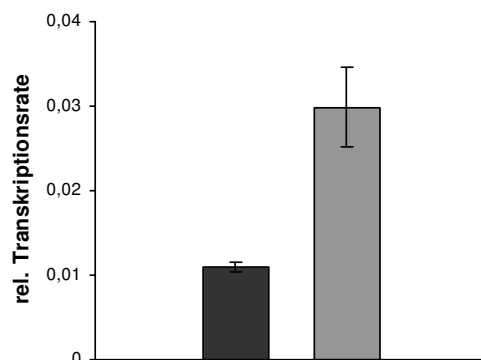
Stomata der Wildtyp-Pflanzen, zeigten aber wie diese einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Stomata-Aperturen.** Die Öffnungsweiten wurden für die Mittagszeit (5 Stunden nach Beginn der Lichtphase) und für die Nacht (7 Stunden nach Ende der Lichtphase) ausgemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je mind. 72 Quotienten (Länge/Breite). Gemäß Student's t-Test sind die Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und Mutanten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (\*).

■ Wildtyp ■ *tdt1-1* ■ *tdt1-2* ■ *P<sub>Myb60</sub>:TDT(tdt1-1)*

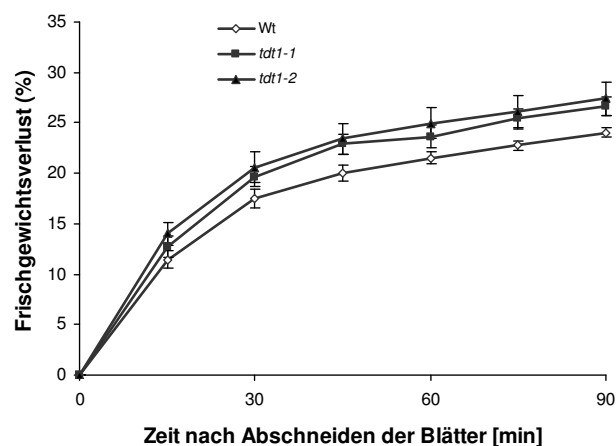
Die veränderte Regulation der Stomata-Aperture in den Knockout-Pflanzen spiegelte sich auch auf Transkriptom-Ebene wider: Genexpressionsanalysen mittels RTQ-PCR ergaben, dass das tonoplastidäre Aquaporin delta-Tip in *tdt1-1* ca. dreifach stärker induziert wird als in Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.3) und bestätigten damit zuvor erfolgte DNA-Array-Analysen (Traub, 2003). Eine verstärkte Induktion von delta-Tip wurde auch für eine *Myb60*-defiziente Mutante ermittelt, die tagsüber wie die *TDT*-Knockout-Mutanten eine reduzierte Stomata-Aperture aufweist (Cominelli et al., 2005).



**Abb. 3.3: RTQ-PCR zur Geninduktion von delta-Tip.** Die Ernte der Blätter erfolgte 5 Stunden nach Beginn der Lichtphase. Es wurden folgende Primer verwendet: dtip.rt-up, dtip.rt-down/ AtEF-1 $\alpha$  for, AtEF-1 $\alpha$  rev (Tab. 2.4). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen.

■ Wildtyp ■ *tdt1-1*

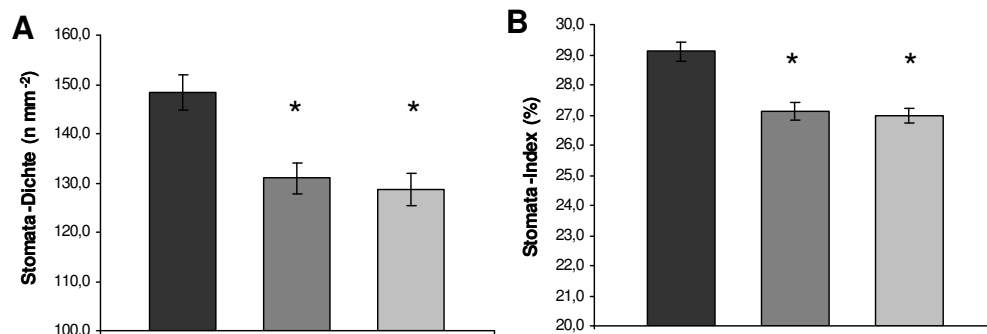
Das Schließen der Stomata ist eine erste Reaktion der Pflanzen auf eintretenden Wassermangel, um einer zu starken Transpiration entgegenzuwirken (Taiz und Zeiger, 2006). Da *tdt1-1* bei Bewindung die Stomata relativ langsam und nicht vollständig schließt, wurden bereits erste Untersuchungen zur Trockentoleranz durchgeführt (Hurth, 2005). Die Beobachtung, dass die Knockout-Mutanten bei Bewindung schneller welken als die Wildtyp-Pflanzen, war auch bei Variation der Untersuchungsbedingungen nicht reproduzierbar. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Frischgewichtsverlust abgeschnittener Blätter, so dass für die Knockout-Mutanten keine Hinweise auf veränderte Transpirationsraten vorliegen. Für die Untersuchungen zum Frischgewichtsverlust wurden die Blätter direkt zu Beginn der Lichtphase (Abb. 3.4) und 5 Stunden nach Beginn der Lichtphase abgeschnitten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.4: Frischgewichtsverlust.** Die Blätter wurden zu Beginn der Lichtphase abgeschnitten. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten. Gemäß Student's t-Test sind die Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und beiden Knockout-Linien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% nicht signifikant.

Die Transpirationsraten einer Pflanze sind nicht nur abhängig von der Öffnungsweite der Stomata, sondern auch von deren Anzahl. Da bei Bewindung für die Knockout-Pflanzen trotz des verlangsamten und unvollständigen Schließens der Stomata kein schnelleres Welken reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob die verschiedenen Genotypen Unterschiede in der Anzahl der Stomata aufweisen. Hierfür wurden die Stomata-Dichte und der Stomata-Index von sechs Wochen alten Blättern der verschiedenen Genotypen ermittelt (Abb. 3.5). Die Stomata-Dichte gibt die Anzahl der Stomata pro Flächeneinheit an, während der Stomata-Index als ein Prozent-Wert das Zahlenverhältnis zwischen Stomata und Epidermiszellen darstellt (Stomata-Index = Anzahl der Stomata / Anzahl der Epidermiszellen  $\times$  100). Die Wildtyp-Pflanzen wiesen eine Stomata-Dichte von ca. 148 pro  $\text{mm}^2$  auf, während die Stomata-Dichte der beiden Knockout-Linien bei 131 bzw.

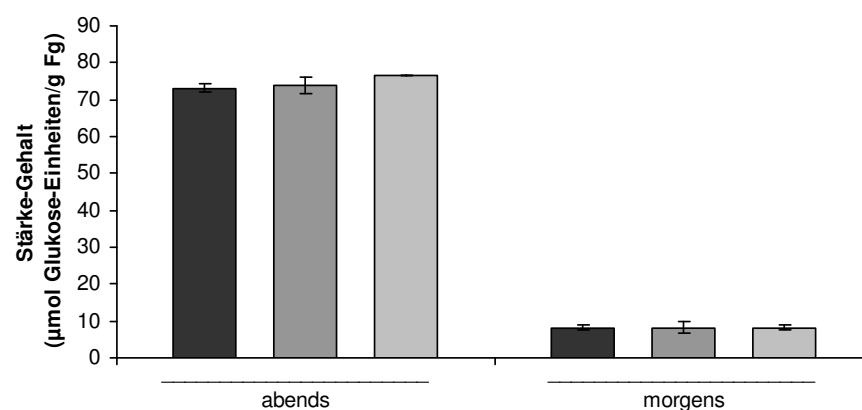
129 pro  $\text{mm}^2$  lag. Ebenso war der Stomata-Index der Knockout-Linien mit ca. 27% etwas geringer als der Stomata-Index der Wildtyp-Pflanzen mit ca. 29%.



**Abb. 3.5: Stomata-Dichte (A) und Stomata-Index (B).** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) von 120 Messungen, für die 6 Pflanzen verwendet wurden. Gemäß Student's t-Test sind die Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und beiden Knockout-Linien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (\*).

■ Wildtyp ■ *tdt1-1* ■ *tdt1-2*

Unter Berücksichtigung der tagsüber verringerten Öffnungsweite der Stomata und der reduzierten Stomata-Dichte stellte sich die Frage, ob im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen für die Knockout-Pflanzen aufgrund einer geringeren  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ein reduziertes Wachstum nachweisbar ist. Nach mehrmaliger Anzucht der verschiedenen Genotypen bei einer Lichtintensität von 100 und 150  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Biomasse. Ebenso waren keine Unterschiede in den Stärke-Gehalten (Abb. 3.6) oder in den Gehalten an den Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

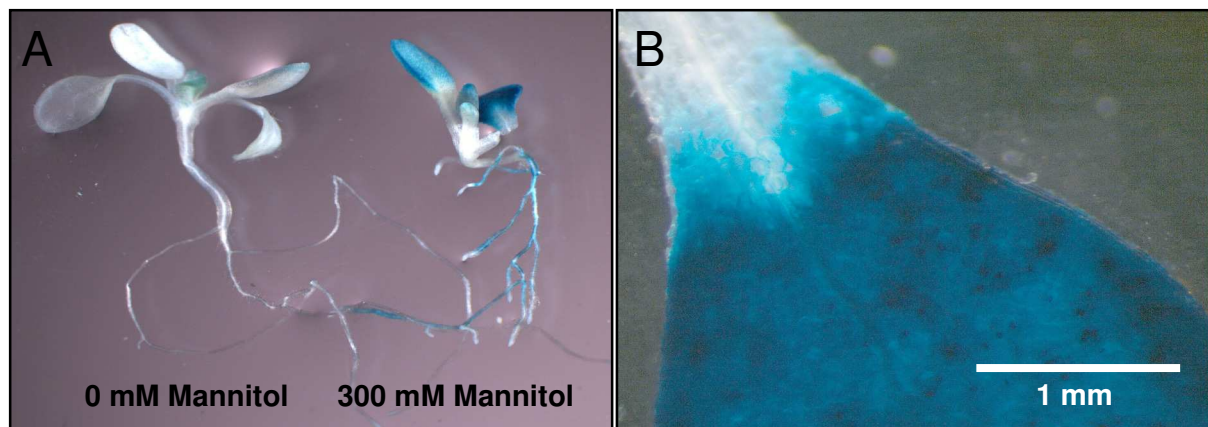


**Abb. 3.6: Stärke-Gehalte.** Die Bestimmungen erfolgten unmittelbar vor („abends“) und nach („morgens“) der Dunkelperiode. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen.

■ Wildtyp ■ *tdt1-1* ■ *tdt1-2*



Malat ist nicht nur in den Schließzellen an der Regulation der Stomata-Apertur beteiligt; darüber hinaus trägt eine Malat-Akkumulation in anderen Zelltypen zur osmotischen Anpassung der Pflanzen an Wassermangel bei (Martinoia und Rentsch, 1994; Patonnier et al., 1999). Northern Blot-Analysen zeigten eine verstärkte Induktion des *TDT*-Gens in den Blättern bei zunehmender Bodentrockenheit und stellten somit einen ersten experimentellen Hinweis auf die Funktion des TDT in der osmotischen Anpassung der Pflanzen an Wassermangel dar (Hurth, 2005). Allerdings konnte hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die Transkript-Akkumulation auf die Schließzellen beschränkt ist. Für eine osmotische Anpassung wäre eine verstärkte Geninduktion im gesamten Blattgewebe und in den Wurzeln zu postulieren. Um dies zu überprüfen, wurden *TDT*-Promotor:GUS-Pflanzen auf MS-Medium (mit 1% Saccharose) ohne bzw. mit Mannitol (300 mM) angezogen. Mannitol wurde als nicht-metabolisierbares Osmotikum (Déjardin et al., 1999) eingesetzt, um eine verringerte Wasserverfügbarkeit herbeizuführen. GUS-Pflanzen, die drei Wochen unter dieser Art von Wassermangel wuchsen, zeigten im Vergleich zu den GUS-Pflanzen mit voller Wasserversorgung eine starke *TDT*-Promotoraktivität in der gesamten Blattspreite und in den Wurzeln (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: GUS-Analysen zur osmotisch bedingten Promotoraktivität des *TDT*.** Die Färbung der *TDT*-Promotor:GUS-Pflanzen erfolgte nach dreiwöchiger Anzucht auf MS-Medium (mit 1% Saccharose) unter Standardbedingungen (0 mM Mannitol) und osmotischem Stress (300 mM Mannitol). Zu sehen sind gestresste und nicht gestresste Pflanzen im direkten Vergleich (A) und eine stereomikroskopisch vergrößerte Aufnahme der Blattspreite einer gestressten Pflanze (B).

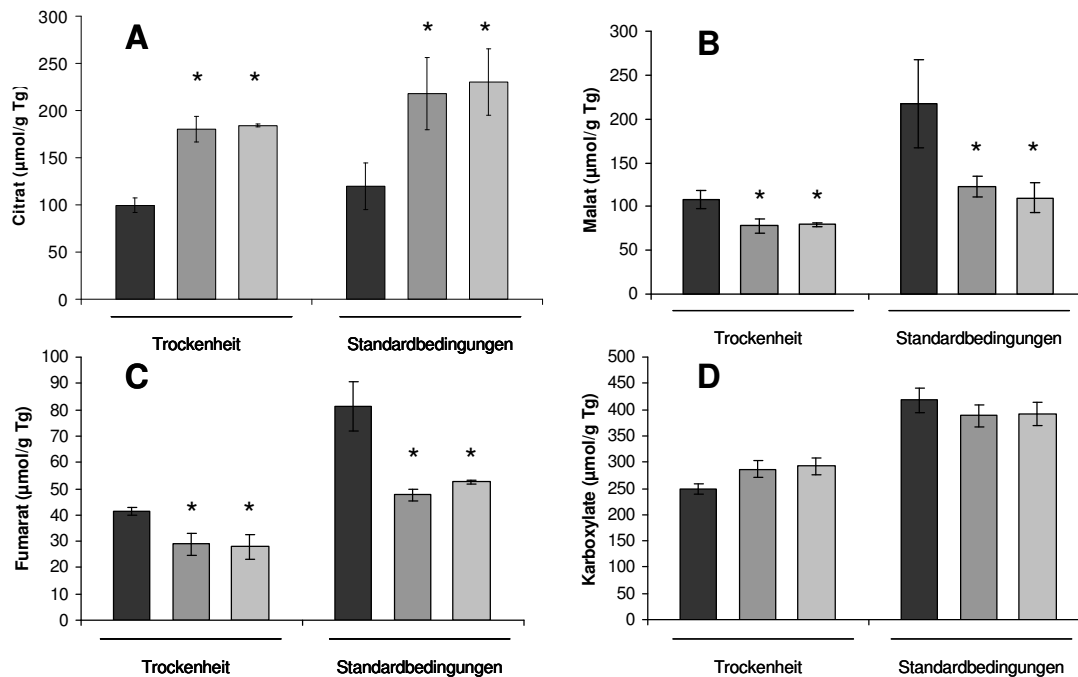
Die starke Promotoraktivität des *TDT* in den Schließzellen unter Standardbedingungen und in weiteren Zelltypen unter osmotischem Stress spiegelt sich auf der Sequenzebene des Promotors wider. Der analysierte Promotorbereich von 1868 bp enthält Kopien verschiedener cis-Elemente, die eine schließzellenspezifische bzw. osmotisch regulierte Geninduktion vermitteln (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1: Cis-Elemente im Promotorbereich (1868 bp) des *TDT*.** Aufgeführt sind diejenigen cis-Elemente, die eine schließzellenspezifische oder osmotisch bedingte Genregulation vermitteln.

Konsensussequenz	Kopienanzahl	Funktion	Referenz
TAAAG	6	Schließzellenspezifische Induktion	Plesch et al., 2001
(A/T)AACCA	2	ABA vermittelte Induktion	Abe et al., 2003
CACATG	4	ABA vermittelte Induktion	Abe et al., 2003
CATGTG	4	Induktion bei Trockenheit	Tran et al., 2004
TAACTG	1	Induktion bei Trockenheit	Urao et al., 1993

Unter Berücksichtigung der Bedeutung von Malat für die osmotische Anpassung und der starken Promotoraktivität des *TDT* bei Wassermangel in Blättern und Wurzeln wurde untersucht, welchen Einfluss *TDT* unter Wassermangel auf die Karbonsäuregehalte in den Blättern hat. Hierzu wurden Wildtyp- und Knockout-Pflanzen zunächst vier Wochen unter Standardbedingungen angezogen. Ein Teil der Pflanzen wurde in den darauf folgenden zwei Wochen nicht mehr gegossen, während der andere Teil weiterhin gegossen wurde. Zum Zeitpunkt der Ernte hatten die Blätter der Wildtyp- und Knockout-Pflanzen, die dem Wassermangel ausgesetzt waren, einen gleichermaßen erniedrigten totalen Wassergehalt (Daten nicht gezeigt) bei nur leichter Welke. Anschließend wurden die Blätter der gestressten und nicht gestressten Pflanzen 5 Stunden nach Beginn der Lichtphase geerntet und auf ihre Karboxylat-Gehalte hin untersucht. Hierbei wurden die Stoffmengen von Malat, Citrat und Fumarat auf das Trockengewicht der Blätter bezogen. Die Untersuchungen zeigten in Übereinstimmung mit früheren Daten (Hurth et al., 2005), dass die Knockout-Pflanzen bereits unter Standardbedingungen geringere Malat- und Fumarat-Gehalte, jedoch höhere Citrat-Gehalte aufweisen. Trockenheit führte in den Wildtyp-Pflanzen zu einer stärkeren Malat- und Fumarat-Akkumulation als in den Knockout-Pflanzen. Aufgrund der stets höheren Citrat-Gehalte in den Knockout-Pflanzen waren die aufsummierten Gehalte der Karboxylate in den verschiedenen Genotypen gleich hoch (Abb. 3.8).

Die verschiedenen Genotypen zeigten auch bei länger anhaltender Trockenheit keine Unterschiede im Welken oder in den Wassergehalten der Blätter. Nach erneutem Gießen zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede in der Turgeszenz zwischen den Genotypen. Die Anzucht auf MS-Medium mit steigenden Mannitol-Konzentrationen führte zu gleichermaßen reduzierten Keimungsraten und vermindertem Wachstum (Daten nicht gezeigt), so dass keine Hinweise auf eine veränderte Trockentoleranz der Knockout-Mutanten vorliegen.

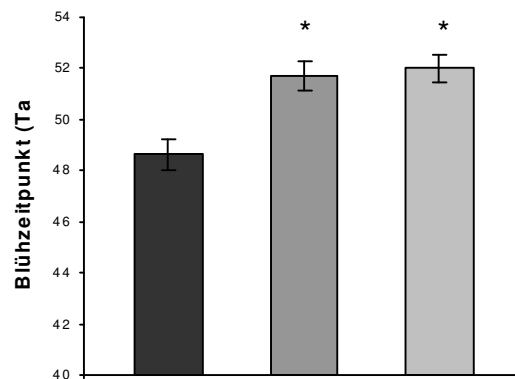


**Abb. 3.8: Karboxylat-Gehalte.** Bestimmt wurden die Gehalte an Citrat (A), Malat (B), Fumarat (C) und Summe der Gehalte (D) in Blättern von 6 Wochen alten Pflanzen unter Standardbedingungen und Trockenheit (bedingt durch fehlende Wasserversorgung nach 4 Wochen Anzucht auf Erde). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei Replikaten. Gemäß Student's t-Test sind die Unterschiede in den Citrat-, Malat- und Fumarat-Gehalten zwischen Wildtyp-Pflanzen und beiden Knockout-Linien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (\*).

■ Wildtyp ■ *tdt1-1* ■ *tdt1-2*

### 3.2 Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Regulation des Blühzeitpunkts

Bei Anzucht unter Kurztagbedingungen zeigte sich, dass die *TDT*-Knockout-Mutanten nach verzögerter Sprossbildung ca. 3 Tage später blühen als Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.9). Unter der Annahme, dass nicht die veränderten Karboxylatgehalte per se einen verzögerten Eintritt in die reproduktive Phase bedingen, wurde untersucht, ob die Knockout-Mutanten veränderte Gehalte an Metaboliten aufweisen, die die Blühzeitpunkte beeinflussen könnten.

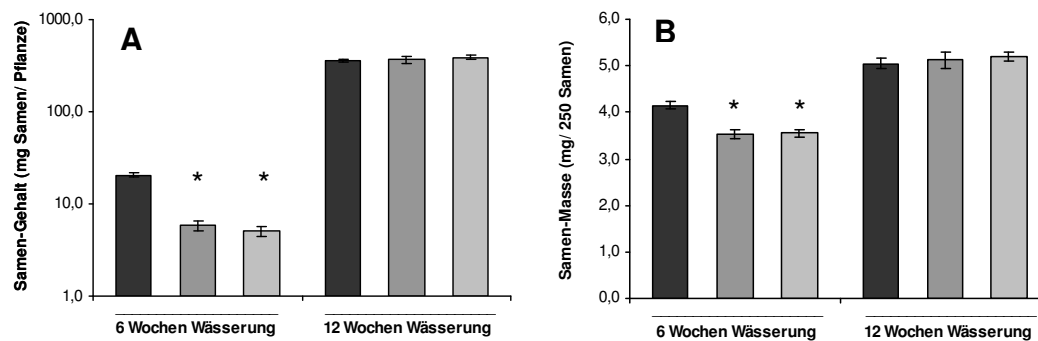


**Abb. 3.9: Blühzeitpunkte.** Es wurde ermittelt, wie viele Tage zwischen den Zeitpunkten der Keimung und der ersten offenen Blüte lagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) für je 20 Pflanzen aus zwei Anzuchten. Gemäß Student's t-Test sind die Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und beiden Knockout-Linien bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (\*).

■ Wildtyp    ■ *tdt1-1*    ■ *tdt1-2*

Veränderte Zuckergehalte, die Einfluss auf den Blühzeitpunkt nehmen könnten (Ohto et al., 2001), waren nach bereits zuvor erfolgten Analysen (Kap. 3.1) auszuschließen. Ebenso ergaben sich keine Unterschiede in den Gehalten proteinogener Aminosäuren (Daten nicht gezeigt), von denen Prolin blühinduzierend wirkt (Mattioli et al., 2008). Auch auf Transkriptionsebene der den Blühzeitpunkt kontrollierenden Transkriptionsfaktoren FLC (Michaels et al., 2004), MSL1, SOC1 (Bouveret et al., 2006) und CO (He et al., 2004) waren nach RTQ-PCR-Analysen keine Unterschiede messbar (Daten nicht gezeigt). Daher kann hier nicht geklärt werden, welche molekulare oder biochemische Ursache dem verzögerten Blühen der Knockout-Mutanten zugrunde liegt.

Wenn die Pflanzen bis zum Erreichen der Seneszenz (12 Wochen Anzucht) durchgehend gegossen und danach für 3 Wochen Trockenheit ausgesetzt wurden, führte der spätere Blühzeitpunkt der Knockout-Pflanzen zu keinen Veränderungen im Samen-Gehalt (Masse der Samen pro Pflanze) und zu keinen Veränderungen in der Samen-Masse (Masse einzelner Samen oder einer abgezählten Samen-Menge). Wurden die Pflanzen jedoch nur 6 Wochen lang gegossen (das heißt bis etwa eine Woche vor der regulären Blühzeit) und anschließend der Trockenheit ausgesetzt, betrug der Samen-Gehalt der Knockout-Pflanzen im Vergleich zu demjenigen der Wildtyp-Pflanzen ca. 25% und die Samen-Masse ca. 85%. Das heißt, nach 6 Wochen Gießen und anschließender Trockenheit bildeten die Knockout-Mutanten weniger und leichtere Samen als die Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.10).



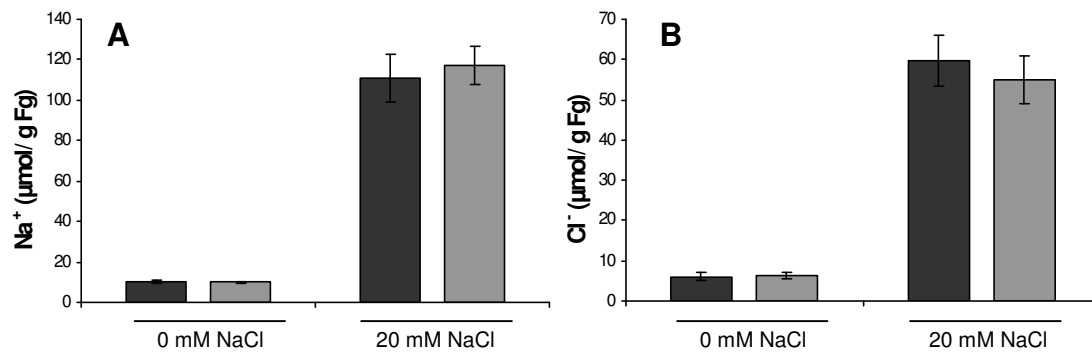
**Abb. 3.10: Samen-Gehalte (A) und Samen-Massen (B).** Die Untersuchungen erfolgten an 6 bzw. 12 Wochen lang gegossenen Pflanzen nach 3 Wochen Trockenheit. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) von vier unabhängigen Untersuchungen. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout-Linien gemäß Student's t-Test (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%) sind angegeben (\*).

■ Wildtyp    ■ *tdt1-1*    ■ *tdt1-2*

Diese Untersuchungen zeigten somit, dass der verzögerte Blühzeitpunkt der Knockout-Pflanzen die Fortpflanzungsfähigkeit einschränkt, wenn gegen Ende der vegetativen Phase die Bodenfeuchtigkeit stetig abnimmt. Wurde der Wassermangel noch früher herbeigeführt, kamen mehr Wildtyp-Pflanzen als Knockout-Mutanten zur Blüte (Daten nicht gezeigt). Ein statistischer Vergleich der Blühzeitpunkte erschien hierbei nicht sinnvoll, da Pflanzen mit verzögerter Blühinduktion zum Teil die Blühphase gar nicht mehr erreichen würden und daher unberücksichtigt blieben. Aus diesem Grund kann hier nicht erörtert werden, ob bei Trockenheit die Unterschiede in den Blühzeitpunkten zwischen den Genotypen größer werden. Hierzu müsste eine geringe Bodenfeuchtigkeit über längere Zeit konstant gehalten werden.

### 3.3 Untersuchungen zur Funktion des TDT in der Salztoleranz

Gemäß früheren Untersuchungen führt zweiwöchiges Gießen mit 50 mM NaCl-Lösung in Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Knockout-Pflanzen zu einer Malat-Akkumulation, wobei die Malat-Gehalte in den Wildtyp-Pflanzen unter Standardbedingungen und bei Salzwasser-Behandlung etwa doppelt so hoch wie in den Mutanten sind (Emmerlich et al., 2003). Da Malat nicht im Zytosol, sondern in den Vakuolen akkumuliert (Gout et al., 1993), könnte das negativ geladene Karboxylat als Gegenion eine erhöhte vakuoläre Aufnahmekapazität von  $\text{Na}^+$ -Ionen bewirken, so dass Wildtyp-Pflanzen womöglich eine höhere Salztoleranz als Knockout-Pflanzen aufweisen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden erneut Pflanzen mit Salzwasser gegossen, das statt 50 mM nur 20 mM NaCl enthielt. Ein Teil der Pflanzen wurde zur Kontrolle mit salzfreiem Wasser behandelt. Die anschließende Analyse zeigte, dass die Wildtyp- und Knockout-Pflanzen bei Salzwasser-Behandlung gleich viel Natrium- und Chlorid-Ionen akkumulierten (Abb. 3.11).



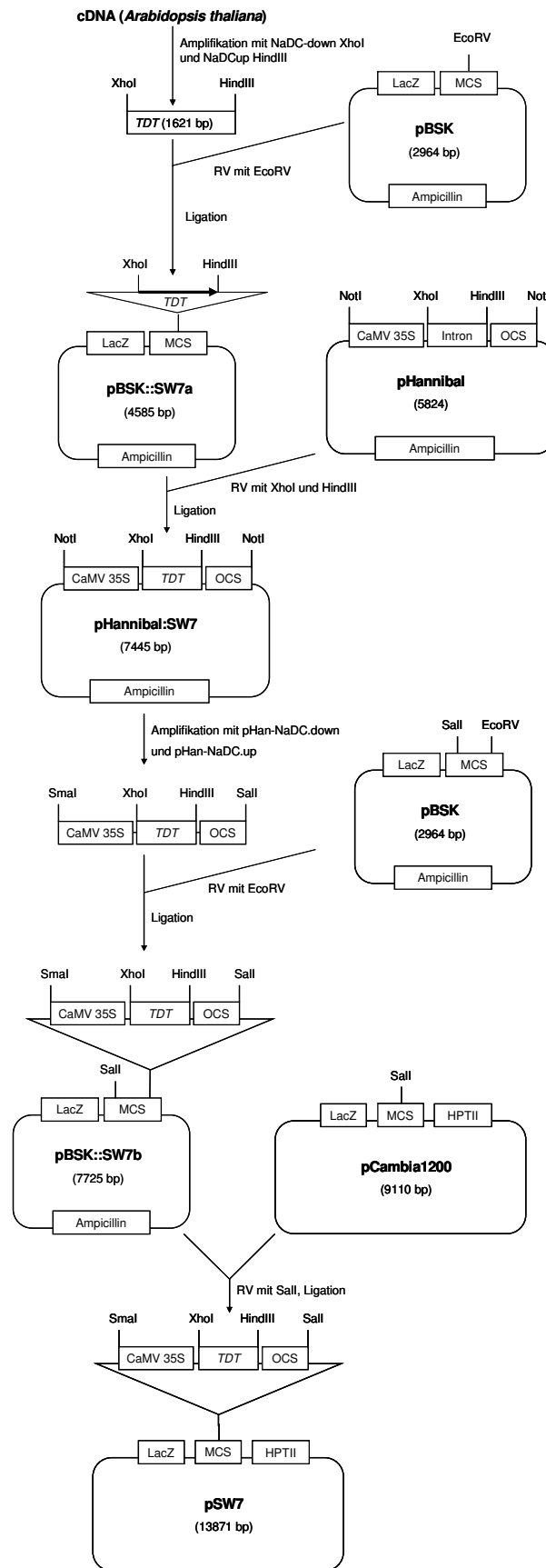
**Abb. 3.11: Gehalte an Na<sup>+</sup>-Kationen (A) und Cl<sup>-</sup>-Anionen (B).** Die untersuchten Blätter wurden unter Standardbedingungen bzw. nach Salzwasser-Behandlung (20 mM NaCl) geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten.

■ Wildtyp    ■ *tdt1-1*

Die Pflanzen-Anzucht in Flüssigmedium mit erhöhten NaCl-Konzentrationen führte zu einer gleich starken Wachstumshemmung; ebenso resultierten Aussaaten auf Medien mit steigenden NaCl-Konzentrationen in gleichermaßen reduzierten Keimungsraten (Daten nicht gezeigt). Ein Beitrag des vakuolären Malat-Transporters zur Salztoleranz war somit nicht nachzuweisen. Eine nachträgliche Bestimmung der Malat-Gehalte zeigte, dass das Gießen mit dem geringer konzentrierten Salzwasser (20 statt 50 mM NaCl) zu keiner Malat-Akkumulation in den Pflanzen führte (Daten nicht gezeigt).

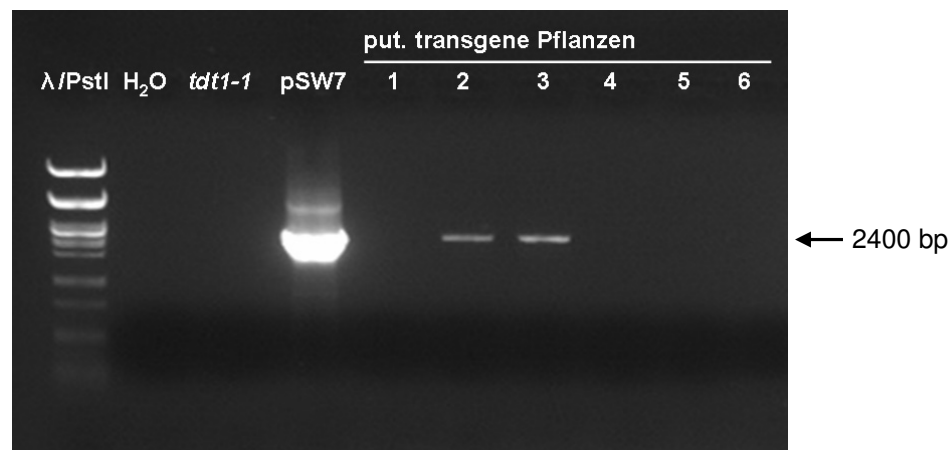
### 3.4 Herstellung *TDT* überexprimierender Pflanzen

Für zukünftige Analysen des vakuolären Malat-Transporters wurden transgene Pflanzen-Linien durch Transformation von *tdt1-1* mit einem Vektor erzeugt, in dem das Gen für den Transporter unter der Kontrolle des hoch aktiven CaMV 35S-Promotors steht. Es wurde folgende Klonierungsstrategie angewandt (Abb. 3.12): Die cDNA-Sequenz des *TDT* wurde mit den Primern NaDC-downXhoI und NaDCupHindIII (Tab. 2.4) amplifiziert, die in die Endbereiche der amplifizierten Sequenz die Schnittstellen für XhoI bzw. Hind III einbauten. Das PCR-Produkt wurde in einen EcoRV geschnittenen pBSK-Vektor ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde die cDNA-Sequenz mit XhoI und Hind III geschnitten und in den Vektor pHannibal ligiert, so dass das Insert von einem CaMV 35S-Promotor und einer OCS-Terminator-Sequenz flankiert wurde. Es folgte eine PCR zur Amplifikation der Überexpressionskassette. Die hierzu verwendeten Primer pHan-NaDC.down und pHan-NaDC.up (Tab. 2.4) bauten eine SmaI- bzw. Sall-Schnittstelle in die Endbereiche des PCR-Produkts ein, welches im nächsten Schritt erneut in einen EcoRV geschnittenen pBSK-Vektor ligiert wurde. Mit Sall wurde die Überexpressionskassette ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pCambia1200 ligiert.



**Abb. 3.12: Klonierungsstrategie zur Überexpression des *TDT*-Gens.** CaMV 35S: 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaikvirus; LacZ:  $\beta$ -Galactosidase-Gen; MCS: *multiple cloning site*; NPTII: Hygromycin-Phosphotransferase II (bewirkt in transgenen Pflanzen Resistenz gegen Hygromycin); RV: Restriktionsverdau

Das Konstrukt bewirkte in transformierten Agrobakterien eine Chloramphenicol-Resistenz und ermöglichte eine Selektion transgener Pflanzen aufgrund einer Hygromycin-Resistenz. 25 putative transgene Pflanzen aus einer Hygromycin-Selektion wurden via PCR mit den Primern 35S\_fwd\_neu und NaDC-seq.up (Tab. 2.4) überprüft, die an den CaMV 35S-Promotor bzw. an das 3'-Ende des *TDT*-Gens binden (Abb. 3.13). Insgesamt wurde hiermit für 16 Pflanzen gezeigt, dass sich der CaMV 35S-Promotor vor dem *TDT*-Gen befindet. Nachfolgende Northern Blot-Analysen werden zeigen, wie stark das Gen in diesen Linien induziert wird.



**Abb. 3.13: Überprüfung putativer *TDT* überexprimierender Pflanzen mittels PCR.** Die eingesetzten Primer 35S\_fwd\_neu und NaDC-seq.up (Tab. 2.4) sind spezifisch für den CaMV 35S-Promotor bzw. für das 3'-Ende des *TDT*-Gens. Die Länge der amplifizierten Sequenz beträgt ca. 2400 bp. DNA aus *tdt1-1* und der Vektor pSW7 dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Zwei (Nr. 2 und 3) der ersten sechs überprüften Pflanzen wurden auf diese Weise als transgen bestätigt. Insgesamt wurden 16 transgene Pflanzen identifiziert.

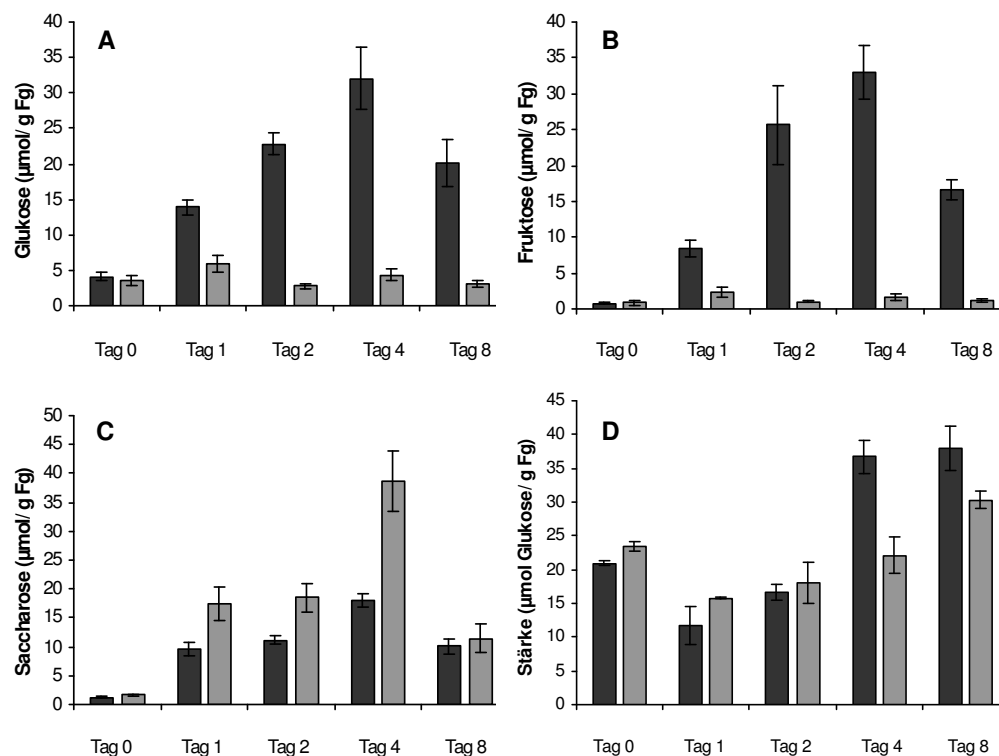
### 3.5 Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der TMT-Familie unter Kältestress

Pflanzen reagieren auf Kälte mit einer Akkumulation verschiedener Zucker, die im Rahmen einer Kälte-Akklimatisierung späteren Frostschäden vorbeugen (Wanner und Junttila, 1999). Aufgrund der starken Kälte-Induktion der tonoplastidären Monosaccharid-Transporter auf Transkript-Level wurde bereits untersucht, wie sich das Fehlen dieser Transportproteine auf die Zuckergehalte bei Kältebehandlung auswirkt. Dabei zeigte sich, dass die *TMT*-Triplemutanten nach 24 Stunden Dauerlicht bei 9°C weniger Glukose, Fruktose und Saccharose akkumulieren als Wildtyp-Pflanzen (Wormit et al., 2006).

Daran anknüpfend wurden die Zucker- und Stärkegehalte der Pflanzen über einen längeren Zeitraum unter Langtag-Bedingungen (16 h Lichtphase) bei einer Temperatur von 4°C untersucht (Abb. 3.14). Die Dauerlicht- bzw. Langtag-Bedingungen wurden Kurztag-Bedingungen für die Kältebehandlung vorgezogen, um mit einer längeren Photosynthese-Phase Bedingungen für höhere Zuckergehalte herbeizuführen. Vor den Analysen wurden die



Pflanzen nach vier bis fünf Wochen Anzucht im Kurztag für drei Tage Langtag-Bedingungen bei 22°C ausgesetzt. Nach der ersten Probennahme (Tag 0) wurde die Temperatur auf 4°C gesenkt. Ein, zwei, vier und acht Tage nach Beginn der Kältebehandlung wurden jeweils fünf Stunden nach Beginn der Lichtphase Blätter für die anschließenden Analysen geerntet. Im Verlauf der Kältebehandlung nahmen die Zucker-Gehalte in den Wildtyp-Pflanzen bis zum Tag 4 deutlich zu; an Tag 8 waren die Zuckergehalte wieder geringer, aber noch höher als zu Beginn der Kältebehandlung. In den *TMT*-Triplemutanten war die Akkumulation von Glukose und Fruktose durchwegs stark gehemmt, während die Saccharose-Gehalte an den Tagen 1, 2 und 4 deutlich über denjenigen der Wildtyp-Pflanzen lagen. In beiden Genotypen kam es zu Beginn der Kälte (Tag 1 und 2) zu einer Abnahme der Stärke-Gehalte, danach (Tag 4 und 8) nahmen sie zu. In der Phase der Stärke-Zunahme wiesen die Wildtyp-Pflanzen höhere Stärke-Gehalte als die *TMT*-Triplemutanten auf.



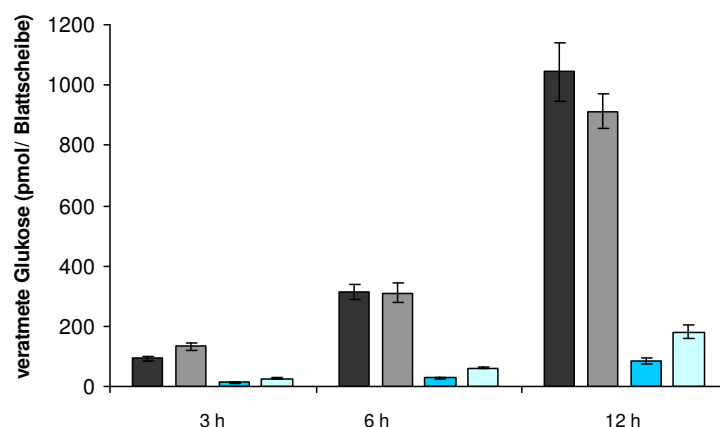
**Abb. 3.14: Gehalte an Glukose (A), Fruktose (B), Saccharose (C) und Stärke (D) in Blättern während einer achttägigen Kältephase.** Die Ernte der Blätter erfolgte jeweils 5 Stunden nach Beginn der Lichtphase. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten.

■ Wildtyp ■ *TMT*-Triplemutante

Die reduzierten Glukose- und Fruktose-Gehalte in den *TMT*-Triplemutanten während der Kältebehandlung könnten darauf zurückgeführt werden, dass diese Monosaccharide aufgrund der reduzierten Speicherung in der Vakuole zumindest transient im Zytosol akkumulieren und in der Folge verstärkt veratmet werden. Analysen zur Kompartimentierung

der Zucker über nichtwässrige Fraktionierung (Knop et al., 2001) zeigten, dass die Wildtyp-Pflanzen nach einer Woche Kältebehandlung Glukose und Fruktose nahezu zu 100% in der Vakuole akkumulieren, wohingegen *TMT*-Doppelmutanten, in denen *TMT1* und *TMT2* ausgeschaltet sind, stattdessen Glukose zu ca. 20% und Fruktose zu ca. 60% im Zytosol enthalten (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Arnd G. Heyer, Abteilung Botanik, Universität Stuttgart). Als Folge einer erhöhten Zucker-Konzentration im Zytosol wäre eine Feedback-Hemmung der Photosynthese zu postulieren (Van Oosten et al., 1997). Die folgenden Untersuchungsergebnisse sprechen sowohl für eine erhöhte Glukose-Veratmung als auch für eine reduzierte Photosynthese-Leistung in den *TMT*-Triplemutanten während der Kältebehandlung.

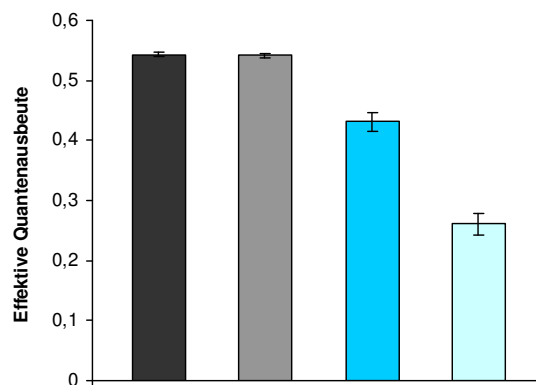
Um die Glukose-Veratmung zu untersuchen, wurde ein Blattscheiben-Test mit Applikation radioaktiv markierter Glukose durchgeführt. Hierfür wurden Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten für eine Woche bei 22°C bzw. 4°C im Langtag gehalten. Daraus entnommene Blattscheiben (Ø 5mm) wurden für 3, 6 und 12 h in einer 100 µM Glukose-Lösung mit [<sup>14</sup>C]-Glukose bei Dunkelheit und gleichbleibender Temperatur (22°C bzw. 4°C) inkubiert. Die Veratmungsraten waren bei 22°C deutlich höher als bei 4°C. Bei der Kältebehandlung waren die Veratmungsraten in den Blattscheiben der *TMT*-Triplemutanten zu den drei Zeitpunkten ca. zweimal so hoch wie die Veratmungsraten in den Blattscheiben der Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.15). Aufgrund der verbliebenen Radioaktivität im Inkubationsmedium konnte ermittelt werden, dass die Blattscheiben der beiden Genotypen gleich viel Glukose aufnahmen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.15: Blattscheiben-Test zur Veratmung exogener Glukose.** Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten wurden für eine Woche bei 22°C bzw. 4°C im Langtag gehalten. Daraus entnommene Blattscheiben (Ø 5mm) wurden für 3, 6 und 12 h in einer 100 µM Glukose-Lösung mit [<sup>14</sup>C]-Glukose bei Dunkelheit und gleichbleibender Temperatur (22°C bzw. 4°C) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je vier Blattscheiben verschiedener Pflanzen.

■ Wildtyp, 22°C   ■ *TMT*-Triplemutante, 22°C   ■ Wildtyp, 4°C   ■ *TMT*-Triplemutante, 4°C

Zur Untersuchung der photosynthetischen Aktivität wurde die Chlorophyllfluoreszenz analysiert, mittels derer Aussagen über den aktuellen Status des Photosystems II gemacht werden können. Ein Indikator hierfür ist die *effektive Quantenausbeute des Photosystems II* (= Zahlen-Verhältnis zwischen absorbierten und emittierten Photonen, im Folgenden vereinfacht „effektive Quantenausbeute“ genannt). Je höher die effektive Quantenausbeute ist, desto aktiver ist der Photosynthese-Apparat. Fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen, die für eine Woche bei 22°C bzw. 4°C unter Langtag-Bedingungen gehalten worden waren, wurden 5-6 h nach Beginn der Lichtphase analysiert. Für die Pflanzen, die bei 22°C gehalten worden waren, waren keine Unterschiede in der effektiven Quantenausbeute zwischen Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten nachweisbar (Abb. 3.16). Nach einer Woche Kältebehandlung waren die effektiven Quantenausbeuten in beiden Genotypen deutlich verringert. Die Werte für die *TMT*-Triplemutanten waren hierbei im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen um ca. 40% reduziert.



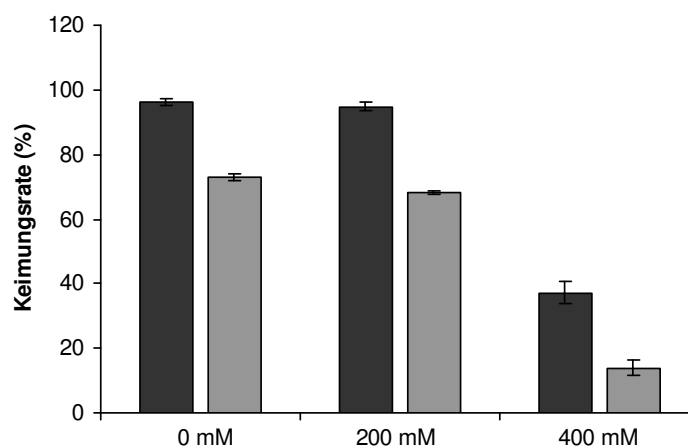
**Abb. 3.16: Effektive Quantenausbeute des Photosystems II.** Die Pflanzen wurden vor den Untersuchungen für eine Woche unter Langtag-Bedingungen bei 22°C bzw. 4°C gehalten. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je vier Blättern.

■ Wildtyp, 22°C   ■ *TMT*-Triplemutante, 22°C   ■ Wildtyp, 4°C   ■ *TMT*-Triplemutante, 4°C

Nach sechswöchiger Anzucht der Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten unter Standardbedingungen (22°C) und Kältestress (4°C) waren keine Wachstumsunterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten, wobei die Kältebehandlung annähernd zu einem Wachstumsstillstand führte (Daten nicht gezeigt). Eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arnd G. Heyer (Abteilung Botanik, Universität Stuttgart) durchgeführte Frosttoleranz-Untersuchung basierend auf der *ion leakage* Methode (Lee et al., 1999) mit Pflanzen, die zuvor eine Woche bei 4°C gehalten worden waren, wiesen auf keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten hin (Daten nicht gezeigt).

### 3.6 Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der TMT-Familie unter Trockenstress

Trockenheit führt wie Kälte zu einer Zucker-Akkumulation, die wahrscheinlich zu einer osmotischen Anpassung der Pflanzen führt (Sánchez et al., 1998). Es wurde bereits ermittelt, dass die *TMT*-Triplemutanten bei zunehmender Trockenheit weniger Glukose und Fruktose akkumulieren als die Wildtyp-Pflanzen. Dennoch wurden keine Unterschiede im Welken oder Wachstum unter Wassermangel beobachtet (Wormit, 2006). Dies bestätigen auch Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit: Es ergaben sich keine Unterschiede im Wachstum, Welkeverhalten oder in den Blühzeitpunkten unter Standardbedingungen und Wassermangel (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich Untersuchungen zur Keimungsrate wiesen auf Unterschiede zwischen den Genotypen: Es wurden jeweils 26 Samen von Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten auf Platten aus festem Agarmedium (MS-Medium) mit steigenden Mannitol-Konzentrationen aufgetragen. Bereits bei Abwesenheit von Mannitol lag die Keimungsrate der Mutanten nach vier Tagen mit ca. 73% deutlich unter der Keimungsrate der Wildtyp-Pflanzen, die ca. 96% betrug. Eine Konzentration von 200 mM Mannitol hatte nur einen geringen Einfluss auf die Keimung. Eine 400 mM Mannitol-Konzentration bewirkte jedoch eine drastische Reduktion der Keimungsraten, wobei die Keimungsrate der Wildtyp-Pflanzen fast dreimal so hoch wie diejenige der Mutanten war (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Keimungsraten bei steigenden Mannitol-Konzentrationen.** Die Keimungsraten wurden vier Tage nach der Aussaat bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je 26 Samen von Wildtyp-Pflanzen und *TMT*-Triplemutanten.

■ Wildtyp ■ *TMT*-Triplemutante

### 3.7 Sequenz-Analysen zu den GLUT-Homologen ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP

Die putativen Zuckertransporter ERD6.5 und ERD6.7 aus *Arabidopsis thaliana* und das Ortholog BvIMP (Beta vulgaris Integral Membrane Protein) aus *Beta vulgaris* wurden bereits in früheren Studien in der Vakuolenmembran lokalisiert (Chiou und Bush, 1996; Jaquinod et al., 2004). Gemäß dem Programm TmPred (Hofmann und Stoffel, 1993) haben die Proteine wahrscheinlich 12 Transmembrandomänen. Sie zeigen zu dem menschlichen Glukose-*Facilitator* GLUT1 (Mueckler et al., 1985) 24% Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene. Eine in etwa gleich hohe Homologie weisen sie zu dem vakuolären Glukose- und Fruktose-Transporter AtVGT1 (Aluri und Büttner, 2007) auf; dagegen fällt die Ähnlichkeit zu dem Transporter AtTMT1 (Wormit et al., 2006), der ebenfalls Glukose und Fruktose in die Vakuole transportiert, 6 bis 7% geringer aus (Tab. 3.2). Aufgrund der Homologie zu den GLUT-Proteinen wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass ERD6.5 und ERD6.7 einen Glukose-Uniport katalysieren (Büttner, 2007). Die heterologe Expression von *BvIMP* in Hefe (Chiou und Bush, 1996) sowie die heterologe Expression der beiden entsprechenden Proteine aus *Arabidopsis* in Hefe und Oocyten ermöglichten nicht den Nachweis einer Transportaktivität von Glukose oder anderen Zuckern (Hannich, 2009).

**Tabelle 3.2: Ähnlichkeit der Zuckertransporter ERD6.5, ERD6.7, BvIMP, TMT1, VGT1 und Glut1.** Die Zahlen geben die prozentuale Übereinstimmung in gleichen und ähnlichen (in Klammern) Aminosäuren an. Die Werte basieren auf Alignments, die mit ClustalW (Thomson et al., 1994) durchgeführt wurden.

	ERD6.7	IMP	GLUT1	TMT1	VGT1
ERD6.5	91 (95)	77 (91)	24 (45)	17 (29)	25 (48)
ERD6.7		79 (91)	24 (45)	17 (29)	24 (48)
BvIMP			24 (43)	18 (29)	24 (47)
GLUT1				14 (28)	21 (39)
TMT1					15 (28)

Die Gegenüberstellung von ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP mit GLUT1 auf Ebene der Proteinsequenzen (Abb. 3.18) zeigt insbesondere Übereinstimmungen in den konservierten Zuckertransporter-Motiven GRR/K, PESPR und PETKG (Doege et al., 2000). Im Vergleich zu den pflanzlichen Homologen ist der N-Terminus von GLUT1 verkürzt, der C-Terminus hingegen verlängert. Die Proteine enthalten in einem homologen Bereich neben dem GRR/K-Motiv einen Serin-Rest, der im Falle von GLUT1 als Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde. Die entsprechende Phosphorylierung von GLUT1 an Ser-95 führt zu einer erhöhten Abundanz in der Plasmamembran (Palmada et al., 2006).

```

*          20          *          40          *          60          *          80
ERD6.5 : MSFR-DDNTEEGRNDLRRPFLHTGSWYRMGSRQSSMLLESQVIRDSSI SVLACVLI VALGPIQFGFTGGYSSPTQAAITKDLGLT : 84
ERD6.7 : MSFR-DDN-EEARNDLRRPFIHTGSWYRMGSRQSSMMGSSQVIRDSSI SVLACVLI VALGPIQFGFTGGYSSPTQAAITKDLGLT : 83
BvIMP : MSSEAGLGGGGDLRRPFLHTGSWYRMGSRQSSLMGSSQVIRESSI SVLACVLI VALGPIQFGFTAGYSSPTQSAITNELGLS : 85
GLUT1 : -----MPESSKKLIGRLMLAVGGAVLGLSLOFGYNIQVINAPQKVI EEFYNQTVVHRYG-E SILPTT LTLWSLS : 68

*          100         *          120         *          140         *          160         *
ERD6.5 : VSEYSVFGSLSNVGMVGAIASGQIAEYVGRKGSMLIAAIPNIIIGWLSISFAKD---TSFLYMGRLLLEGFGVGIISYTVPVYIAE : 166
ERD6.7 : VSEYSVFGSLSNVGMVGAIASGQIAEYI GRKGSMLIAAIPNIIIGWLCISFAKD---TSFLYMGRLLLEGFGVGIISYTVPVYIAE : 165
BvIMP : VAEYSWFGSLSNVGMVGAIASGQISEYI GRKGSMLIAAIPNIIIGWLAISFAKD---SSFLYMGRMLEGFGVGIISYTVPVYISE : 167
GLUT1 : VAIFSVGG-----MIGSFSVGLFVNRFGRRNSMLMMNLLAFVSAVLMGFSKLGKSFEMLILGRFITGCVGCLTIGFVPMYVGE : 146
                                     ▲

*          180         *          200         *          220         *          240         *
ERD6.5 : IAPQIMRGALGSLVQLSVTIGIMLAYLLGLFVWPWRILAVLGLPCTLLIPG-----LFFIPESPRWLAKMGLTDDFETSLQVLR : 245
ERD6.7 : IAPQIMRGGLGSLVQLSVTIGIMLAYLLGLFVWPWRILAVLGLPCTLLIPG-----LFFIPESPRWLAKMGMGTDFETSLQVLR : 244
BvIMP : IAPQILRGALGSLVQLSVTIGIMLSVMLGLFVWPWRILAVLGLPCTLLIPG-----LFFIPESPRWLAKMGMMEFEEVSLQVLR : 246
GLUT1 : VSPTALRGALGTLHQLGIVVGLLIAQVFGLD SIMGNKDLWPLLLSIFIPALLQCIVLPCPE SPRFL LINRNEENRAKSVLKKL : 231

*          260         *          280         *          300         *          320         *          340
ERD6.5 : GFEIDITVEVNEIKRSVASSSKRSVAVRFVLDLKR-RYVPLMVGIGLLALQQLGGINGVLFYSSTIFESAGVTSSNVATFGVGVV : 329
ERD6.7 : GFEIDITVEVNEIKRSVASSSKRNTVRFVLDLKR-RYVPLMVGIGLLVQLQQLGGINGVLFYSSTIFESAGVTSSNAATFGVGAT : 328
BvIMP : GEDTDSLEVNEIKRSVASSSKRTTIRFAELRQR-RYNDPLMIGNLLILQQLSGINGVLFYSSTIFKEAGVTSSNAATFGLGAV : 330
GLUT1 : RGTADVTHDLEQMKESRQMMREKKWTIL EFRSPAYRQPIILAVVQLSQQLSGINAVFYYSSTIFKAGVQQPVYATFGSGIV : 316

*          360         *          380         *          400         *          420
ERD6.5 : QVVATGIAIWLVDKAGRRLLLMISSTGMTISLVIVAVAFYLKEFVSPDSNMNI LMSVSVGVVAMVSCSLGMGPIPWIMSEI : 414
ERD6.7 : QVVATAISTWLVDKAGRRLLTISVGMGISLVIVAAAFYLKEFVSPDSMYSWLSILSVGVVAMVVFSLGMGPIPWIMSEI : 413
BvIMP : QVIATVVTTLWVDRSGRRLLLVSSSGMTLSLVVAMSEFLKEMVSDSTWMSVFSILSVGVVAMVVTFLSLGIGATPWIMSEI : 415
GLUT1 : NTAFVIVSLEFVVERAGRRTLHLI GLAGMAGCAILMTI LALLHQLP-----WMSYLSIVAIFGFVAFFEVGPGPIPWIVALE : 394

*          440         *          460         *          480         *          500         *
ERD6.5 : LPVNIKGLAGSIATFLNWFVSWLVTMTANMLLAWSSGGTFTLYALVCGFTVVVFWSLWVPETKGTLEEIQALFR----- : 488
ERD6.7 : LPVNIKGLAGSIATLANWFFSWLITMTANMLLAWSSGGTFTLYGLVCAFTVVVFWLWVPETKGTLEELQSLFR----- : 487
BvIMP : LPINIKGLAGSIATLANWFVANIVTMTANMLLSWNSGGTFSIYMVCAFTVAFFVVIWVPETKGTLEEIQWSFRR----- : 490
GLUT1 : FSQGFPAALAVAGFSNWTSNFIVGMCFQYVEQLCGPYVETIETVLLVLFETFTYFKVPETKGRTFDEIASGFRQGGASQSDKTP : 479

520
ERD6.5 : ----- : -
ERD6.7 : ----- : -
BvIMP : ----- : -
GLUT1 : EELFHPLGADSQV : 492

```

**Abb. 3.18: Alignment der Proteinsequenzen von ERD6.5, ERD6.7, BvIMP und GLUT1.** Die Zuckertransporter-Motive GRR/K, PESPR und PETKG (Doege et al., 2000) sind unterstrichen; mit dem Dreieck ist Ser-95 von GLUT1 als Phosphorylierungsstelle markiert. Die ERD6-Homologe weisen an der gleichen Stelle im Alignment einen Serin-Rest auf. Das Alignment wurde mit ClustalW (Thomson et al., 1994) erstellt und mit GENEDOC (Nicholas und Nicholas, 1997) nachbearbeitet.

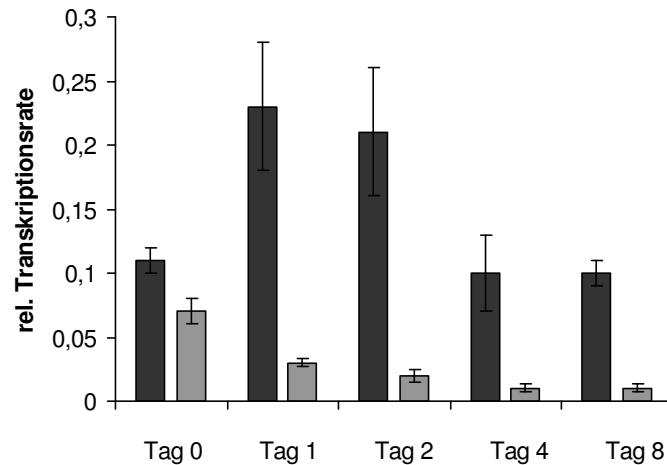
Um die Möglichkeiten einer posttranslationalen Modifikation der pflanzlichen GLUT-Homologe abzuschätzen, wurden Berechnungen mit NetPhos 2.0 (Blom et al., 2004) durchgeführt. Diese weisen auf mehrere putative Phosphorylierungsstellen in den betrachteten Proteinen hin (Tab. 3.3). Die Serin-Reste, die im Alignment die gleiche Position wie Ser-95 von GLUT1 aufweisen (Abb. 3.18) gehören jedoch nicht dazu. Eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation stellen Glykosylierungen dar. Für GLUT1 wurde gezeigt, dass über Asn-45 eine Glykosylierung erfolgt, die eine hohe Substrataffinität bedingt (Asano et al., 1991). Dagegen fehlt in den pflanzlichen Homologen das entsprechende Motiv NXS/T (Abb. 3.18), das für N-Glykosylierungen notwendig erscheint (Marshall, 1974).

**Tabelle 3.3. Putative Phosphorylierungsstellen von ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP.** Die Tabelle zeigt die Positionen der für Phosphorylierungen in Frage kommenden Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste. Die Berechnungen erfolgten mit NetPhos 2.0 (Blom et al., 2004). Es wurden nur Positionen außerhalb der von TmPred (Hofmann und Stoffel, 1993) vorhergesagten Transmembrandomänen berücksichtigt.

	Serin	Threonin	Tyrosin
<b>ERD6.5</b>	33/34/45/46/71/89/264/265/266/269	171	69
<b>ERD6.7</b>	23/32/33/44/45/70/88/264	265/269	68/380
<b>BvIMP</b>	34/35/47/72/253/265/266/267/379	271	-

### 3.8 Untersuchungen zur Regulation der Geninduktion von *ERD6.5* und *ERD6.7*

Um weitere Hinweise auf die Funktion von *ERD6.5* und *ERD6.7* zu erhalten, wurden die Genregulationen unter Bedingungen untersucht, die in den Blättern erhöhte Zuckergehalte bewirken. Hierzu wurde mittels RTQ-PCR überprüft, ob oder wie sich das Transkriptlevel von *ERD6.5* und *ERD6.7* im Verlauf einer Kältebehandlung verändert. Vor den Analysen wurden die Pflanzen für drei Tage unter Langtag-Bedingungen bei 22°C gehalten. Nach der ersten Probennahme (Tag 0) wurde die Temperatur auf 4°C gesenkt. Für die anschließende Untersuchung erfolgte die Ernte der Blätter ein, zwei, vier und acht Tage nach Beginn der Kältebehandlung jeweils fünf Stunden nach Beginn der Lichtphase. Für *ERD6.5* zeigte sich eine transiente Erhöhung der Transkription in den ersten beiden Tagen der Kältebehandlung. Am vierten und achten Tag wurden wieder die Ausgangswerte erreicht. Für *ERD6.7* wurde eine Erniedrigung der Transkriptionsrate bis zu Tag 4 nachgewiesen; für Tag 8 war hier keine weitere Veränderung festzustellen (Abb. 3.19). Diese gegensätzliche Reaktion auf Kälte stimmt mit Untersuchungen überein, die in der Datenbank Genevestigator ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)) veröffentlicht sind. Gemäß Genevestigator sind weitere Unterschiede in den Geninduktionen zu beobachten: So reagiert *ERD6.5* auf Glukose-Applikation mit einer Erhöhung der Transkriptionsrate und auf osmotischen Stress mit einer Absenkung, während *ERD6.7* auf Glukose-Applikation mit einer Absenkung der Transkriptionsrate reagiert und bei osmotischem Stress keine deutliche Veränderung des Transkriptlevels erfolgt.

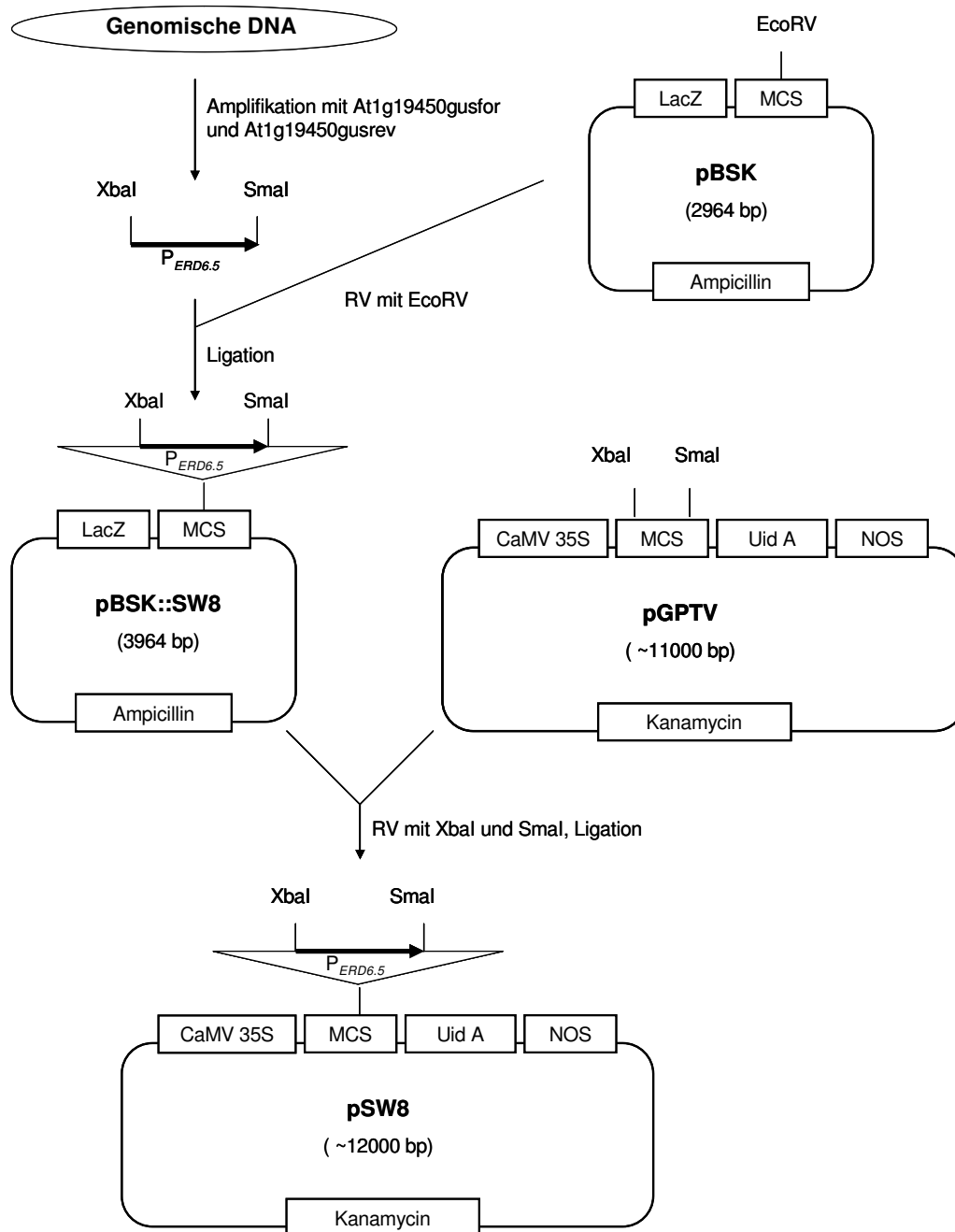


**Abb. 3.19: RTQ-PCR zur kältespezifischen Transkription von ERD6.5 und ERD6.7.** Die Ernte der Blätter erfolgte 5 Stunden nach Beginn der Lichtphase. Es wurden folgende Primer verwendet: 19450-rt.down, 19450-rt.up/ 75220.rt-down2, 75220.rt-up2/ AtEF-1 $\alpha$  for, AtEF-1 $\alpha$  rev (Tab. 2.4). Angegeben sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Messungen.

■ ERD6.5 ■ ERD6.7

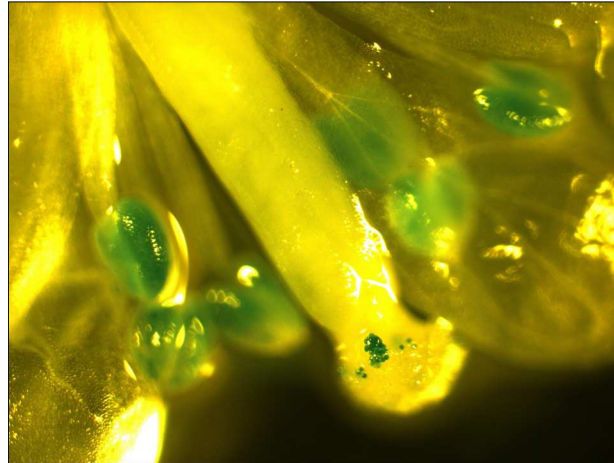
Zur Analyse der gewebespezifischen Expression von *ERD6.5* wurden *ERD6.5*-Promotor:GUS-Pflanzen erzeugt. Für die Klonierung des Promotor:GUS-Konstrukts (Abb. 3.20) wurde ein 1040 bp großer Promotorbereich mit den Primern At1g19450gusfor und At1g19450gusrev (Tab. 2.4) auf genomischer DNA amplifiziert. Die Primer enthielten am 5'- und 3'-Ende eine XbaI- bzw. SmaI-Schnittstelle, welche für die Klonierung in den GUS-Vektor pGPTV (Glucuronidase Plant Transformation Vector) notwendig waren. Das PCR-Produkt wurde in den mit EcoRV geschnittenen Klonierungsvektor pBSK ligiert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit XbaI und SmaI. Der Promotor wurde anschließend in den pGPTV-Vektor vor das GUS-Gen ( $\beta$ -Glucuronidase) ligiert. Das von dem Vektor kodierte Selektionsmarker gen *bar* kodiert das Enzym Phosphoinotricin-Acetyl-Transferase, welches das Herbizid Ammonium-Glufosinat (BASTA) abbaut. Daher konnte BASTA für die Selektion der transgenen GUS-Pflanzen eingesetzt werden.





**Abb. 3.20: Klonierungsstrategie zu den Promotor-GUS-Analysen von *ERD6.5*.** CaMV-35S: 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaikvirus; Nos: Nopaline-Synthase; uidA:  $\beta$ -Glucuronidase-Gen; MCS: *multiple cloning site*; LacZ:  $\beta$ -Galactosidase-Gen;  $P_{ERD6.5}$ : *ERD6.5*-Promotor; RV: Restriktionsverdau

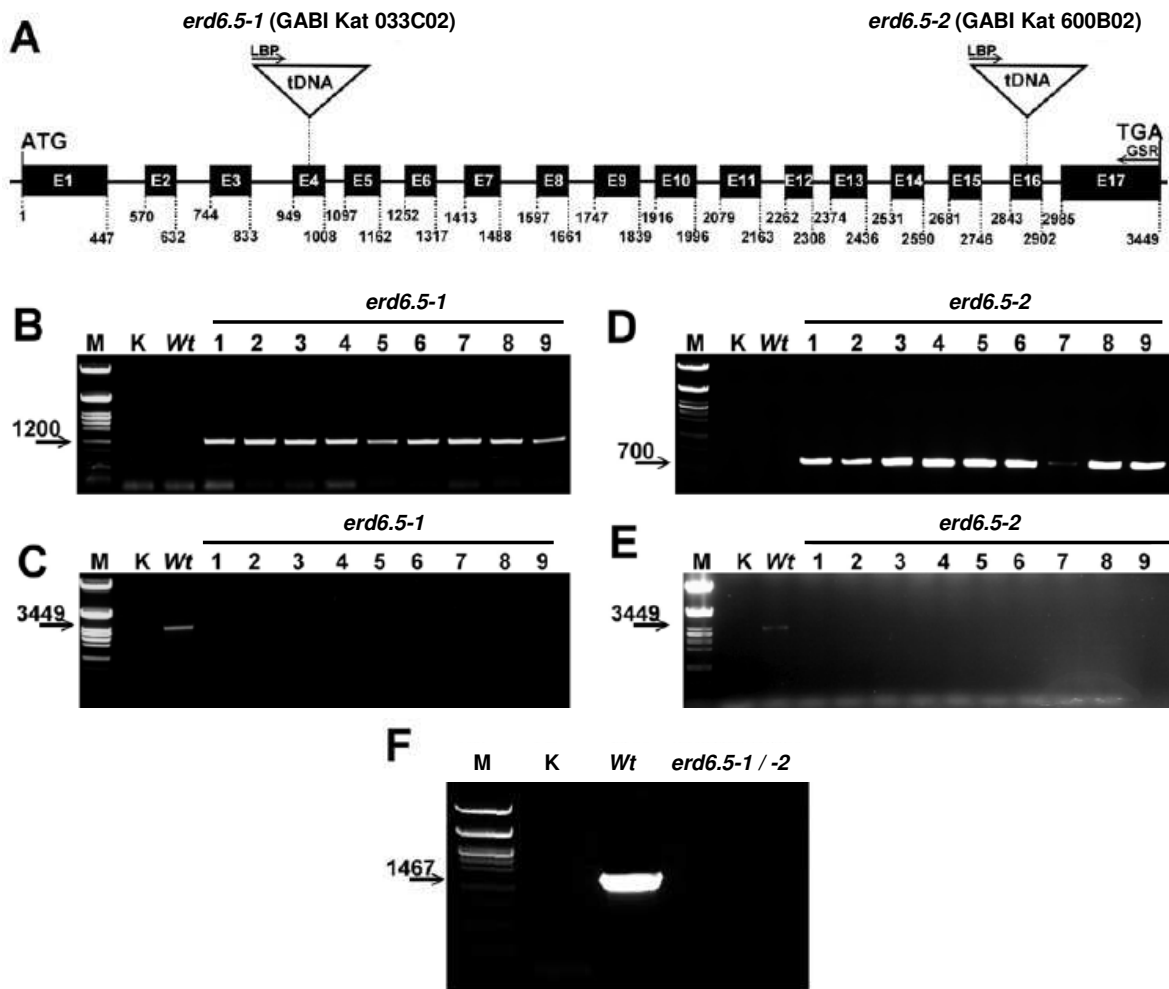
Im Anschluss wurden drei Linien, die aus der BASTA-Selektion hervorgegangen waren, mittels GUS-Färbungen untersucht. Dabei entwickelte sich jeweils nur in den Pollenkörnern eine starke Blaufärbung als ein Indiz für eine hohe Promotoraktivität (Abb. 3.21). Diese Beobachtung stimmt mit Daten aus dem *Arabidopsis eFP Browser* ([www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi)) überein, wo die stärkste Transkriptionsrate von *ERD6.5* und *ERD6.7* im Pollen detektiert wurde.



**Abb. 3.21: GUS-Färbung zur gewebespezifischen Promotoraktivität von *ERD6.5*.** Die stereomikroskopische Aufnahme erfolgte mit einer 30-fachen Vergrößerung und zeigt eine Blüte mit einer starken Blaufärbung in den Pollenkörnern (hier sichtbar in den Pollensäcken und auf dem Stigma).

### **3.9 Molekulare und physiologische Charakterisierung von *ERD6.5* bzw. *ERD6.7* defizienten Pflanzen**

Die Charakterisierung von Knockout-Mutanten sollte weitere Einblicke in die Funktionen von *ERD6.5* und *ERD6.7* ermöglichen. Die homozygote Knockout-Linie für *ERD6.7* war bereits verifiziert worden (Hannich, 2009) und wurde von Dr. Michael Büttner (Heidelberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für *ERD6.5* wurden von GABI-Kat (<http://www.gabi-kat.de>) die zwei Knockout-Linien *erd6.5-1* (GABI Kat 033C02) und *erd6.5-2* (GABI Kat 600B02) mit jeweils einer T-DNA-Insertion in Exon 4 bzw. Exon 16 erworben (Abb. 3.22 A). Nach Selbstung der heterozygoten Knockout-Linien für *ERD6.5* dienten die anschließenden Analysen zunächst der Identifizierung homozygoter Knockout-Mutanten in den Tochtergenerationen (Abb. 3.22). Hierbei konnte mit einer Gen-/T-DNA-spezifischen Primerkombination (At1g19450\_rev\_BamHI/LBP; Tab. 2.4) die T-DNA-Insertion nachgewiesen werden. Homozygote Knockout-Pflanzen von *erd6.5-1* zeigten ein Produkt von 1200 bp; bei Homozygotie von *erd6.5-2* ergab sich ein Produkt von 700 bp (Abb. 3.22 B, D). Beide PCR-Produkte wurden sequenziert, so dass die Lokalisation der T-DNA-Insertionen verifiziert werden konnte. Des Weiteren konnte mit einer genspezifischen Primerkombination (At1g19450for\_NdeI/ At1g19450\_rev\_BamHI; Tab. 2.4) das intakte Gen ausschließlich für die Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 3.22 C,E). Anschließend wurde genotypspezifische cDNA für eine PCR mit genspezifischen Primern (At1g19450for\_NdeI/ At1g19450\_rev\_BamHI; Tab. 2.4) eingesetzt, um die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des *ERD6.5*-Transkripts zu überprüfen. Nur von Wildtyp-Pflanzen abgeleitete cDNA führte zu einem PCR-Produkt mit vorhergesagter Länge, so dass die Homozygotie der Knockout-Linien auch auf Ebene der Transkription gezeigt werden konnte (Abb. 3.22 F).

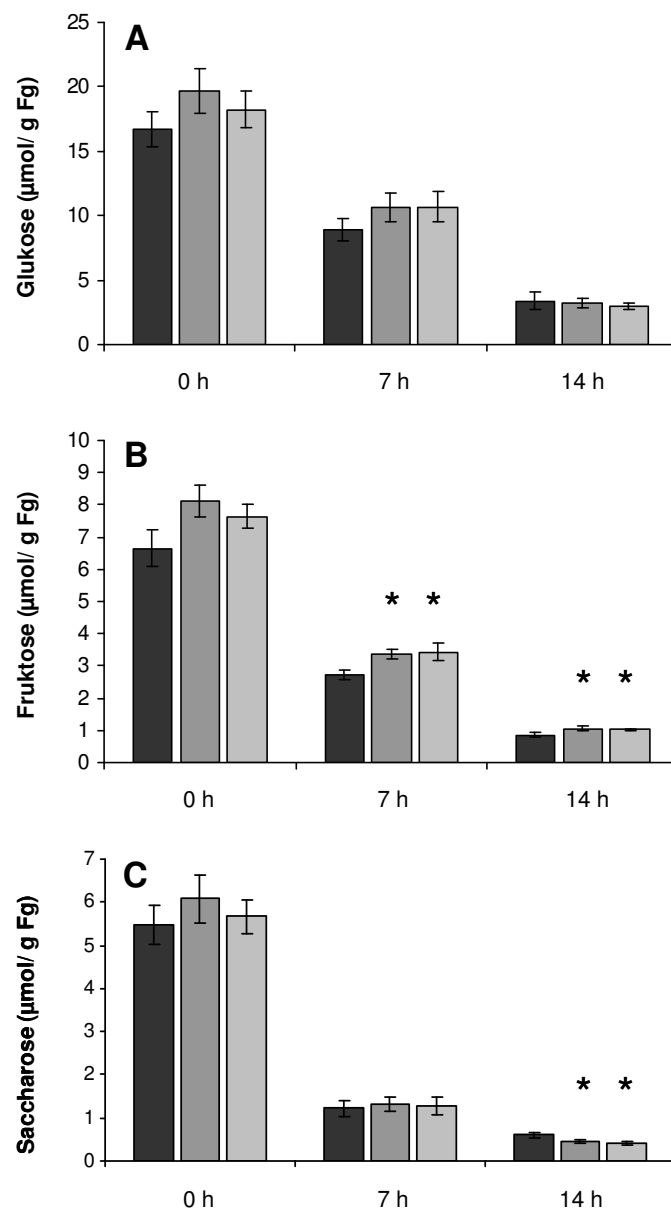


**Abb. 3.22: Molekulare Charakterisierung von *erd6.5-1* und *erd6.5-2*.** Schematische Darstellung von *ERD6.5* mit T-DNA-Insertionen (**A**). PCR-Analyse von genomischer DNA mit einer Gen-/T-DNA-spezifischen Primerkombination (**B**, **D**). PCR-Analyse von genomischer DNA mit genspezifischen Primern (**C**, **E**). PCR auf cDNA mit genspezifischen Primern (**F**). M: λ-PstI-Marker, K: Wasser-Kontrolle.

Die *ERD6.5* defizienten Linien wurden für Zuckergehaltsbestimmungen einer Kältebehandlung mit anschließender Wiedererwärmung ausgesetzt. Hiermit sollten Bedingungen für eine starke vakuoläre Zucker-Akkumulation und anschließende -Mobilisierung herbeigeführt werden. Die Knockout-Mutanten wurden neben Wildtyp-Pflanzen für vier Tage bei 4°C unter Kurztagbedingungen gehalten. Unmittelbar zu Beginn der Dunkelphase wurde eine Wiedererwärmung bei 28°C in der Dunkelheit eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt sowie 7 und 14 Stunden später erfolgte die Ernte der Blätter für die Bestimmung der Zuckergehalte. Die gewählten Zeitpunkte stellen demnach Beginn, Mitte und Ende einer simulierten „warmen Nacht“ nach einer Kältephase dar.

Vor und unmittelbar nach der Kältebehandlung (0 h) waren keine Unterschiede in den Zucker-Gehalten festzustellen. Im Laufe der Wiedererwärmung nahmen die Zuckergehalte stark ab, wobei sich Unterschiede zwischen den Genotypen ergaben: Nach 7 und 14 Stunden Wiedererwärmung wiesen beide Knockout-Linien signifikant mehr Fruktose als die

Wildtyp-Pflanzen auf. Nach 14 Stunden waren zudem die Saccharose-Gehalte in den Knockout-Linien signifikant geringer als die Saccharose-Gehalte in den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.23)

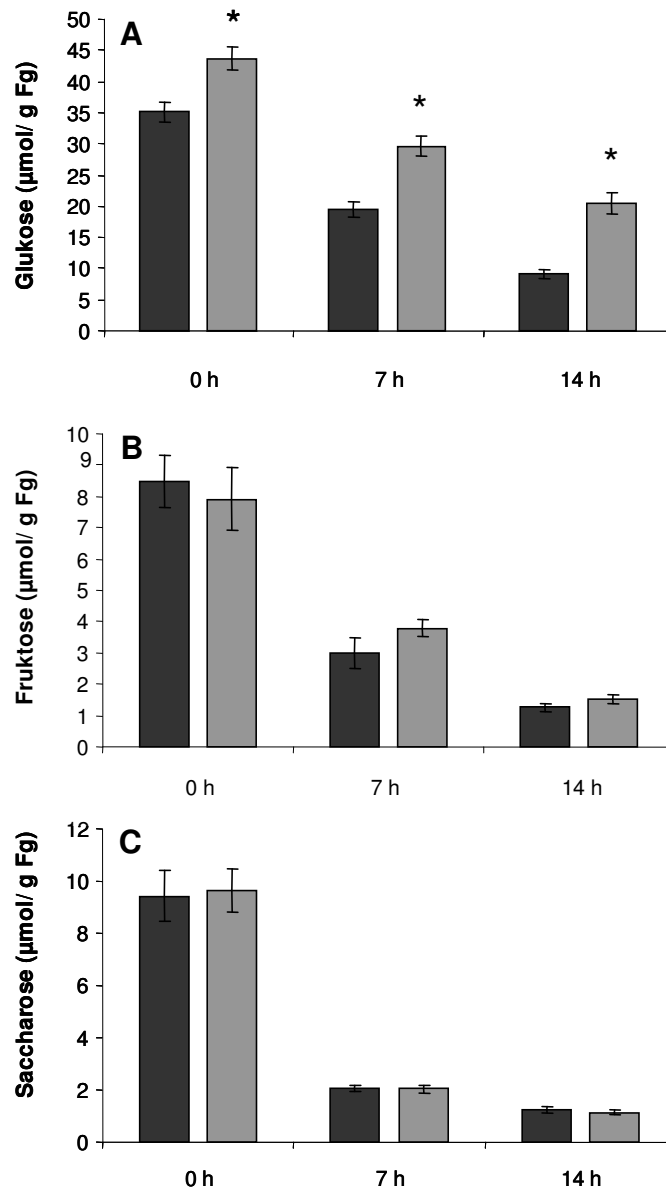


**Abb. 3.23: Gehalte an Glukose (A), Fruktose (B) und Saccharose (C) in Blättern von *erd6.5-1* und *erd6.5-2* nach Kältebehandlung.** Die Ernte der Blätter erfolgte unmittelbar zu Beginn der Dunkelphase nach viertägiger Kältebehandlung (0h) sowie 7 und 14 Stunden später bei Wiedererwärmung (28°C). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout-Linien gemäß Student's t-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind angegeben (\*).

■ Wildtyp    ■ *erd6.5-1*    ■ *erd6.5-2*

Die *ERD6.7*-Knockout-Mutanten unterschieden sich bereits unter Standardbedingungen von Wildtyp-Pflanzen aufgrund höherer Glukose-Gehalte. Unterschiede bezüglich Fruktose, Saccharose und Stärke-Gehalte waren nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt). Wie im Falle

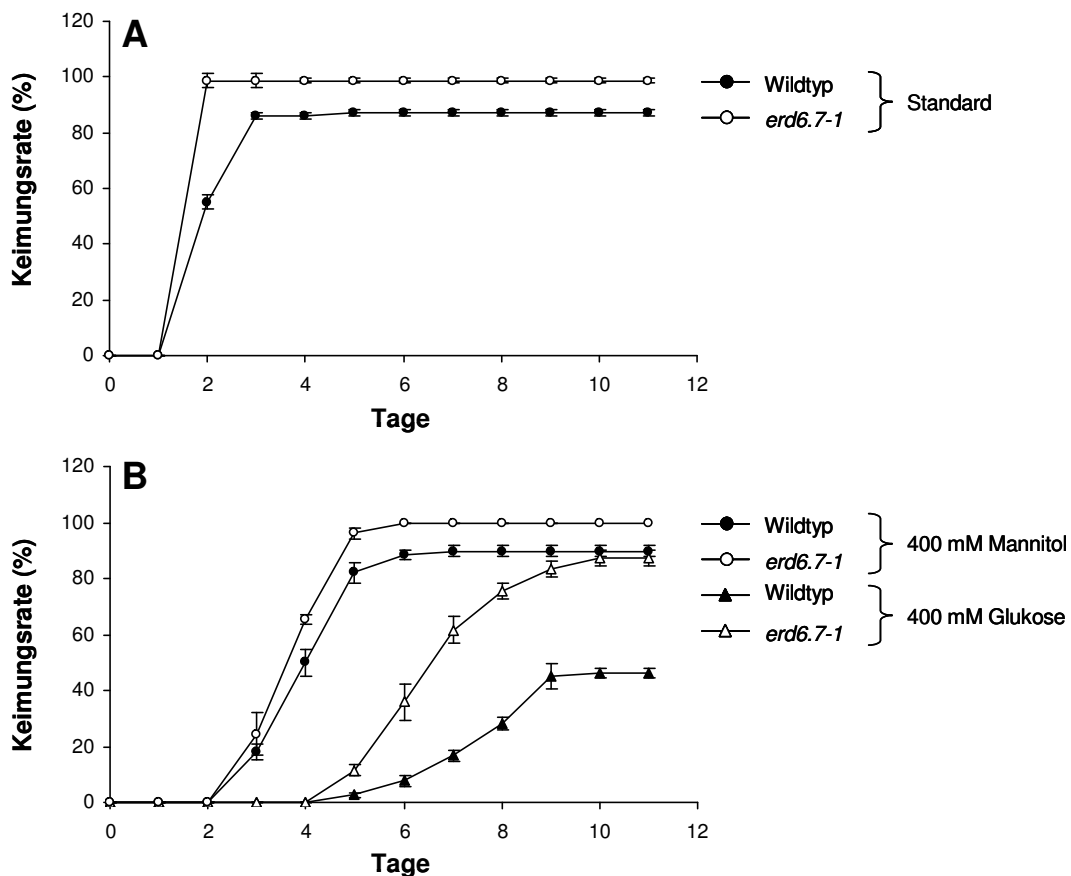
der *ERD6.5*-Knockout-Mutanten wurden Zuckergehalte von Pflanzen in der Wiedererwärmungsphase bestimmt. Dabei fielen die Glukose-Gehalte in den Wildtyp-Pflanzen gegenüber den *ERD6.7*-Knockout-Mutanten zunehmend geringer aus; nach 14 Stunden enthielten die Mutanten mehr als doppelt soviel Glukose wie die Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.24). Bei dieser Untersuchungsreihe waren die Zuckergehalte in den Wildtyp-Pflanzen bereits zu Beginn höher als in der vorhergehenden Untersuchungsreihe zu den *ERD6.5*-Knockout-Pflanzen. Daher wurde hier auf eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die verschiedenen Knockout-Mutanten verzichtet.



**Abb. 3.24: Gehalte an Glukose (A), Fruktose (B) und Saccharose (C) in Blättern von *erd6.7-1* nach Kältebehandlung.** Die Ernte der Blätter erfolgte unmittelbar zu Beginn der Dunkelpfase nach viertägiger Kältebehandlung (0h) sowie 7 und 14 Stunden später bei Wiedererwärmung (28°C). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout-Linien gemäß Student's t-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind angegeben (\*).

■ Wildtyp    ■ *erd6.7-1*

Die Ausschaltung der *TMT*-Gene, die zum vakuolären Glukose-Import beitragen, führte zu verringerten Keimungsraten (Kap. 3.6, Abb. 3.17). Daher wurde überprüft, ob ERD6.7, der womöglich den Transport von Glukose aus der Vakuole in das Zytosol vermittelt, ebenfalls an der Regulation der Keimung beteiligt ist (Abb. 3.25). Die Knockout-Mutanten wiesen unter Standardbedingungen und bei hoher Mannitol-Konzentration im Medium höhere Keimungsraten als die Wildtyp-Pflanzen auf. Die Anwesenheit einer hohen Glukose-Konzentration führte in beiden Genotypen zu einer noch stärkeren Verzögerung der Keimung als die Behandlung mit Mannitol. Unter den Bedingungen der hohen Glukose-Konzentration zeigte sich auch der größte Unterschied in den Keimungsraten: Die Samen von *erd6.7-1* keimten mit geringerer Verzögerung und erreichten nach zehn Tagen eine Keimungsrate von ca. 87%, wohingegen die Keimungsrate der Wildtyp-Pflanzen bei 46% lag.

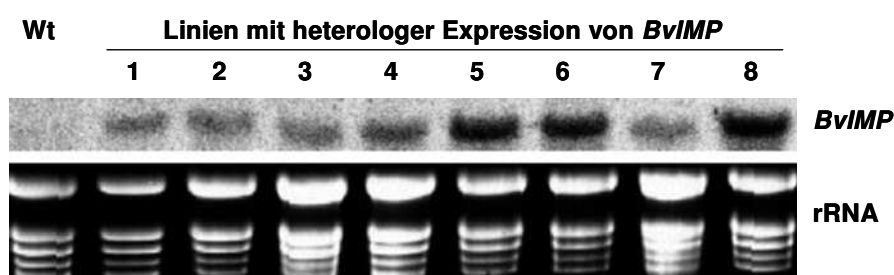


**Abb. 3.25: Keimungsraten unter Standardbedingungen (A) sowie bei 400 mM Mannitol bzw. 400 mM Glukose (B).** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je 26 Samen von Wildtyp-Pflanzen und *erd6.7-1*.

### 3.10 Analysen zur heterologen Expression von *BvIMP* in *Arabidopsis*

Zur Untersuchung des putativen Zuckertransporters *BvIMP*, der starke Homologie zu ERD6.5 und ERD6.7 aufweist (Kap 3.6; Tab 3.1), erfolgte eine heterologe Expression des Proteins in *Arabidopsis*. Hierzu wurde aus einer Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*) RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Template einer PCR mit genspezifischen Primern. Die so gewonnene cDNA-Sequenz wurde über mehrere Schritte kloniert und mit dem CaMV 35S-Promotor in den Expressionsvektor pART27 ligiert (Anhang, Kap. 8.5). Die mit diesem Konstrukt transformierten Agrobakterien konnten mit Kanamycin selektiert werden. Im Rahmen der *floral dip* Methode (Kap. 2.3.18) wurden Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Columbia) transformiert. Für die Selektion transgener Pflanzen wurde BASTA angewendet.

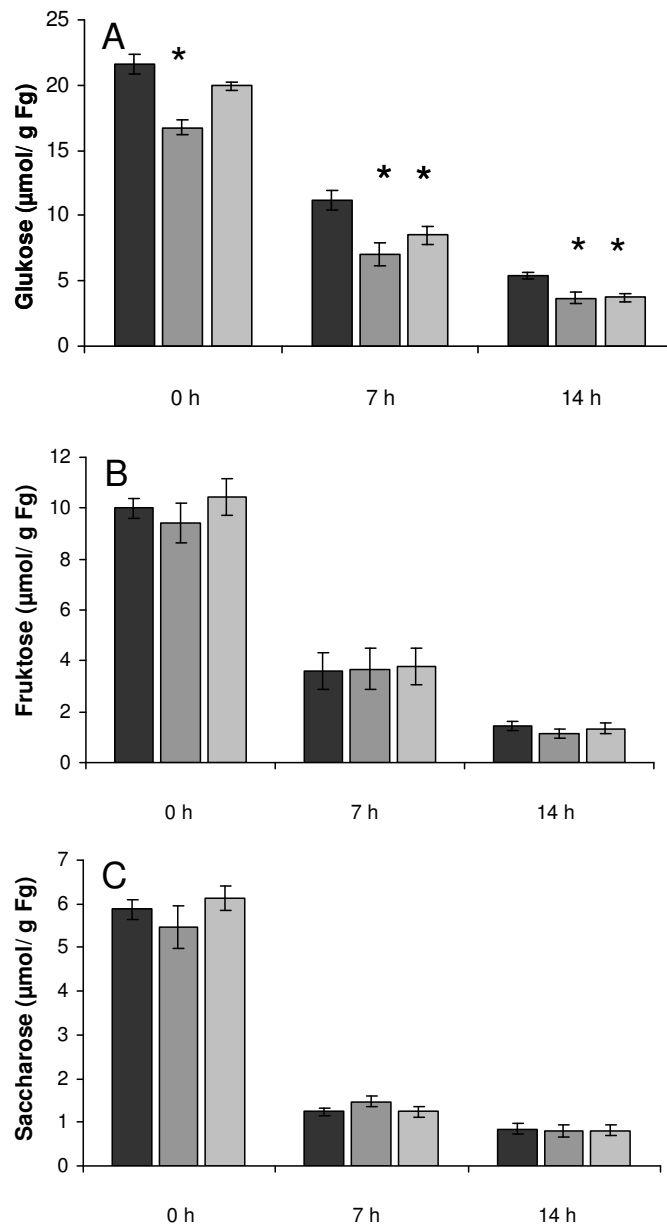
Der Nachweis der heterologen Expression von *BvIMP* auf Transkriptebene erfolgte mittels Northern Blot. Hierzu wurde aus vier Wochen alten Wildtyp-Pflanzen und putativen transgenen Pflanzen, die aus der BASTA-Selektion hervorgegangen waren, RNA isoliert, in einem Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser Membran mit einer radioaktiv markierten für *BvIMP* spezifischen Sonde. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Gel-Beladung wurde die Leiterstruktur der rRNA visualisiert. Alle selektierten Linien erzeugten ein Signal. Die einzelnen Proben zeigten bei der Beladungskontrolle keine vollständig gleichmäßige Auftragung. Dennoch war zu erkennen, dass die Linien 5, 6 und 8 die höchsten Transkriptlevel aufwiesen, während dem Wildtyp kein Signal zugeordnet werden konnte (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26:** Northern-Blot zur Überprüfung der heterologen Expression von *BvIMP* in *Arabidopsis*. rRNA: Ribosomale RNA

Um Hinweise auf ein Transportsubstrat und die physiologische Funktion des putativen Zuckertransporters *BvIMP* zu erhalten, wurden die *BvIMP* exprimierenden Linien 6 und 8 für Zuckergehaltsbestimmungen einer Kältebehandlung mit anschließender Wiedererwärmung ausgesetzt (Abb. 3.27). Die Untersuchung erfolgte wie im Falle der *ERD6.5*- und *ERD6.7*-Knockout-Mutanten. In Bezug auf Fruktose und Saccharose waren zwischen den Genotypen durchwegs keine Unterschiede festzustellen. Zu Beginn der Wiedererwärmung enthielt die *BvIMP*-Linie 6 signifikant weniger Glukose als der Wildtyp (gemäß Student's t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%). Nach 7 Stunden Wiedererwärmung wurden die Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und den *BvIMP*-Linien größer, so dass nun auch *BvIMP*-Linie 8 signifikant weniger Glukose als die Wildtyp-Pflanzen enthielt. Die Unterschiede zwischen den Genotypen blieben nach 14 Stunden nahezu unverändert. Demnach konnten mit der Wiedererwärmung Bedingungen herbeigeführt werden, die in den *BvIMP* exprimierenden Pflanzen zu einer stärkeren Reduktion der Glukose-Gehalte als in den Wildtyp-Pflanzen führten. Unter Standardbedingungen zeigten die verschiedenen Genotypen keine Unterschiede bezüglich der Zuckergehalte. Ebenso wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und *BvIMP* exprimierenden Pflanzen bezüglich Samen-Masse, Wachstum oder Blühzeitpunkte festgestellt (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 3.27: Gehalte an Glukose (A), Fruktose (B) und Saccharose (C) in Blättern von *BvIMP* exprimierenden Linien nach Kältebehandlung.** Die Ernte der Blätter erfolgte unmittelbar zu Beginn der Dunkelphase nach viertägiger Kältebehandlung (0h) sowie 7 und 14 Stunden später bei Wiedererwärmung (28°C). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) dreier unabhängiger Untersuchungen mit je drei biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout-Linien gemäß Student's t-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind angegeben (\*).

■ Wildtyp    ■ *BvIMP*-Linie 6    ■ *BvIMP*-Linie 8

## 4 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten sollten in erster Linie darüber Aufschluss geben, inwiefern die untersuchten tonoplastidären Transportproteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Beta vulgaris* zur abiotischen Stresstoleranz beitragen. Zunächst wurde der Malat-Carrier AtTDT im Hinblick auf die Regulation der Stomata-Apertur und der Transpiration untersucht. Die Funktion des TDT in der osmotischen Anpassung an Trockenheit und der Beitrag zur Salztoleranz stellten weitere Arbeitsschwerpunkte dar. Für die zufällige Beobachtung, dass die entsprechenden Knockout-Linien später als die Wildtyp-Pflanzen blühen, sollte eine Erklärung gefunden werden. Die Zuckertransporter der AtTMT-Familie wurden anhand der *TMT*-Triplemutante untersucht, in der alle drei *TMT*-Gene ausgeschaltet sind. Dabei ging es um die Frage, inwiefern die Zuckertransporter zu einer Anpassung an Kälte und Trockenheit beitragen. Die Bestimmung der Zuckergehalte von Knockout-Pflanzen für AtERD6.5 und AtERD6.7 und von *Arabidopsis*-Linien, die das Ortholog aus *Beta vulgaris* exprimieren, sollten erste Rückschlüsse auf das Transportsubstrat zulassen. Im Falle von ERD6.5 und BvIMP zeigte sich im Verlauf der Arbeiten, dass erst eine Kältebehandlung mit anschließender Wiedererwärmung zu metabolischen Unterschieden zwischen Wildtyp-Pflanzen und Mutanten führt. Abschließend wurde untersucht, inwiefern ERD6.7 die Keimung beeinflusst. Im Folgenden sollen die Untersuchungsergebnisse diskutiert werden.

### 4.1 Beitrag des TDT zur Regulation der Stomata-Apertur und Trockentoleranz

Die Bestimmung der Stomata-Aperturen (Kap. 3.1, Abb. 3.2) in Wildtyp-Pflanzen und beiden Knockout-Linien für TDT bestätigten frühere Analysen (Hurth, 2005), für die nur eine Linie (*tdt1-1*) herangezogen wurde: Während die Stomata der Wildtyp-Pflanzen tagsüber wesentlich weiter geöffnet sind als nachts, haben die Stomata der Knockout-Pflanzen stets die gleiche Öffnungsweite, so dass sie im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen tagsüber weniger weit geöffnet sind und nachts eine größere Öffnungsweite aufweisen. Die Daten stehen im Einklang mit der Hypothese, dass TDT in der Lichtphase Malat in die Schließzellen-Vakuolen transportiert und somit einen osmotischen Wassereinstrom bedingt, der zum Öffnen der Stomata führt. In der Dunkelphase könnte TDT den Transport von Malat aus den Schließzellen-Vakuolen in das Zytosol vermitteln und somit zum osmotischen Wasserausstrom und Schließen der Stomata beitragen. Dass TDT Malat aus der Vakuole in das Zytosol transportieren kann, wurde bereits für die Funktion des TDT in der Regulation des zytosolischen pH-Werts postuliert (Hurth et al., 2005). Für die Export-Funktion spricht auch die starke Induktion der *TDT*-Promotoraktivität nach Reduktion der Luftfeuchtigkeit (Kap. 3.1, Abb. 3.1), denn beim Übergang von hoher zu geringer Luftfeuchtigkeit schließen sich die zuvor weit geöffneten Stomata (Pospišilová, 1996).

Die Stomata der Komplementationsmutante  $P_{Myb60} : TDT(tdt1-1)$  weisen einen ähnlichen Tag-Nacht-Rhythmus wie die Wildtyp-Pflanzen auf, jedoch sind sie zu beiden Zeitpunkten weiter geöffnet (Kap. 3.1, Abb. 3.2). Diese Beobachtung spricht dafür, dass eine ausschließliche Expression des TDT in den Schließzellen das Öffnen und Schließen der Stomata regulieren kann. Ein Grund für die im Vergleich zum Wildtyp stets größeren Stomata-Aperturen könnte sein, dass die Expression des TDT in den Schließzellen der Komplementationsmutante tagsüber womöglich stärker und nachts schwächer als in den Wildtyp-Pflanzen ist, so dass tagsüber mehr Malat in die Schließzellen-Vakuolen importiert und nachts weniger Malat exportiert wird. Um dies zu überprüfen, müssen Schließzellen-Vakuolen aus beiden Genotypen isoliert werden und für beide Zeitpunkte sowohl die Malat-Gehalte als auch die schließzellenspezifische TDT-Expression quantifiziert werden.

Die starke Induktion des tonoplastidären Aquaporins delta-Tip in *tdt1-1* (Kap. 3.1, Abb. 3.3) steht in Übereinstimmung mit den tagsüber geringeren Stomata-Aperturen. *Myb60*-Knockout-Mutanten weisen wie die *TDT*-Knockout-Mutanten tagsüber geringere Stomata-Aperturen auf und zeichnen sich ebenfalls durch eine deutlich erhöhte Transkriptionsrate für delta-Tip aus, dessen physiologische Funktion in der Stomata-Regulation noch unbekannt ist (Cominelli et al., 2005).

Untersuchungen zum Frischgewichtsverlust abgeschnittener Blätter stellen eine etablierte Methode dar, mit der Unterschiede in den Transpirationsraten zwischen Wildtyp-Pflanzen und Mutanten mit veränderter Stomata-Regulation überprüft werden, weil die für den Frischgewichtsverlust verantwortliche Transpiration zum größten Teil über die Stomata erfolgt (Cominelli et al., 2005; Jung et al., 2008). Die hier vorgestellten Untersuchungen zum Frischgewichtsverlust weisen keine Transpirationsunterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Mutanten nach. Zunächst soll hier auf die Untersuchungen eingegangen werden, für die die Blätter zu Beginn der Lichtphase abgeschnitten wurden (Kap. 3.1, Abb. 3.4). Zieht man in Betracht, dass die Stomata der verschiedenen Genotypen zu Beginn der Lichtphase gleich weit geöffnet sind (Hurth, 2005), wären keine unmittelbar eintretenden Unterschiede im Wasserverlust zu erwarten. Nun ist zu beachten, dass mit dem Beginn der Untersuchung zwei Faktoren gegensätzlich auf die Stomata-Aperturen wirken: Zum Einen fördert der Beginn der Lichtphase ein Öffnen der Stomata, das in den Knockout-Mutanten inhibiert ist. Zum Anderen wird mit dem Beginn der Untersuchungen ein Wassermangel in den Blättern herbeigeführt, der in den Wildtyp-Pflanzen zu einem schnelleren Schließen der Stomata führen könnte. Diese Annahme wäre vereinbar mit der Beobachtung, dass bei Bewindung intakter Pflanzen die Stomata der Knockout-Mutanten verzögert schließen (Hurth, 2005). Daher könnten im Verlauf der Untersuchung Belichtung und Wassermangel kompensierende Effekte auf die Regulation der Stomata-Aperturen haben, die in den Knockout-Mutanten zwar verzögert einsetzen, letztlich aber zu gleichen Aperturen wie in den Wildtyp-Pflanzen führen

und somit den gleichen Wasserverlust bedingen könnten. Bei unveränderten Stomata-Aperturen würde die reduzierte Stomata-Dichte in den Knockout-Mutanten (Kap. 3.1, Abb. 3.5) zu einer geringeren Transpirationsrate führen.

Es wurden auch Untersuchungen zum Frischgewichtsverlust durchgeführt, für die die Blätter fünf Stunden nach Beginn der Lichtphase abgeschnitten wurden. Wie zuvor waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen (Kap. 3.1, Daten nicht gezeigt). Unter der Berücksichtigung, dass die Stomata der Knockout-Mutanten tagsüber weniger weit geöffnet sind als die Stomata der Wildtyp-Pflanzen (Kap. 3.1, Abb. 3.2) und ihre Stomata-Dichte reduziert ist (Kap. 3.1, Abb. 3.5), wären für die Knockout-Mutanten geringere Transpirationsraten zu postulieren. Zieht man in Betracht, dass das Abschneiden der Blätter zu Beginn der Untersuchung einen plötzlichen Wassermangel für die Blätter darstellt und womöglich schon in den ersten Minuten ein ABA-vermitteltes Schließen der Stomata auslöst, so sollten die Stomata der Wildtyp-Pflanzen schneller schließen als die Stomata der Knockout-Mutanten. Unter diesem Aspekt wäre zu erwarten, dass die Blätter der Knockout-Mutanten im Verlauf der Untersuchung mehr Wasser verlieren und somit ihr Frischgewichtsverlust stärker ausfällt. Die einerseits reduzierten Stomata-Aperturen und Stomata-Dichten und andererseits das verzögerte Schließen der Stomata der Knockout-Pflanzen bei Wassermangel könnten bei der gewählten Untersuchungsmethode kompensierende Effekte auf die Transpiration haben.

Womöglich können Unterschiede in den Transpirationsraten zwischen den Genotypen detektiert werden, wenn entsprechende Messungen an intakten Pflanzen durchgeführt werden. Hierbei würde ein untersuchungsbedingter Wassermangel eliminiert, so dass eine Interpretation der gewonnenen Daten vereinfacht würde. Unter diesen Bedingungen müssten die Knockout-Mutanten tagsüber aufgrund reduzierter Stomata-Aperturen und aufgrund der reduzierten Stomata-Dichte eine geringere Transpirationsrate als Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Inwiefern Unterschiede in der Transpiration bei Nacht zu detektieren wären, ist schwer abzuschätzen, weil die Knockout-Mutanten zu dieser Zeit weiter geöffnete Stomata bei reduzierter Stomata-Dichte aufweisen. Die Frage, ob hierbei die größere Stomata-Aperture einen stärkeren Effekt auf die Transpiration ausübt als die reduzierte Stomata-Dichte, kann hier nicht beantwortet werden.

Die Beobachtung, dass die *TDT*-Knockout-Mutanten im Wind schneller welken (Hurth, 2005), war nicht reproduzierbar (Kap. 3.1; Daten nicht gezeigt). Womöglich war in den früheren Untersuchungen keine völlig gleichmäßige Bodenfeuchtigkeit gegeben, so dass die Knockout-Mutanten bereits zu Beginn der Untersuchungen über weniger Wasser verfügten als die Wildtyp-Pflanzen. Unterschiedliche Bodenfeuchtigkeiten stellen sich in den verwendeten Behältern schnell ein, auch wenn sie gleich viel Erde enthalten und aus der gleichen Schale Wasser aufnehmen. Geringe Unterschiede in der Neigung der Schale oder

Unterschiede im Faser- und Lehmgehalt sind hierbei wahrscheinlich von Bedeutung. Um die Bodenfeuchtigkeit für die verschiedenen Genotypen möglichst gleich zu halten, wurden für die Wiederholungen der Wind-Behandlung jeweils eine Wildtyp- und eine Knockout-Pflanze im selben Behälter angezogen. Da sich hierbei nun keine Unterschiede mehr im Welke-Zeitpunkt zeigten, ist davon auszugehen, dass die Pflanzen gegenüber Wind und abnehmender Bodenfeuchtigkeit gleichermaßen resistent sind. Unter dem Aspekt des verzögerten Schließens der Stomata bei der Wind-Behandlung (Hurth, 2005) wäre zwar ein schnelleres Welken der Knockout-Pflanzen anzunehmen. Zieht man allerdings die verringerte Stomata-Dichte in Betracht, wäre auch ein langsames Welken vorstellbar. Daher kompensieren sich womöglich verzögertes Schließen der Stomata und die reduzierte Stomata-Dichte in ihren Auswirkungen auf die Trockentoleranz.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die reduzierte Stomata-Dichte und für den reduzierten Stomata-Index in den Knockout-Mutanten (Kap. 3.1, Abb. 3.5) stellen die erhöhten Atmungsraten dar (Hurth et al., 2005). Die erhöhten Atmungsraten wurden damit erklärt, dass in die Vakuolen der Knockout-Mutanten weniger Malat transportiert wird, so dass das im Zytosol verbliebene Karboxylat in erhöhtem Maß der Zellatmung zugeführt wird. Die daran gekoppelte Steigerung der CO<sub>2</sub>-Freisetzung könnte zu einem gesteigerten CO<sub>2</sub>-Gehalt in den Blättern führen. Dies könnte die Ursache für die reduzierte Anzahl der Stomata in den Knockout-Pflanzen sein, denn erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wirken reduzierend auf die Stomata-Dichte und den Stomata-Index von sich entwickelnden Blättern (Lake et al., 2001).

Da die Knockout-Mutanten weniger Stomata aufweisen, die tagsüber zudem nicht so weit geöffnet sind, liegt die Vermutung nahe, dass die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung wegen einer verringerten CO<sub>2</sub>-Aufnahme reduziert ist. Es konnten jedoch keine Unterschiede in Stärke- und Zuckergehalten sowie im Wachstum festgestellt werden (Kap. 3.1, Abb. 3.6; Daten nicht gezeigt), so dass keine Hinweise auf eine reduzierte photosynthetische Aktivität in den Knockout-Mutanten vorliegen. Womöglich sind die dargestellten Effekte auf die CO<sub>2</sub>-Fixierung so gering, dass damit verbundene Unterschiede in der Photosynthese oder im Wachstum nur bei wenigen Prozent liegen und wegen einer hohen Variabilität nur bei Anzucht sehr vieler Pflanzen nachweisbar wären. Auch für einige andere Mutanten mit gestörter Regulation der Stomata-Apertur wurden keine Veränderungen in Wachstum oder Photosynthese beobachtet (Li et al., 2000; Gaedeke et al., 2001; Guo et al., 2003; Hosy et al., 2003; Klein et al., 2004; Cominelli et al., 2005; Liang et al., 2005; Peiter et al., 2005; Merlot et al., 2007; Jung et al., 2008; Lee et al., 2008; Marten et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Demnach muss sich eine durch Mutationen verringerte Stomata-Apertur oder -Dichte nicht zwangsläufig limitierend auf die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung auswirken.

Während die Regulation der vakuolären Malat-Konzentration in den Schließzellen Einfluss auf das Öffnen und Schließen der Stomata nimmt, trägt eine Malat-Akkumulation in anderen

Zelltypen zu einer osmotischen Anpassung an Wassermangel bei (Handa et al., 1983; Peltier und Marigo, 1999). Die starke Induktion des *TDT*-Promotors bei osmotischem Stress in Blättern und Wurzel (Kap. 3.1, Abb. 3.7) sowie die verminderte Akkumulation von Malat in den *TDT*-Knockout-Mutanten sprechen für eine Mitwirkung des TDT an einer osmotischen Anpassung. Da unter keinen der getesteten Trockenstress-Bedingungen die Keimung oder das Wachstum der Knockout-Mutanten beeinträchtigt war, ist anzunehmen, dass die stärkere Akkumulation von Citrat den geringeren Malat- und Fumarat-Gehalt osmotisch kompensiert (Kap. 3.1, Abb. 3.8). Frühere Analysen zeigten bereits, dass sich Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Knockout-Mutanten unter Standard-Bedingungen weder im vakuolären noch im zytosolischen Gesamtgehalt von Malat, Fumarat und Citrat unterscheiden (Hurth et al., 2005). Somit liegen in Bezug auf die osmotische Anpassung keine Hinweise vor, dass sich Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Knockout-Mutanten in der Akkumulation osmotisch aktiver Teilchen unterscheiden. Die Citrat-Akkumulation in den Knockout-Mutanten könnte darauf basieren, dass nicht vakuolär gespeichertes Malat aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert und dort im Citrat-Zyklus vermehrt in Citrat umgewandelt wird. Über ein bisher noch nicht identifiziertes Transportprotein könnte Citrat in die Vakuole importiert und gespeichert werden. Der geringere Fumarat-Gehalt in den Knockout-Mutanten könnte darauf zurückgeführt werden, dass für die Fumarat-Synthese in den Mitochondrien womöglich weniger Citrat zur Verfügung steht. Zudem ist es möglich, dass TDT neben Malat auch Fumarat als strukturell ähnliches Karboxylat in die Vakuole transportiert. Demnach könnte Fumarat ebenso wie Malat in den Knockout-Mutanten verstärkt veratmet werden.

#### **4.2 Funktion des TDT in der Regulation des Blühzeitpunkts**

Die Beobachtung, dass die *TDT*-Knockout-Mutanten unter Kurztag-Bedingungen verzögert Blüten sprosse bilden und entsprechend ca. 3 Tage später blühen als die Wildtyp-Pflanzen, weist auf eine Funktion des TDT in der Regulation des Blühzeitpunkts (Kap. 3.2; Abb. 3.9) hin. Die verzögerte reproduktive Phase konnte auf keine veränderten Zucker- oder Prolingehalte zurückgeführt werden (Kap. 3.2, Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der entsprechenden Gehalte erschien aufschlussreich, da Zucker und Prolin reprimierend bzw. induzierend auf die Blühphase wirken (Ohto et al., 2001; Mattioli et al., 2008). Zudem war keine veränderte Geninduktion von Transkriptionsfaktoren, die den Blühzeitpunkt kontrollieren, in den *TDT*-Knockout-Mutanten nachweisbar (Kap. 3.2, Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache für den verzögerten Blühzeitpunkt könnte in der Funktion des TDT in der Regulation des zytosolischen pH-Werts liegen: Für die Kurztag-Pflanzen *Pharbitis nil* (Friedman et al., 1990) und *Chenopodium rubrum* (Albrechtová et al., 1997) wurde nachgewiesen, dass eine zytosolische Alkalisierung im Spross-Apex die Blühinduktion vermittelt. Womöglich trifft dies auch auf die Blühinduktion in der Langtag-Pflanze

Arabidopsis unter Kurztag-Bedingungen zu. TDT könnte hierbei eine zytosolische Alkalisierung gewährleisten, indem Malat über den Carrier aus der Vakuole in das Zytosol transportiert und dort unter Freisetzung von Hydroxylionen abgebaut wird (Hurth et al., 2005). Für die Blühinduktion unter Langtag-Bedingungen kann diese Funktion des TDT nicht postuliert werden, da Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Knockout-Mutanten im Langtag gleichzeitig blühen (Kap. 3.2, Daten nicht gezeigt). Die verzögerte Blühinduktion hatte negative Auswirkungen auf Samen-Gehalt und -Masse, wenn die Pflanzen vor Beginn der reproduktiven Phase zunehmendem Wassermangel ausgesetzt wurden (Kap. 3.2, Abb. 3.10). Daher scheint in dieser Situation die Zeitspanne noch ausreichender Wasserversorgung für die Blüten- und Samenentwicklung der *TDT*-Knockout-Mutanten limitierender zu sein als im Falle der Wildtyp-Pflanzen.

### 4.3 Beitrag des TDT zur Salztoleranz

Die Hypothese, dass TDT unter Salzstress-Bedingungen eine Malat-Akkumulation in der Vakuole vermittelt und mit einer erhöhten vakuolären Aufnahme-Kapazität für  $\text{Na}^+$ -Ionen zur Salztoleranz beiträgt, konnte nicht bestätigt werden: Der erhöhte Bodensalz-Gehalt führte unter den getesteten Bedingungen in Wildtyp-Pflanzen und *TDT*-Knockout-Pflanzen fast zu einer Verzehnfachung des  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Gehalts, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Genotypen (Kap. 3.3, Abb. 3.11). Zudem korrelierten die erhöhten  $\text{Na}^+$ -Gehalte in den gestressten Pflanzen nicht mit einer Malat-Akkumulation (Kap. 3.3, Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den metabolischen Untersuchungen waren keine genotypisch bedingten Unterschiede bezüglich Keimung und Wachstum unter Salzstress nachweisbar. Dass Salzstress nicht notwendig zu einer Akkumulation von Malat führt, wurde bereits für andere Pflanzenarten gezeigt (McNulty, 1985; Speer und Kaiser, 1991). Die Beobachtung, dass mehrwöchiges Gießen mit einer 50 mM NaCl-Lösung die Malat-Gehalte in Arabidopsis erhöhte (Emmerlich et al., 2003), könnte womöglich auf rein osmotische Effekte zurückgeführt werden und würde unter diesem Aspekt mit Daten aus dieser Arbeit zur Malat-Akkumulation bei Trockenheit übereinstimmen (Kap. 3.1, Abb. 3.8).

### 4.4 Beitrag der TMT-Familie zur Kältetoleranz

Pflanzen akkumulieren in Kältephasen Zucker wie Glukose und Saccharose, die unter Frostbedingungen Membranen und Proteine in dehydrierten Zellen stabilisieren können (Patton et al., 2005). Die im Rahmen dieser Kälte-Akklimatisierung stattfindende Zuckerakkumulation ist lichtabhängig (Wanner und Junttila, 1999) und basiert auf Saccharose-Synthese sowie Stärke-Abbau (Yano et al., 2005). In diesem Zusammenhang tragen die bei Kälte induzierten tonoplastidären Monosaccharid-Transporter zur vakuolären Akkumulation von Glukose und Fruktose bei (Wormit et al., 2006). Die Beobachtung, dass in

den *TMT*-Triplemutanten während der Kältebehandlung die Akkumulation von Glukose und Fruktose beeinträchtigt ist (Kap. 3.5, Abb. 3.14), bestätigt bereits zuvor erfolgte Analysen (Wormit et al., 2006). Ein Grund für die geringeren Zuckergehalte könnte eine erhöhte Veratmungsrate der nicht vakuolär gespeicherten Monosaccharide sein. Hinweise darauf liefern die Untersuchungen zur Veratmung applizierter Glukose, nach denen unter Kältebedingungen Blattscheiben der *TMT*-Triplemutanten mehr Glukose veratmen als Blattscheiben von Wildtyp-Pflanzen (Kap. 3.5, Abb. 3.15). In den Mutanten werden unter Kältebedingungen weniger Monosaccharide in die Vakuole transportiert, so dass sie wahrscheinlich im Zytosol akkumulieren. Diese Annahme stimmt überein mit Kompartimentierungsanalysen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arnd G. Heyer (Kap. 3.5; Daten nicht gezeigt). In der Folge können die im Zytosol akkumulierten Zucker vermehrt als Substrate der Glykolyse dienen und teilweise auch über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg abgebaut werden. Eine weitere mögliche Ursache für die reduzierten Monosaccharid-Gehalte ist die in den Mutanten nach der Kältebehandlung stärker reduzierte effektive Quantenausbeute (Kap. 3.5, Abb. 3.16) als ein Hinweis auf eine stärker reduzierte Photosyntheserate. Diese könnte zugleich die im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen geringeren Stärke-Gehalte in den Mutanten nach vier und acht Tagen Kälte (Kap. 3.5, Abb. 3.14) bedingen.

Die Unterschiede in der effektiven Quantenausbeute könnten mit DNA-Array-Analysen begründet werden, die von Dr. Alexandra Wormit (AG Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) durchgeführt wurden. Die Array-Daten indizieren für die *TMT*-Triplemutanten nach einwöchiger Kältebehandlung eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen schwächere Induktion dreier Proteinkomponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette. Dabei handelt es sich um PsbT (Ohnishi und Takahashi, 2008) CP47 (Gamble und Mullet, 1989) und PsbG (Nixon et al., 1989). Eine Reprimierung der entsprechenden Gene könnte auf eine Erhöhung der zytosolischen Monosaccharid- und Saccharose-Konzentrationen zurückgeführt werden. Diese Annahme ist konsistent mit der Beobachtung, dass applizierte Glukose die *CAB1*-Transkription in Blattscheiben von *TMT1*-Knockout-Mutanten stärker reprimiert als in Blattscheiben von Wildtyp-Pflanzen (Wormit et al., 2006). Die durch Zucker vermittelte Reprimierung von Genen, die für Proteine des Photosynthese-Apparats kodieren, wird als photosynthetische Feedback-Hemmung interpretiert (Van Oosten et al., 1997).

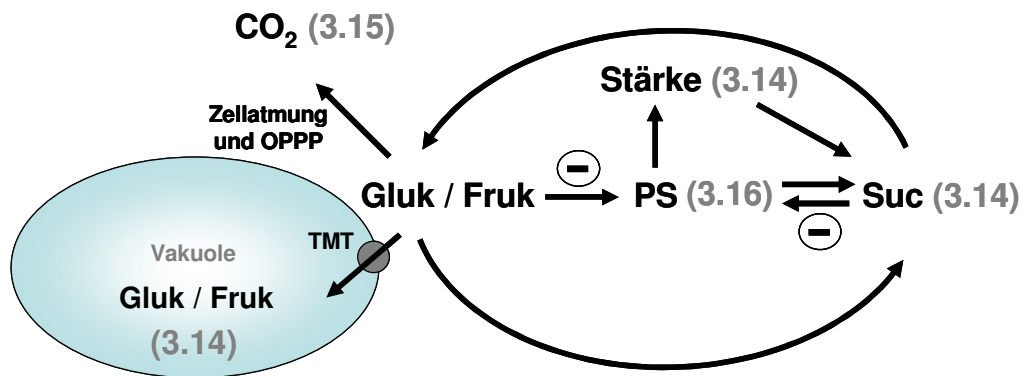
Die im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen erhöhten Saccharose-Gehalte der *TMT*-Triplemutanten in den ersten vier Tagen der Kältebehandlung könnten folgende Ursache haben: Wie bereits erwähnt, akkumulieren wahrscheinlich im Zytosol der *TMT*-Triplemutanten die nicht in die Vakuole transportierten Monosaccharide. Glukose könnte demnach vermehrt über die Glukose-Kinase in Glukose-6-phosphat und über die Phosphoglukomutase in Glukose1-phosphat umgewandelt werden. Glukose1-phosphat stellt



seinerseits ein Intermediat der Saccharose-Synthese dar (Taiz und Zeiger, 2006). Somit könnten die Monosaccharide in den *TMT*-Triplemutanten nicht nur in erhöhtem Maß Substrate für die Zellatmung darstellen, sondern auch kreislaufartig in Saccharose umgewandelt werden, aus deren Abbau sie wiederum hervorgehen.

Nach acht Tagen Kälte sind die Saccharose-Gehalte angeeglichen, während die Monosaccharid- und Stärke-Gehalte in den *TMT*-Triplemutanten weiterhin unter denjenigen der Wildtyp-Pflanzen liegen (Kap. 3.5, Abb. 3.14). Womöglich bewirkt hierbei eine stärker reduzierte Photosynthese-Rate, wie sie von den effektiven Quantenausbeuten (Kap. 3.5, Abb. 3.16) indiziert wird, dass die Saccharose-Synthese verringert wird und in der Folge die Saccharose-Gehalte sinken. Die zu Beginn der Kälte einsetzende Abnahme der Stärke (Kap. 3.5, Abb. 3.14) ist wahrscheinlich auf einen kälteinduzierten Stärke-Abbau als eine Quelle der Zuckerakkumulation zurückzuführen (Yano et al., 2005). Der trotz reduzierter effektiver Quantenausbeute (Kap. 3.5, Abb. 3.16) später zu beobachtende Anstieg der Stärke-Gehalte (Kap. 3.5; Abb. 3.14) könnte darauf basieren, dass der Stärke-Abbau wahrscheinlich nur in den ersten Tagen erfolgt (Strand et al., 2003), während eine photosynthetisch bedingte Zunahme anhält.

Die hier betrachtete Kältebehandlung erfolgte unter Langtag-Bedingungen bei 4°C. Im Gegensatz hierzu hatte eine 24-stündige Kältebehandlung bei 9°C unter Dauerlicht zu geringeren Saccharose-Gehalten in den *TMT*-Triplemutanten als in den Wildtyp-Pflanzen geführt (Wormit et al., 2006). Daher setzt unter Dauerlicht womöglich bereits nach einem Tag Kälte in den Mutanten eine Feedback-Hemmung der Photosynthese und somit eine Inhibierung der Saccharose-Synthese ein, die sich stärker auf die Saccharose-Gehalte auswirken könnte als eine Resynthese der Saccharose aus den Monosacchariden. Abbildung 4.1 fasst zusammen, wie bei Kältestress die Aktivität der *TMT*-Proteine mit Photosynthese, Saccharose-Synthese und Zellatmung wechselwirken kann. Die zytosolischen Hexosen regulieren in diesem Modell den Saccharose-Gehalt, indem sie sowohl Substrate als auch Inhibitoren der Saccharose-Synthese darstellen.



**Abb. 4.1: Modell zur Einbindung der TMT-Proteine in den Primärstoffwechsel bei Kältestress.** In den Klammern stehen die Nummern der Abbildungen aus dem Ergebnisteil, die die Auswirkung der *TMT*-Inaktivierung auf verschiedene Bereiche des Kohlenstoff-Metabolismus darstellen. Fruk: Fruktose; Gluk: Glukose; OPPP: oxidativer Pentose-Phosphat-Weg; PS: Photosynthese; Suc: Saccharose; TMT: Tonoplastidäre Monosaccharid-Transporter 1-3

Phänotypische Auswirkungen der *TMT*-Inaktivierung konnten für die Kältetoleranz nicht nachgewiesen werden. Trotz der inhibierten Photosynthese wurden keine Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und *TMT*-Triplemutante nachgewiesen (Kap. 3.5; Daten nicht gezeigt). Unter den getesteten Bedingungen bei 4°C war das Wachstum gleichermaßen stark inhibiert. Womöglich könnten sich bei milderem Kältestress sichtbare Wachstumsunterschiede ergeben.

Gemäß Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arnd G. Heyer (Abteilung Botanik, Universität Stuttgart) zur Frosttoleranz von Pflanzen, die zuvor eine Woche bei 4°C unter Langtag-Bedingungen gehalten worden waren, waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und Mutanten festzustellen (Kap. 3.5, Daten nicht gezeigt). Dementsprechend kann eine über die *TMT*-Proteine vermittelte vakuoläre Akkumulation nicht dazu beitragen, die Plasmamembranen zu stabilisieren. Inwiefern die Stabilität anderer Zell-Membranen oder Proteine von der Aktivität der *TMT*-Proteine abhängt, ist mittels der angewandten *ion leakage* Methode (Lee et al., 1999) nicht erfassbar. Um die Frosttoleranz der *TMT*-Triplemutanten weiter zu überprüfen, könnten die Wachstumsraten von Wildtyp-Pflanzen und Mutanten nach Frostperioden bestimmt werden. Falls Frost in den Mutanten zu größeren Schäden innerhalb der Zellen führt als in den Wildtyp-Pflanzen, würde dies womöglich zu sichtbaren Wachstumsunterschieden führen. Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Frosttoleranz wäre die Bestimmung der Überlebensraten nach unterschiedlich starken Frosttemperaturen (Charron et al., 2008). Für die physiologische Funktion der *TMT*-Proteine bei Kälte indizieren die vorliegenden Daten daher, dass ihre Aktivität vor allem einer zu starken Reduktion der Photosynthese-Rate während der Kälte-Akklimatisierung entgegenwirkt; Hinweise auf einen Beitrag zur Frosttoleranz liegen nicht vor.

#### 4.5 Beitrag der TMT-Familie zur Trockentoleranz

Es wurde bereits gezeigt, dass die TMT-Proteine nicht nur bei Kälte, sondern auch bei Trockenheit eine Akkumulation von Glukose und Fruktose vermitteln. Untersuchungen an adulten Pflanzen lieferten keine Hinweise, dass sich die Inaktivierung der *TMT*-Gene auf die Toleranz von Trockenstress auswirkt (Wormit, 2006). Da die *TMT*-Mutanten trotz stark beeinträchtigter Zuckerakkumulation so schnell welken wie die Wildtyp-Pflanzen und nach Wasserzugabe ebenso wieder turgeszent werden (Wormit, 2006; Kap. 3.6, Daten nicht gezeigt), trägt die über die TMT-Proteine vermittelte Zuckerakkumulation bei Wassermangel zu keiner nachweisbaren osmotischen Anpassung bei. Womöglich kompensieren andere osmotisch wirksame Verbindungen oder Ionen den reduzierten Zuckergehalt, so wie ein erhöhter Citrat-Gehalt den reduzierten Malat- und Fumarat-Gehalt in den *TDT*-Knockout-Mutanten auszugleichen scheint (Kap. 3.1, Abb. 3.8).

Eine geringere Toleranz von Wassermangel ließ sich für die *TMT*-Triplemutanten allerdings im Keimungsstadium nachweisen. Die Keimungsrate der Mutanten lag bereits unter Standardbedingungen unter derjenigen der Wildtyp-Pflanzen, wobei der durch Mannitol induzierte Trockenstress noch größere Unterschiede bewirkte (Kap. 3.6, Abb. 3.17). Die Ursache für die beeinträchtigte Keimung könnte eine erhöhte zytosolische Glukose-Konzentration in den *TMT*-Triplemutanten sein: Erhöhte zytosolische Glukose-Gehalte und Trockenheit führen in gequollenen Samen zu einem reduzierten Abbau von ABA, das die Dormanz von Samen aufrechterhält, wodurch die Keimung verzögert wird (Millar et al., 2006; Zhu et al., 2009). Demnach könnte die Aktivität der TMT-Proteine in Samen zu einer Reduktion zytosolischer Glukose-Konzentrationen und somit zu einem stärkeren Abbau von ABA beitragen, so dass die Keimung beschleunigt wird.

#### 4.6 Funktion der GLUT-Homologe ERD6.5, ERD6.7 und BvIMP

Für die zueinander stark homologen Transportproteine ERD6.5 und ERD6.7 aus *Arabidopsis* sowie für das Ortholog BvIMP aus *Beta vulgaris* (Kap. 3.7; Tab. 3.2 und Abb. 3.18) wurde bereits in früheren Untersuchungen eine Lokalisation im Tonoplasten nachgewiesen (Jaquinod et al., 2004; Chiou und Bush, 1996). Aufgrund ihrer Homologie zu den GLUT-Proteinen wurde postuliert, dass sie eine erleichterte Diffusion von Glukose vermitteln (Büttner, 2007). Eine experimentelle Überprüfung dieser Annahme mittels heterologer Expressionen gelang bisher nicht (Chiou und Bush, 1996; Hannich, 2009). Daher sollten die metabolischen Analysen von Mutanten, in denen die Gene für ERD6.5 bzw. ERD6.7 ausgeschaltet sind, und von *Arabidopsis*-Linien, in denen *BvIMP* heterolog exprimiert wird, zur Klärung der Frage nach den Transportsubstraten beitragen. Die Untersuchungsbedingungen wurden so gewählt, dass ein gesteigerter Zuckertransport über die Vakuolenmembran stattfindet. Mit der Kältebehandlung wurde eine vakuoläre Akkumulation

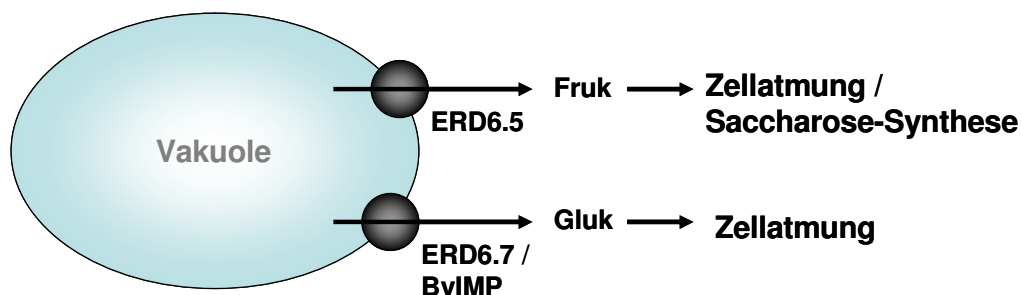
von Glukose und Fruktose erreicht (Wormit et al., 2006); die anschließende Wiedererwärmung bei Dunkelheit stellte eine Situation erhöhter Respiration dar (Mohammed und Tarpley, 2009). Daher sollte die Wiedererwärmung zu einer Freisetzung der gespeicherten Monosaccharide aus der Vakuole in das Zytosol führen, so dass sie als Substrate der Zellatmung metabolisiert werden können.

Vor diesem Hintergrund wurde angenommen, dass die untersuchten vakuolären Transportproteine insbesondere in Phasen der Kälte und Wiedererwärmung messbare Effekte auf die Zucker-Gehalte in Blättern ausüben. Die Annahme wurde in allen drei Fällen bestätigt: Unter Standardbedingungen und Kältestress unterschied sich die *ERD6.7*-Knockout-Mutante aufgrund höherer Glukose-Gehalte von den Wildtyp-Pflanzen; während der Wiedererwärmung nahmen in den Mutanten die Glukose-Gehalte weniger stark ab als in den Wildtyp-Pflanzen (Kap. 3.9, Abb. 3.24). Dagegen wiesen die Linien, die *BvIMP* exprimieren, nach einer Kältebehandlung stärker reduzierte Glukose-Gehalte auf (Kap. 3.10, Abb. 3.27). Die *ERD6.5*-Knockout-Mutanten zeigten im Laufe der Wiedererwärmung gegenüber den Wildtyp-Pflanzen höhere Fruktose-Gehalte und reduzierte Saccharose-Gehalte (Kap. 3.9, Abb. 3.23).

Die Bestimmung der Zuckergehalte lässt den Schluss zu, dass *ERD6.7* und *BvIMP* Glukose, *ERD6.5* dagegen Fruktose aus der Vakuole transportieren und somit den Abbau dieser Monosaccharide ermöglichen. Dabei könnte es sich wie im Falle der GLUT-Proteine um eine erleichterte Diffusion handeln. *ERD6.5* wäre hinsichtlich des postulierten Transportsubstrats mit dem Carrier GLUT5 aus menschlichen Spermien vergleichbar, der spezifisch Fruktose transportiert (Burant et al., 1992). Die im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen reduzierten Saccharose-Gehalte der *ERD6.5*-Knockout-Mutanten während der Wiedererwärmung könnten darauf basieren, dass unter diesen Bedingungen für die Saccharose-Synthese im Zytosol womöglich teilweise Fruktose aus der Vakuole mobilisiert werden muss.

Die *BvIMP*-Expression führt vielleicht erst deshalb in der Wiedererwärmungsphase zu stärker reduzierten Glukose-Gehalten, weil unter Standard- und Kältebedingungen die von *BvIMP* aus der Vakuole exportierte Glukose über *AtVGT1* und über die TMT-Proteine reimportiert werden könnte. Zudem ist es möglich, dass die Aktivität von *BvIMP* wie im Falle von GLUT4 (Reusch et al., 1993) über Phosphorylierungen reguliert wird (Kap. 3.7, Tab. 3.3). Größere Unterschiede in den Glukose-Gehalten zwischen Wildtyp und *BvIMP* exprimierenden Pflanzen sind womöglich auch aufgrund der Aktivität von *ERD6.7* nicht nachweisbar. Die Feststellung, dass in den *ERD6.7*-Knockout-Mutanten die Glukose-Gehalte nicht nur erhöht sind, sondern während der Wiedererwärmung auch schwächer abnehmen, spricht für eine Funktion von *ERD6.7* im vakuolären Glukose-Export (Kap. 3.9, Abb. 3.24).

Die starke Geninduktion von *ERD6.5* bei Kälte (Kap. 3.8, Abb. 3.19) könnte eine schnell einsetzende Proteinexpression und –aktivität in der anschließenden Wiedererwärmungsphase ermöglichen; die Genreprimierung von *ERD6.7* (Kap. 3.8, Abb. 3.19) sollte ebenso mit einer geringeren Transportaktivität während der Kältephase verbunden sein, denn eine Aktivität der beiden Transporter würde bei Kälte der über die TMT-Proteine vermittelten Monosaccharid-Akkumulation entgegenwirken. Dementsprechend könnte die Proteinexpression während der Kältebehandlung erheblich reduziert sein oder eine Inaktivierung über (De-) Phosphorylierungen erfolgen. Die Anwesenheit putativer Phosphorylierungsstellen in *ERD6.5*, *ERD6.7* und *BvIMP* (Kap. 3.7, Tab. 3.3) stützt die Annahme einer möglichen posttranslationalen Regulation. Glykosylierungen als eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation sind unwahrscheinlich, weil die Proteine nicht das Motiv NXS/T für N-Glykosylierungen (Marshall, 1974) aufweisen und O-Glykosylierungen für pflanzliche Membranproteine bisher nicht nachgewiesen wurden (Thiellement, 2007). Abbildung 4.2 fasst die postulierten Funktionen für die pflanzlichen GLUT-Homologe auf Basis der Zuckergehalts-Bestimmungen zusammen.



**Abb. 4.2: Modell zu den Funktionen der GLUT-Homologe *ERD6.5*, *ERD6.7* und *BvIMP* im Primärstoffwechsel**

Da die Inaktivierung von *ERD6.7* zu einer beschleunigten Keimung und zu höheren Keimungsraten insbesondere bei hoher Glukose-Konzentration führt (Kap. 3.9, Abb. 3.25), ist eine regulatorische Funktion des Transportproteins in der Samenentwicklung anzunehmen. Unter Berücksichtigung der keimungshemmenden Signalwirkung von Glukose (Millar et al., 2006; Zhu et al., 2009) trägt ein über *ERD6.7* vermittelter Transport von Glukose in das Zytosol womöglich zu einer längeren Samen-Dormanz bei. Diese Annahme ist konsistent mit den Beobachtungen einer Keimungshemmung von Samen, in denen die *TMT*-Gene ausgeschaltet sind (Kap. 3.6, Abb. 3.17; Kap. 4.5). Ebenso wurde eine beeinträchtigte Keimung im Falle von *VGT1* defizienten Samen beobachtet (Aluri und Büttner, 2007). *VGT1* importiert wie die *TMT*-Proteine Glukose in die Vakuole. Es wurde angenommen, dass dieser Transport eine osmotische Grundlage für die Keimung darstellt

(Aluri und Büttner, 2007). Zudem erscheint es möglich, dass der Import von Glukose aus dem Zytosol in die Vakuole die keimungshemmenden Signale der Glukose reduziert (Kap. 4.5).

Die starke Promotoraktivität von *ERD6.5* (Kap. 3.8, Abb. 3.21) und *ERD6.7* (Kap. 3.8; *Arabidopsis eFP Browser*) im Pollen weist darauf hin, dass die Proteine hier eine Mobilisierung von Monosacchariden aus der Vakuole ermöglichen. Die in das Zytosol freigesetzten Zucker könnten nachfolgend ein energiereiches Substrat für die Zellatmung darstellen oder über die Umwandlung in UDP-Glukose für die Zellwand-Synthese im wachsenden Pollenschlauch eingesetzt werden (Chen et al., 2007). Für die *ERD6.5*-Knockout-Mutanten wurde keine reduzierte Keimungsrate der Pollen oder ein beeinträchtigtes Pollenschlauch-Wachstum bei einer Temperatur von 22°C und einer Lichtintensität von 100  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  festgestellt (Kap. 3.9, Daten nicht gezeigt). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei einer Variation der Untersuchungsbedingungen bezüglich Temperatur, Licht oder Medium Unterschiede ergeben.

## 5 Ausblick

Nachdem sich heterologe Expressionen als erfolglos erwiesen haben, könnten Transportsubstrate und Transportmechanismus der pflanzlichen GLUT-Homologe in Anlehnung an etablierte Efflux-Studien für den vakuolären Saccharose-Transport (Kaiser und Heber, 1984) überprüft werden: Vakuolen von Wildtyp- und entsprechenden Knockout-Pflanzen bzw. *BvIMP*-Expressionslinien werden in einem Medium mit radioaktiver Glukose oder Fruktose vorinkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgt der Transfer der Vakuolen in ein zweites Medium mit und ohne CCCP (ein Protonophor). Im Anschluss werden die Vakuolen nochmals gewaschen. Die verbliebene Radioaktivität lässt darauf zurückschließen, wie viel Glukose bzw. Fruktose in den Vakuolen zurückbehalten wurde. Wenn nun zum Beispiel die Vakuolen der *ERD6.7*-Knockout-Mutanten eine geringere Abnahme der Radioaktivität aufweisen als die Vakuolen der Wildtyp-Pflanzen, würde dies die Annahme bestätigen, dass *ERD6.7* Glukose aus der Vakuole transportiert. Wenn CCCP hierbei keinen Effekt auf die Abnahme der Radioaktivität hat, würde eine erleichterte Diffusion als Transportmechanismus bestätigt werden, anderenfalls müsste ein Protonen-Symport postuliert werden. Die Erzeugung von Doppelmutanten für *ERD6.5* und *ERD6.7* wäre eine Grundlage für weitere Analysen zur phänotypischen Auswirkung der Geninaktivierungen. Da die Gene auf dem gleichen Chromosom liegen, ist die auf Kreuzungen basierende Gewinnung einer Doppelmutante schwierig. Alternativ könnte über die RNAi-Methode *ERD6.5* in einer *ERD6.7*-Knockout-Mutante oder *ERD6.7* in einer *ERD6.5*-Knockout-Mutante reprimiert werden. Weiterführende Pollen- und Samenkeimungstests könnten die nächsten Schritte für eine physiologische Charakterisierung der *ERD6*-Homologe sein.

Für weiterführende Untersuchungen zur Funktion der *TMT*-Proteine könnten umfassende Bestimmungen der Metaboliten-Gehalte und ABA-Konzentrationen in den *TMT*-Triplemutanten unter abiotischen Stressbedingungen aufschlussreich sein. In diesem Zusammenhang ist auch die Charakterisierung von *TMT1* überexprimierenden Pflanzen interessant, die bereits von Dipl.-Biol. Karina Wingenter (Abteilung Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) durchgeführt wird. Die Messung der Transpirationsraten der *TDT*-Knockout-Mutanten in intaktem Zustand und die Charakterisierung *TDT* überexprimierender Pflanzen können dazu beitragen, die Funktion von *TDT* in der Regulation des Wasserhaushalts besser zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

I) Die Untersuchungen zum vakuolären Malat-Carrier AtTDT unterstützen die Annahme, dass seine Aktivität in den Schließzellen zum Öffnen und Schließen der Stomata beiträgt. Zudem erhöht wahrscheinlich die Aktivität von TDT in den Mesophyllzellen die Stomata-Dichte und den Stomata-Index. Im Rahmen einer osmotischen Anpassung vermittelt der Transporter eine Malat-Akkumulation, die in den *TDT*-Knockout-Mutanten beeinträchtigt ist und durch erhöhte Citrat-Gehalte kompensiert wird. Darüber hinaus beschleunigt TDT unter Kurztag-Bedingungen den Eintritt in die generative Phase. Eine Funktion von TDT in der Salztoleranz kann nach metabolischen und phänotypischen Analysen ausgeschlossen werden.

II) Die tonoplastidären Monosaccharid-Transporter regulieren bei Kälte in Blättern nicht nur die Monosaccharid-Gehalte, sondern wirken auch positiv auf Photosynthese und Stärkegehalte. Das Ausschalten der *TMT*-Gene führt unter den gewählten Kältebedingungen zu einer erhöhten Synthese von Saccharose und zu einer gesteigerten Respirationsrate. Insbesondere unter Wassermangel wirkt sich die Aktivität der tonoplastidären Monosaccharid-Transporter positiv auf die Keimungsrate aus.

III) Die Bestimmung von Zuckergehalten in Blättern indiziert, dass die tonoplastidären Transportproteine AtERD6.7 und BvIMP Glukose aus der Vakuole transportieren, während AtERD6.5 womöglich Fruktose aus der Vakuole transportiert. Als Transportmechanismus wird aufgrund der Homologie zu den GLUT-Proteinen eine erleichterte Diffusion angenommen. Die Aktivität der Carrier scheint insbesondere nach Kältephasen von Bedeutung zu sein, wenn vakuolär gespeicherte Zucker mobilisiert werden. ERD6.7 fördert gemäß den durchgeführten Keimungstests die Samen-Dormanz.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78
- Albrechtová JTP, Slavík J, Wagner E** (1997) Confocal pH-topography in the shoot apex of *Chenopodium rubrum* in relation to photoperiodic flower induction. *Endocytobiosis and Cell Research* **12**: 83-94
- Aluri S, Büttner M** (2007) Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**: 2537-2542
- Andes S** (2007) Physiologische Untersuchungen tonoplastidärer Monosaccharid-Transporter in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis. *Science* **285**: 1256–1258
- Asano T, Katagiri H, Takata K, et al.**(1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 24632-24636
- Awwad K** (2008) Analyse zweier tonoplastidärer Transporter ERDL4 und 6 aus *Arabidopsis thaliana* mit Homologie zur GLUT-Familie. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* **20**: 1195-1197
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **6**: 1513-1523
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S** (2004) Prediction of post translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**: 1633–1649
- Blumwald E, Aharon GS, Ape MP** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 140-151
- Bouveret R, Schonrock N, Grisse W, Hennig L** (2006) Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. *Development* **133**: 1693-1702
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378
- Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO** (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *Journal of Biological Chemistry* **267**:14523–14526
- Büttner M** (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**: 2318–2324

- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**: 3285-3303
- Chiou TJ, Bush DR** (1996) Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiology* **110**: 511–520
- Charron JB, Ouellet F, Houde M, Sarhan F** (2008) The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biology* **8**:86
- Chen R, Zhao X, Shao Z, Wei Z, Wang Y, Zhu L, et al.** (2007) Rice UDP-glucose pyrophosphorylase1 is essential for pollen callose deposition and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility. *Plant Cell* **19**: 847–861
- Church GM, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **79**: 7624-7628
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta SL, Tonelli C** (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology* **15**: 1196-1200
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of T-DNA gene S controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* **204**: 383-396
- Déjardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA** (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* **344**: 503–509
- Dittrich P, Raschke K** (1994) Malate metabolism in isolated epidermis of *Commelina communis* L. in relation to stomatal functioning. *Planta* **134**: 77-81
- Doege H, Schürmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG** (2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 16275–16280
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE** (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 11122–11126
- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH** (2001) In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium channels in *Arabidopsis* pollen protoplasts. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1–12
- Friedman H, Spiegelstein H, Goldschmidt EE, Halevy AH** (1990) Flowering response of *Pharbitis nil* to agents affecting cytoplasmic pH. *Plant Physiology* **94**:114–119
- Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Muller A, Ansoerge M, Becker D, Mamnun Y, Kuchler K, Schulz B, Müller-Roeber B, Martinoia E** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *The EMBO Journal* **20**: 1875-1887

- Gamble PE, Mullet JE** (1989) Translation and stability of proteins encoded by the plastid psbA and psbB genes are regulated by a nuclear gene during light-induced chloroplast development in barley. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 7236–7243
- Gaxiola RA, Li JS, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR** (2001) Drought- and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 11444–11449
- Geisler M, Frangne N, Gomez E, Martinoia E, Palmgren MG** (2000) The ACA4 gene of Arabidopsis encodes a vacuolar membrane calcium pump that is involved in calcium signaling upon salt stress. *Plant Physiology* **124**: 1814–1827
- Gleave AP** (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* **20**: 1203-1207
- Gout E, Bligny R, Pascal N, Douce R** (1993) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 3986–3992
- Guo FQ, Young J, Crawford NM** (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 107-117
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P** (1994) The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*. **25**: 989-994
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580
- Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM** (1983) Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiology* **73**: 834–843
- Hannich B** (2009) Charakterisierung einzelner vakuolärer Zuckertransporter aus der AtERD6-Familie in Arabidopsis thaliana. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Hanscom Z, Ting IP** (1978) Responses of succulents to plant water stress. *Plant Physiology* **61**: 327-330
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, et al.** (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**: 1968–1971
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* **27**: 297-300
- Hirschi KD, Zhen R-G, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR** (1996) CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**: 8782–8786
- Hofmann K, Stoffel W** (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry* **374**: 406-409

- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H** (2003) The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 5549-5554
- Hurth MA** (2005) Molekulare, physiologische und biochemische Charakterisierung eines vakuolären Dikarboxylattransporters aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Hurth MA, Suh SJ, Kretzschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE** (2005) Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology* **137**: 901-910
- McNulty IB** (1985) Rapid Osmotic Adjustment by a Succulent Halophyte to Saline Shock. *Plant Physiology* **78**: 100-103
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J** (2007) A Proteomics Dissection of *Arabidopsis thaliana* Vacuoles Isolated from Cell Culture. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 394-412
- Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC** (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**: 1867–1882
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong J-J** (2008) Overexpression of AtMYB44 Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**: 623 – 635
- Kaiser G, Heber U** (1984) Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **161**: 562–568
- Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1370**:187-191
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E** (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant Journal* **39**: 219-236
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G** (2001) Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**: 80–91
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* **204**: 383-396
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E** (2007) The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant Journal* **52**: 1169-1180
- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, Woodward FI** (2001) Plant development. Signals from mature to new leaves. *Nature* **411**: 154
- Lee H, Xiong L, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK** (1999) Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an Arabidopsis thaliana mutant. *Plant Journal* **17**: 301-308

- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim YY, Jeon B, Maeshima M, Yoo JY, Martinoia E, Lee Y** (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Nature Cell Biology* **10**: 1217-1223
- 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
- Liang YK, Dubos C, Dodd IC, Holroyd GH, Hetherington AM, Campbell MM** (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **15**: 1201-1206
- Llorente F, Oliveros JC, Martinez-Zapater JM, Salinas J** (2000) A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, frs1, is a new aba3 allele. *Planta* **211**: 648-655
- Lottspeich F, Zorbas H** (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte K, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009): Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**:1064-1068
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stress: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139-158
- Mandel M, Higa A** (1970) Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. *Journal of Molecular Biology* **53**: 159
- Marshall, RD** (1974) The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochemical Society Symposia* **40**: 17-26
- Marten H, Hyun T, Gomi K, Seo S, Hedrich R, Roelfsema MR** (2008) Silencing of NtMPK4 impairs CO<sub>2</sub>-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in *Nicotiana tabacum* guard cells. *Plant Journal* **55**: 698-708
- Martinoia E, Rentsch D** (1994) Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 447-467
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83 – 102
- Mattioli R, Marchese D, D'Angeli S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M** (2008) Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **66**: 277-288
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Muller A, Giraudat J, Leung J** (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *The EMBO Journal* **26**: 3216-3226
- Michaels SD, Bezerra IC, Amasino RM** (2004) FRIGIDA-related genes are required for the winter-annual habit in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**: 3281-3285
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F G** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant Journal* **45**: 942-954

- Mitsuhashi W, Sasaki S, Kanazawa A, Yang Y-Y, Kamiya Y, Toyomasu T** (2004) Differential expression of acid invertase genes during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* **68**: 602-608
- Mohammed A-R, Tarpley L** (2009) Impact of High Nighttime Temperature on Respiration, Membrane Stability, Antioxidant Capacity, and Yield of Rice Plants. *Crop Science* **49**: 313 – 322
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF** (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**:941–945
- Mueckler M** (1994) Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry* **219**: 713-725
- Mühlhardt C** (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 5. Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München
- Neuhaus HE** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Letters* **581**: 2223–2226
- Nicholas KB, Nicholas HB** (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. Distributed by the authors
- Nixon PJ, Gounaris K, Coomber SA, Hunter CN, Dyer TA, Barber J** (1989) psbG is not a photosystem two gene but may be an ndh gene. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 14129–14135
- Ohnishi N, Takahashi Y** (2008) Chloroplast-encoded PsbT is required for efficient biogenesis of photosystem II complex in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* **95**: 315-322
- Ohto M-A, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K** (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 252–261
- Palmada M, Boehmer C, Akel, A, Rajamanickam J, Jeyaraj S, Keller K, Lang F** (2006) SGK1 kinase upregulates glucose transporter GLUT1 activity and plasma membrane expression. *Diabetes* **55**: 421-427
- Patonnier M, Peltier J, Marigo G** (1999) Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1223–1231
- Patton AJ, Cunningham SM, Volenec JJ, Reicher ZJ** (2007) Differences in Freeze Tolerance of Zoysiagrasses: II. Carbohydrate and Proline Accumulation. *Crop Science* **47**: 2170 - 2181
- Peiter E, Maathuis F, Mills L, Knight H, Pelloux J, Hetherington A, Sanders D** (2005) The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**: 404–408
- Peltier JP, Marigo G**, (1999) Drought adaptation in *Fraxinus excelsior* L.: physiological basis of the elastic adjustment. *Journal of Plant Physiology* **154**: 529-535

- Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R** (2007) Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* **226**: 729–740
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B** (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant Journal* **28**: 455-464
- Pospišilová J** (1996) Effect of air humidity on the development of functional stomatal apparatus. *Biologia Plantarum* **38**: 197–204
- Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET** (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **54**: 743-753
- Rasmussen R, Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds)** (2001) Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-time PCR—Methods and Applications* pp. 21-34. Springer-Verlag, Heidelberg
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE** (2000) *Biologie der Pflanzen*. Walter de Gruyter, Berlin/New York, 3. Auflage
- Reusch JE, Sussman KE, Draznin B** (1993) Inverse relationship between GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 3348–3351
- Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* **167**: 665-691
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. A Special Issue on Signal Transduction. *Plant Cell* **19**: 185-205
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- Samih N, Hovsepian S, Notel F, Prorok M, Zattara-Cannoni H, Mathieu S, Lombardo D, Fayet G, El Battari A** (2003) The impact of N- and O-glycosylation on the functions of Glut-1 transporter in human thyroid anaplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1621**: 92–101
- Sánchez FJ, Manzanares M, Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L** (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* **59**: 225-235
- Sanger F, Fritsch EF, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **74**: 5463-5467
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D** (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* **11**: 377-392
- Schwacke R, Schneider A, Van der Graaf E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, Kunze R** (2003) Aramemnon, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology*. **131**: 16-26

- Speer M, Kaiser WM** (1991) Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. *Plant Physiology* **97**: 990–997
- Steponkus PL** (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**: 543-584
- Strand Å , Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P, Hurry V** (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell and Environment* **26**: 523–536
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* **54**: 733-49
- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Plant Physiology* (4th Edition). Sinauer, Sunderland, Mass., USA
- Thiellement H** (2007) *Plant Proteomics: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* , Vol. 355
- Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**: 2481-2498
- Traub M** (2003) Molekularphysiologische Charakterisierung eines putativen vakuolären Dikarbonsäuretransporters aus *Arabidopsis thaliana* (L.). Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**:1529-1539
- 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 Oosten J-JM, Gerbaud A, Huijser C, Dijkwel PP, Chua H-H, Smeekens SCM** (1997) An *Arabidopsis* mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. *Plant Journal* **12**: 1011-1020
- Wanner LA, Junttila O** (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **120**: 391–399
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE** (2006) Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from *Arabidopsis* Involved in Vacuolar Sugar Transport. *Plant Cell* **18**: 3476–3490
- Wormit A** (2006) Charakterisierung von vakuolären Monosaccharidtransportern aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern



**Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM** (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**: 1345–1355

**Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An 'Electronic Fluorescent Pictograph' Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One*. **2(8)**: e718

**Yano R, Nakamura M, Yoneyama T, Nishida I** (2005) Starch related  $\alpha$ -glucan/water dikinase is involved in the cold induced development of freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**: 837–846

**Zhu G, Ye N, Zhang J** (2009) Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **50**: 644-651

**Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology* **53**: 247–273

**Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* **136**: 2621-2632

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
A	Ampere
AA	Aminosäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AGI	<i>Arabidopsis</i> Genom Identifier
Amp	Ampicillin
At / <i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AfTDT	<i>Arabidopsis thaliana</i> tonplastidärer Dicarboxylat-Transporter
AfTMT	<i>Arabidopsis thaliana</i> tonplastidärer Monosaccharid-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BvIMP	<i>Beta vulgaris</i> integral membran Protein
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CAX	Calcium Exchanger
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Clm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	cycle threshold, Schwellwert-Zyklus
d	Tage
d	desoxy
dATP	2' Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2' Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2' Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	2' Desoxythymintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2' -Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERD6	Early response to dehydration Protein 6
FG	Frischgewicht
Fruc	Fruktose
G	Guanin

GTP	Guanosintriphosphat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABI-KAT	<u>G</u> enom <u>a</u> lysen im <u>b</u> iologischen System Pflanze- <u>K</u> ölner <u>A</u> rabidopsis <u>T</u> -DNA-Linien
Glc	Glukose
GLUT	Glukose-Transporter
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinol]-Ethansulfonsäure
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IMP	Integrales Membran Protein
ITPG	Isopropylthiogalaktosid
k	kilo
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
KCH <sub>3</sub> COO	Kaliumacetat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KPi	Kaliumphosphatpuffer
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	knock out
l	Liter
m	milli
M	Molar (Mol/l)
MCS	„multiple cloning site“ (multiple Klonierungsstelle)
MeOH	Methanol
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	2-(N-morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
n	nano
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
Nt	Nicotiana tabacum
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCS	Terminator des Octopinsynthesegenes
OD <sub>600</sub>	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	„open reading frame“ (offenes Leseraster)
p.A.	per Analysis, für Analysen
pBSK	pBluescript (SK), Klonierungsvektor
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
pmf	Protonenmotorische Kraft („proton motive force“)

---

P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PR-Proteine	Pathogen bezogene (Pathogen Related) Proteine
PS	Photosynthese
R	Resistenzgen
RbCl	Rubidiumchlorid
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinase
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-(„sodium“-)-dodecylsulfat
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
ssp.	Subspecies
STP	Sugar Transport Protein
Suc	Saccharose
SUC4	Saccharose-Transporter4
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth, ein Bakterienmedium
TBS(T)	Tris buffered salt (tween)
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
Tet	Tertazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminoethan
U	Unit (µmol Substrat pro Minute)
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UDP-Glc	UDP-Glukose
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-ATPase	vakuoläre ATPase
VGT	vakuolärer Glukose-Transporter
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronid
z.B.	Zum Beispiel
µ	mikro

## 8.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## 8.3 AGI- bzw. Accession-Nummern

Die Tabelle 8.1 ordnet den untersuchten Genen die AGI (Arabidopsis Gene Index)- und Accession-Nummern zu. Die Angaben basieren auf der Datenbank Aramemnon (Schwacke et al., 2003).

**Tabelle 8.1: AGI und Accession-Nummern der untersuchten Gene**

<b>Gen</b>	<b>Accession</b>	<b>AGI</b>
<i>AtERD6.5</i>	Q93YP9	At1g19450
<i>AtERD6.7</i>	Q9FRL3	At1g75220
<i>AtTDT</i>	NP_199567	At5g47560
<i>AtTMT1</i>	Q96290	At1g20840
<i>AtTMT2</i>	Q8LPQ8	At4g35300
<i>AtTMT3</i>	Q9SD00	At3g51490
<i>BvIMP</i>	Q39416	-

## 8.4 Proteinsequenzen

Im Folgenden werden die Sequenzen der untersuchten Transportproteine aufgeführt. Sie sind der Datenbank Aramemnon entnommen.

### AtERD6.5

```
001 MSFRDDNTEE GRNDLRRPFL HTGSWYRMGS RQSSMLESSQ VIRDSSISVL ACVLIVALGP
061 IQFGFTCGYS SPTQAAITKD LGLTVSEYSV FGSLSNVGAM VGAIASGQIA EYVGRKGSLM
121 IAAIPNIIGW LSISFAKDTS FLYMGRLLG FGVGIISYTV PVYIAEIAPO TMRGALGSVN
181 QLSVTIGIML AYLLGLFVWP RILAVLGVLP CTLLIPGLFF IPESPRWLAK MGLTDDFETS
241 LQVLRGFETD ITVEVNEIKR SVASSSKRSA VRFVDLKRRLR YYFPLMVGIG LLALQQLGGI
301 NGVLFYSSTI FESAGVTSSN VATFGVGVVQ VVATGIATWL VDKAGRRLLL MISSIGMTIS
361 LVIVAVAFYL KEFVSPDSNM YNILSMVSVV GVVAMVISCS LGMGPIPWLI MSEILPVNIK
421 GLAGSIATLL NWFVSWLVTM TANMLLAWSS GGTFTLYALV CGFTVVVFVSL WVPETKGTKL
481 EEIQALFR
```

### AtERD6.7

```
001 MSFRDDNTEE GRNDLRRPFL HTGSWYRMGS RQSSMLESSQ VIRDSSISVL ACVLIVALGP
061 IQFGFTCGYS SPTQAAITKD LGLTVSEYSV FGSLSNVGAM VGAIASGQIA EYVGRKGSLM
121 IAAIPNIIGW LSISFAKDTS FLYMGRLLG FGVGIISYTV PVYIAEIAPO TMRGALGSVN
181 QLSVTIGIML AYLLGLFVWP RILAVLGVLP CTLLIPGLFF IPESPRWLAK MGLTDDFETS
241 LQVLRGFETD ITVEVNEIKR SVASSSKRSA VRFVDLKRRLR YYFPLMVGIG LLALQQLGGI
301 NGVLFYSSTI FESAGVTSSN VATFGVGVVQ VVATGIATWL VDKAGRRLLL MISSIGMTIS
361 LVIVAVAFYL KEFVSPDSNM YNILSMVSVV GVVAMVISCS LGMGPIPWLI MSEILPVNIK
421 GLAGSIATLL NWFVSWLVTM TANMLLAWSS GGTFTLYALV CGFTVVVFVSL WVPETKGTKL
481 EEIQALFR
```

### AtTDT

```
001 MSFRDDNTEE GRNDLRRPFL HTGSWYRMGS RQSSMLESSQ VIRDSSISVL ACVLIVALGP
061 IQFGFTCGYS SPTQAAITKD LGLTVSEYSV FGSLSNVGAM VGAIASGQIA EYVGRKGSLM
121 IAAIPNIIGW LSISFAKDTS FLYMGRLLG FGVGIISYTV PVYIAEIAPO TMRGALGSVN
181 QLSVTIGIML AYLLGLFVWP RILAVLGVLP CTLLIPGLFF IPESPRWLAK MGLTDDFETS
241 LQVLRGFETD ITVEVNEIKR SVASSSKRSA VRFVDLKRRLR YYFPLMVGIG LLALQQLGGI
301 NGVLFYSSTI FESAGVTSSN VATFGVGVVQ VVATGIATWL VDKAGRRLLL MISSIGMTIS
361 LVIVAVAFYL KEFVSPDSNM YNILSMVSVV GVVAMVISCS LGMGPIPWLI MSEILPVNIK
421 GLAGSIATLL NWFVSWLVTM TANMLLAWSS GGTFTLYALV CGFTVVVFVSL WVPETKGTKL
481 EEIQALFR
```

### AtTMT1

```
001 MKGATLVALA ATIGNFLQGW DNATIAGAMV YINKDLNLPT SVQGLVVAMS LIGATVITTC
061 SGPISDWLGR RPMLILSSVM YFVCGLIMLW SPNVYVLCFA RLLNGFGAGL AVTLVPVYIS
121 ETAPPEIRGQ LNTLPQFLGS GGMFLSYCMV FTMSLSDSPS WRAMLGVLSI PSLLYLFLTV
181 FYLPESPRWL VSKGRMDEAK RVLQQLCGRE DVTDEMALLV EGLDIGGEKT MEDLLVTLED
241 HEGDDTLETV DEDGQMRLYG THENQSYLAR PVPEQNSSLG LRSRHGSLAN QSMILKDPLV
301 NLFVSLHEKM PEAGNTRSG IFPHFGSMFS TTADAPHGKP AHWEKDIESH YNKDNDYAT
361 DDGAGDDDDDS DNDLRSPLMS RQTTSMKDM IPHPTSGSTL SMRRHSTLMQ GNGESSMGIG
421 GGWHMGYRYE NDEYKRYYLK EDGAESRRGS IISIPGGPDG GGSYIHASAL VSRSVLGPKS
481 VHGSAMVPEP KIAASGPLWS ALLEPGVKRA LVVGVGIQIL QQFSGINGVL YYTPQILERA
541 GVDILLSSLG LSSISASFLI SGLTTLMLP AIVVAMRLMD VSGRRSLLW TIPVLIVSLV
601 VLIVISELIHI SKVVNAALST GCVVLYFCFF VMGYGPIPI NI LCSEIFPTRV RGLCIAICAM
661 VFWIGDIIIVT YSLPVLLSSI GLVGVFSIYA AVCVISWIFV YMKVPETKGM PLEVITDYFA
721 FGAQAQASAP SKDI
```

**AtTMT2**

001 MSGAVLVAIA AAVGNLLQGW DNATIAGAVL YIKKEFNLES NPSVEGLIVA MSLIGATLIT  
 061 TCSGGVADWL GRRPMLILSS ILYFVGSLSVM LWSPNVYVLL LGRLLDGFGV GLVVTLVPIY  
 121 ISETAPPEIR GLLNTLPQFT GSGGMFLSYC MVFGMSLMPS PSWRLMLGVL FIPSLVFFFL  
 181 TVFFLPESPR WLVSCKGRMLE AKRVLQRLRG REDVSGEMAL LVEGLGIGGE TTIEEYIIGP  
 241 ADEVTDHDI AVDKDQIKLY GAEEGLSWVA RPVKGGSTMS VLSRHGSTMS RRQGSLLDPL  
 301 VTLFGSVHEK MPDTGSMRSA LFPFHGSMFS VGGNQPRHED WDEENLVGEG EDYPSDHGDD  
 361 SEDDLHSPLI SRQTTSMKED MPHTAHGTL S TFRHGSQVQG AQGEGAGSMG IGGWQVAVK  
 421 WTEREDESQ KEGGFKRIYL HQEGFPGSRR GSIVSLPGGD GTGEADVFQA SALVSQPALY  
 481 SKDLLKEHTI GPAMVHPSET TKGSIWHDLH DPGVKRALVV GVGLQILQQF SGINGVLYYT  
 541 PQILEQAGVG ILLSNMGISS SSASLLISAL TTFVMLPAIA VAMRLMDLSG RRTLLLTIP  
 601 ILIASLLVLV ISNLVHMNSI VHAVLSTVSV VLYFCFFVMG FGPAPNILCS EIFPTRVRGI  
 661 CIAICALTFW ICDIIVTYSL PVLLKSIGLA GVFGMYAIVC CISWVVFVFIK VPETKGMPL  
 721 VITEFFSVGA RQAEAAKNE

**AtTMT3**

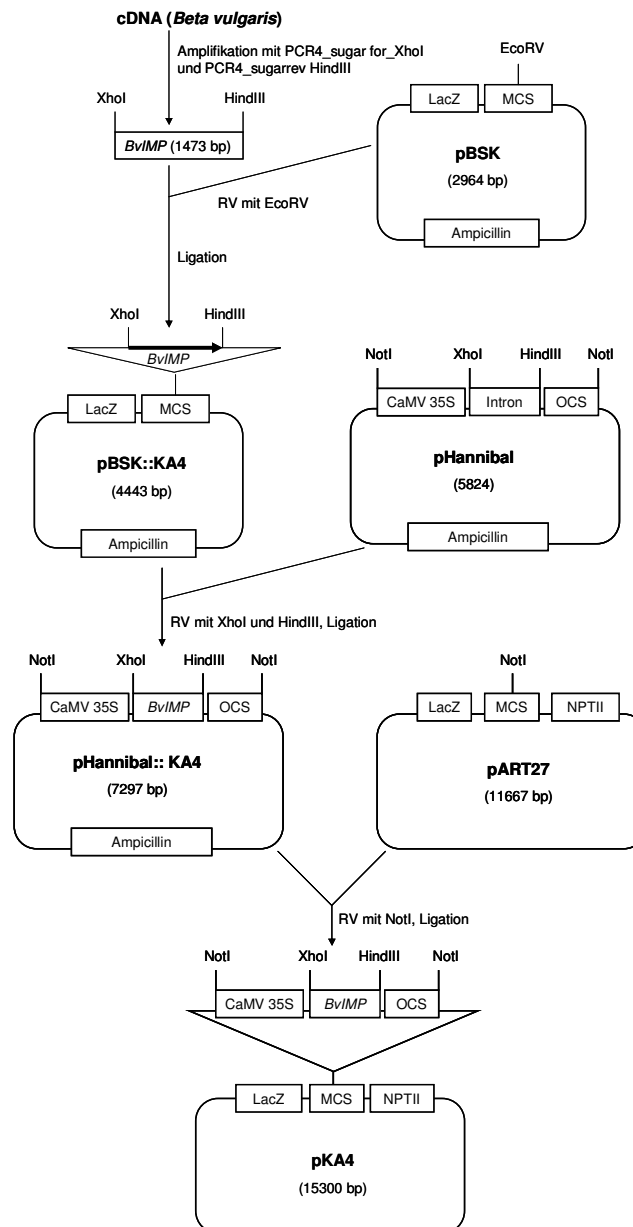
001 MRSVVLVALA AAIGNMLQGW DNATIAGAVI YIKKEFHLEK EPKIEGLIVA MSLIGATLIT  
 061 TFSGPVSDKV GRRSMLILSS VLYFLSSIVM FWSPNVYVLL FARLLDGFVI GLAVTLVPIY  
 121 ISETAPSEIR GLLNTFPQFC GSGGMFLSYC LVFGMSLQES PSWRLMLGVL SIPSIAFYVL  
 181 AAFFLPESPR WLVSCKGRMDE ARQVLQRLRG REDVSGELAL LVEGLGVGKD TSIEEYVIGP  
 241 DNEENEGGNE LPRKDQIKLY GPEDGQSWMA KPVKGQSSLA LASRQGSMLP RGGSLMDPLV  
 301 TLFGSIHENL PSENMNASSR SMLFPMGSI LGMMGRQESQ WDPERNNEDS SDQDENLNSP  
 361 LLSPQTTEPD DYHQRTVGTM HRRQSSLFMA NVGETATATS IGGGWQLAWK YNDKVGADGK  
 421 RVNGGLQRMV IHEETANNNT NNIPFSRRGS LLSFHPEGDG HDQVNGYVQA AALVSQASMM  
 481 PGGKGETAML PKEVKDGPV RELKEPGVKR ALMVGVLQI LQQFAGINGV MYYTPQILEE  
 541 TGVSSLLTNL GISAESASLL ISALTTLLML PCILVSMRSL MLSTIPILIL SLVTLVIGSL  
 601 VNLGGSINAL ISTASVTVYL SCFVMGFGAI PNILCSEIFP TSVRGLCITI CALTFWICDI  
 661 IVTYTLPVML KSIGIAGVFG IYAIVCAVAW VFVYLKVPET KGMPLEVI SE FFSVGAKQQD  
 721 AAASFVSDG

**BvIMP**

001 MSSDSEAGLG GGGDLRKPFL LHTGSWYRMG SRQSSLMGSS QVIRESSISV LACVLIVALG  
 061 PIQFGFTAGY SSPTQSAITN ELGLSVAEYS WFGSLSNVGA MVGAIASGQI SEYIGRKGSL  
 121 MIAAIPNIIG WLAI SFAKDS SFLYMGRMLE GFGVGIISYT VPVYISEIAP QNLRGALGSV  
 181 NQLSVTIGIM LSYMLGLFVP WRILAVLGIL PCTILIPGLF FIPESPRWLA KMGMMEEFEV  
 241 SLQVLRGFDI DISLEVNEIK RSVASSSKRT TIRFAELRQR RYWLPLMIGN GLLILQQLSG  
 301 INGVLFYSST IFKEAGVTSS NAATFGLGAV QVIATVVTTW LVDKSGRRLI LIVSSGMTL  
 361 SLLVAMSFF LKEMVDEST WYSVFSILSV VGVVAMVVTI SLGIGAIPIWI IMSEILPINI  
 421 KGLAGSIATL ANWFVAWIVT MTANIMLSWN SGGTFSIYMV VCAFTVAFVV IWPETKGR  
 481 LEEIQWSFR

## 8.5 Klonierungsstrategie zur Expression von *BvIMP* in Arabidopsis

Abbildung 8.1 zeigt das Klonierungsschema für die Herstellung des Konstrukts zur Expression von *BvIMP* in Arabidopsis.



**Abb. 8.1:** Klonierungsstrategie zur Expression von *BvIMP* in *Arabidopsis thaliana*. CaMV-35S: 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaikvirus; LacZ:  $\beta$ -Galactosidase-Gen; MCS: *multiple cloning site*; NPTII: Neomycin-Phosphotransferase II (bewirkt in transgenen Pflanzen Resistenz gegen Kanamycin); OCS: Octopinsynthase-Gen-Terminator; RV: Restriktionsverdau



## 8.6 Spezifizierung der angewandten HPLC-Methoden

Die folgende tabellarische Übersicht gibt genauere Informationen zu den HPLC-Methoden, die für die Bestimmung der verschiedenen Ionen- und Zuckergehalte angewandt wurden.

### A) Zucker

Gerät / Parameter	Spezifizierung
Anlage	761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz)
Säule	Metrosep Carb 1-250 (Metrohm, Schweiz)
Flussrate	1 ml/min
Laufmittel	100 mM NaOH
Druck	9,5 MPa
Temperatur	32 °C

### B) Anorganische Anionen

Gerät / Parameter	Spezifizierung
Anlage	761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz)
Säule	Metrosep A Supp 4-250 (Methrom, Schweiz)
Flussrate	1 ml/min
Laufmittel	4 mM NaHCO <sub>3</sub> + 1mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Gegenion	50 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Druck	8 MPa
Temperatur	22 °C

### C) Organische Säuren

Gerät / Parameter	Spezifizierung
Anlage	761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz)
Säule	Metrosep Organic Acid-100
Flussrate	0,6 ml/min
Laufmittel	0,25 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Gegenion	10 mM LiCl <sub>2</sub>
Druck	2,2 MPa
Temperatur	22 °C

**D) Kationen**

Gerät / Parameter	Spezifizierung
Anlage	761- IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz)
Säule	Metrosep Cation(Methrom, Schweiz)
Flussrate	1 ml/ min
Laufmittel	0,1 N HNO <sub>3</sub> ; 1,7 mM Dipicolinsäure
Gegenion	CO <sup>3-</sup> -Gruppen
Druck	7,5 MPa
Temperatur	22°C

**8.7 Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen und Publikationen****Vorträge**

“Physiological characterization of the plant vacuolar malate carrier” 7. Kolloquium des DFG-Graduiertenkollegs GRK 845, 13. März 2009, Freinsheim (Pfalz)

“Contribution of the plant vacuolar malate carrier to drought resistance ” 6. Kolloquium des DFG-Graduiertenkollegs GRK 845, 8. März 2008, Freinsheim (Pfalz)

**Poster**

Wic S, Neuhaus E (2008) “Contribution of the plant vacuolar malate carrier to drought resistance” Networking meeting GRK1326/GRK 845, 29. August 2008, Technische Universität Kaiserslautern

Wic S, Neuhaus E (2007) “Tonoplastic malate transport“ 2. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs GRK 845, 28. August 2007, Bad Münster am Stein

**Publikationen (in Vorbereitung)**

Wic S\*, Trentmann O\*, Hurth MA, Fürst S, Ache P, Hedrich R, Grob H, Martinoia E, Neuhaus E (2010) The guard cell expressed tonoplast dicarboxylate transporter affects stomatal movement and density, in preparation

\* both authors contributed equally to this work.

Hannich B, Poschet G, Wic S, Büttner M (2010) Identification and physiological characterization of carriers mediating the vacuolar hexose export in Arabidopsis, in preparation

---

## Lebenslauf



**Name:** Stefan Wic  
**Geburtsdatum:** 12.07.1980  
**Geburtsort:** Grünstadt/ Pfalz  
**Familienstand:** ledig



### Promotion

9/2006-11/2009 Promotion in der Abteilung Pflanzenphysiologie an der TU Kaiserslautern (Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus)  
- Stipendium für das Graduiertenkolleg 845

Thema der Dissertation:

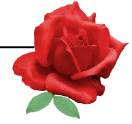
Charakterisierung vakuolärer Transportproteine aus Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung abiotischer Stressbedingungen

### Schule/ Zivildienst/ Studium

10/2001-08/2006 Studium der Biologie (Diplom) an der TU Kaiserslautern  
- Prüfungsfächer: Biochemie, Genetik und Pflanzenphysiologie  
- Diplomarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus) zum Thema:  
Analyse des Kohlenhydrattransfers in der Blaualgenflechte *Peltigera preatextata*

11/2000-07/2001 Zivildienst im Kinder- und Jugendheim St. Rafael, Altleiningen  
- Hausaufgabenbetreuung, Freizeitgestaltung und Fahrdienste

08/1991–06/2000 Leininger Gymnasium in Grünstadt, Abitur  
- Leistungskurse: Biologie, Chemie und Latein



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus für die Bereitstellung der interessanten Projekte sowie die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der letzten drei Jahre danken. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Oliver Trentmann für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie Herrn Wolfgang Jeblick für die Unterstützung bei den Metaboliten-Analysen. Bei Frau Dipl.-Biol. Sara Andes und Herrn Dipl.-Biol. Khader Awwad bedanke ich mich für die äußerst engagierte Mitarbeit an den Projekten während ihrer Diplomarbeit. Frau Dr. Gabi Amoroso danke ich für die tolle Organisation der zahlreichen Aktivitäten im Graduiertenkolleg, die mir Gelegenheit gaben, auch außerhalb des Labors fachlich dazuzulernen. Ein weiteres Dankeschön geht an die Kooperationspartner Prof. Dr. Enrico Martinoia, Prof. Dr. Arnd Heyer und Dr. Michael Büttner. Herrn Prof. Dr. Burkhard Büdel, Herrn Hans Reichenberger und Herrn Dipl.-Biol. Fritz Bicker danke ich sehr für ihr Entgegenkommen bei der Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz. Nicht zuletzt danke ich allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit. Meinen Eltern und Freunden gilt der größte Dank.



---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Ich versichere, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, im Oktober 2009

Stefan Wic