



**Weiterführende biochemische und physiologische
Analysen zum tonoplastidären Dicarboxylat Transporter
TDT in *Arabidopsis thaliana***

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

D 386

**vorgelegt von
Benedikt Frei
Kaiserslautern, im Mai 2015**

**Tag der wissenschaftlichen Aussprache:
24.04.2015**

**Berichterstatter:
Herr Professor Dr. H. Ekkehard Neuhaus
Herr Professor Dr. Matthias Hahn**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung von Carbonsäuren im pflanzlichen Metabolismus	1
1.2 Abiotischer Stress.....	3
1.3 Transport von Malat und Citrat über die Membranen	5
1.4 Vorarbeiten zum tonoplastidären Dicarboxylat Transporter (TDT).....	7
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien und Enzyme	9
2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht	9
2.2.1 Pflanzenmaterial	9
2.2.2 Anzucht auf Erde.....	10
2.2.3 Anzucht in Hydrokultur	10
2.2.4 Anzucht in Steril-Kultur.....	12
2.2.5 Oberflächensterilisation der Samen.....	12
2.2.6 Ernte und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials.....	12
2.3 Mikroorganismen	13
2.3.1 Verwendete Bakterienstämme	13
2.3.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	13
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.4.1 Verwendete Vektoren und Konstrukte	15
2.4.2 Oligonukleotide	15
2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	16
2.4.4 Plasmid-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.5 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.4.6 Restriktion von DNA.....	17

2.4.7	Gelelektrophorese, Extraktion und Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
2.4.8	DNA-Sequenzanalysen	18
2.4.9	Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.4.10	Isolation von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.4.11	Synthese des ersten cDNA-Strangs	18
2.4.12	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	18
2.4.13	Quantitative RT-PCR	19
2.5	Heterologe Expression des <i>AfTDT</i>	19
2.5.1	Heterologe Expression des <i>AfTDT</i> in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	19
2.5.2	Expression der cRNA in <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	19
2.5.3	Elektrophysiologische Experimente	20
2.5.4	Western-blot und Immunfluoreszenz	20
2.5.5	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	21
2.5.6	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen zur Isolation von Membranen	21
2.5.7	Solubilisierung und Reinigung von Membranproteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	22
2.5.8	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	23
2.5.9	Rekonstitution von Transportproteinen in Proteoliposomen.....	23
2.6	Biochemische und physiologische Methoden.....	28
2.6.1	Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität.....	28
2.6.2	Extraktion von Carbonsäuren	29
2.6.3	Extraktion von Zucker.....	29
2.6.4	Quantifizierung von Zuckern und Carbonsäuren	29
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Charakterisierung von <i>AfTDT</i> -Überexpressions-Pflanzen	31
3.2	Charakterisierung von <i>AfTDT</i> -Überexpressions-Pflanzen nach der Applikation von osmotischem Stress bzw. Trockenstress	34
3.3	Charakterisierung von <i>AfTDT</i> -Überexpressions-Pflanzen nach der Azidifizierung des Zytosols.....	37
3.4	Biochemische Untersuchungen an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	39

3.5	Elektrophysiologische Analysen zum AfTDT	41
3.6	Transportstudien zum AfTDT an Proteoliposomen.....	42
3.7	Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte des AfTDT	45
3.8	Import von [^{14}C]-Citrat in Abhängigkeit des pH Wertes.....	47
3.9	Bestimmung des Substratspektrums des AfTDT	49
4.	Diskussion	52
4.1	Die Überexpression des TDT führt zu reziproken Änderungen im Malat- und Citratgehalt.....	53
4.2	Der TDT katalysiert den pH-sensitiven Export von Citrat aus der Vakuole	54
4.3	Der TDT erfüllt unterschiedliche Funktionen in Reaktion auf verschiedene, abiotische Stresssituationen.....	59
4.4	Ausblick	63
5.	Zusammenfassung.....	65
6.	Literatur.....	66
7.	Anhang.....	74
7.1	Klonierungsstrategie	74
7.2	Abkürzungsverzeichnis	74
7.3	Vorträge und Poster auf wissenschaftlichen Tagungen.....	78
7.4	Publikationen	78
	Curriculum Vitae.....	79
	Danksagung.....	80

1. Einleitung

Carbonsäuren, insbesondere Mono-, Di-, und Tricarbonsäuren, spielen eine essentielle Rolle im Metabolismus aller lebenden Organismen. So sind sie z.B. als Intermediate des Citratzyklus an der Respiration und der Energetisierung der Zelle beteiligt. Bei der Glukoneogenese und im Glyoxylatzyklus dienen sie als Vorstufen zur Generierung von Kohlenhydraten (Horton, 2008; Heldt, 2008). Citrat und Malat, bei manchen Pflanzenarten auch Fumarat, sind dabei die Carbonsäuren, welche im Stoffwechsel der Pflanze am stärksten akkumulieren (Chia *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2009). Nachfolgend werden einige Funktionen, welche Carbonsäuren im pflanzlichen Metabolismus einnehmen, im Detail erläutert.

1.1 Bedeutung von Carbonsäuren im pflanzlichen Metabolismus

Citrat wird als erstes Intermediat des Citratzyklus aus Oxalacetat und Acetyl-CoA in der mitochondrialen Matrix synthetisiert. Acetyl-CoA selbst entsteht über die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Dieses wird am Ende der Glykolyse im Zytosol der Pflanze gebildet. In den Mitochondrien wird Pyruvat über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex in Form von Acetat an Coenzym A gebunden. Durch die Spaltung der energiereichen Thioesterbindung des Acetyl-CoA wird die Synthese von Citrat energetisiert und ist somit irreversibel. In mehreren Zwischenreaktionen wird Citrat über Isocitrat zu α -Ketoglutarat decarboxyliert. Über einen weiteren Dehydrogenase-Komplex wird α -Ketoglutarat über Succinyl-CoA zu Succinat umgesetzt. Daraufhin erfolgt die Oxidation zu Fumarat, welches zu Malat hydrogeniert wird. Über eine weitere Oxidation wird letztlich Oxalacetat regeneriert. Dieses kann erneut mit Acetyl-CoA zu Citrat kondensieren (Heldt, 2008).

Im Verlauf des Citratzyklus wird Pyruvat über Acetyl-CoA vollständig abgebaut, wodurch Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH_2 gewonnen werden. Diese werden in die mitochondriale Elektronentransportkette eingeschleust, wodurch die oxidative Phosphorylierung energetisiert und ATP gebildet wird (Michal, 1999; Buchanan, 2000).

Viele der Intermediate des Citratzyklus sind in weitere Stoffwechselreaktionen des pflanzlichen Metabolismus involviert und können diesem bei Bedarf entzogen werden. Um den Verbrauch an Intermediaten auszugleichen, müssen diese Entnahmen jedoch an anderer Stelle wieder dem Citratzyklus zugeführt werden. Dies wird als „anaplerotische Reaktion“ bezeichnet. Oxalacetat kann im Zytosol sowohl über die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, als auch über die Malat-Dehydrogenase aus Phosphoenolpyruvat (PEP) bzw. Malat gebildet werden. Letzteres kann ebenfalls über das NAD-Malat-Enzym zu Pyruvat umgesetzt werden.

Durch den Abbau vieler Aminosäuren, sowie die Übertragung von Stickstoffgruppen auf Pyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat ist der Citratzyklus weiterhin eng mit dem Aminosäure-

Stoffwechsel verbunden. Durch die Übertragung einer Stickstoffgruppe von Glutamat auf Oxalacetat entstehen bspw. α -Ketoglutarat und Aspartat. Letzteres kann durch eine weitere Transaminierung in Asparagin umgewandelt werden und ist zudem Ausgangssubstrat für die Synthese von Lysin, Threonin, Isoleucin und Methionin.

Über die Glutamat-Dehydrogenase kann Ammoniak reversibel an α -Ketoglutarat fixiert werden und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Nitratassimilation. Durch die Glutamin-Synthetase kann eine weitere Stickstoffgruppe an Glutamat gebunden werden, wodurch die Synthese von Glutamin katalysiert wird. Des Weiteren fungiert Glutamat in zahlreichen Transaminierungs-Reaktionen als Donor von Aminogruppen zur Synthese von Alanin, Arginin, Leucin, Ornithin, Prolin und Valin (Michal, 1999; Buchanan, 2000; Heldt, 2008).

Carbonsäuren sind auch als Intermediate des Glyoxylatzyklus, sowie bei der Versorgung der Peroxisomen mit Reduktionsäquivalenten während der Photorespiration essentiell. Der Glyoxylatzyklus ist vor allem während der Keimung wichtig für den Abbau von Fettsäuren und der Neusynthese von Kohlenhydraten. Fettsäuren werden dabei durch die β -Oxidation zu Acetyl-CoA umgesetzt. Dieses wird in den Glyoxysomen an Oxalacetat gebunden, wodurch Citrat gebildet wird. Citrat wird anschließend im Zytosol zu Isocitrat umgesetzt, welches in den Glyoxysomen über die Isocitrat-Lyase in Glyoxylat und Succinat gespalten wird. Succinat wird sodann über Teilreaktionen des Citratzyklus über mehrere Zwischenschritte letztlich in Phosphoenolpyruvat umgewandelt. Phosphoenolpyruvat kann im Anschluss für die Glukoneogenese genutzt werden. Das während der Spaltung von Isocitrat anfallende Glyoxylat kondensiert zusammen mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat. Durch die Oxidation von Malat wird Oxalacetat in den Glyoxysomen regeneriert (Heldt, 2008).

Während der Photorespiration entsteht 2-Phosphoglycolat als Nebenprodukt durch die Oxygenase-Aktivität der RubisCO. Dieses, sowie die Intermediate Glyoxylat und Glycin, welche beim Abbau von 2-Phosphoglycolat entstehen, wirken sich in hohen Konzentrationen toxisch auf den Metabolismus der Pflanze aus (Eisenhut *et al.*, 2007; Bauwe *et al.*, 2010). Durch das Zusammenspiel von Chloroplasten, Peroxisomen, Mitochondrien und dem Zytosol werden diese deshalb im Laufe der Photorespiration abgebaut und letztlich 3-Phospho-Glycerat in den Chloroplasten synthetisiert. 3-Phospho-Glycerat kann daraufhin wieder dem Calvincyklus zugeführt werden, um Ribulose-1,5-bisphosphat zu regenerieren. Dieser Recycling-Prozess ist für die Pflanze äußerst Energieaufwendig, da hierbei ATP in erheblichem Maße verbraucht wird. Bei der Reduktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat werden weiterhin Reduktionsäquivalente in Form von NADH in den Peroxisomen verbraucht, welche jedoch selbst nicht in der Lage sind, NADH aus NAD^+ zu regenerieren. Die Versorgung der Peroxisomen erfolgt daher indirekt über die Aufnahme von Malat bei gleichzeitiger Freisetzung von Oxalacetat über den Malat-Oxalacetat-Shuttle. Über die Malat-Dehydrogenase, von welcher Isoformen in allen vier beteiligten Kompartimenten vorliegen, kann Malat in einer

reversiblen Reaktion zu Oxalacetat oxidiert werden. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert und dem NADH -Pool der Peroxisomen zugeführt.

Oxalacetat kann wiederum sowohl in den Chloroplasten, als auch in den Mitochondrien, über die Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert werden. NADPH bzw. NADH wird dabei über die Photosynthese in den Chloroplasten, bzw. über die Glycin-Oxidation in den Mitochondrien regeneriert (Heldt 2008).

Carbonsäuren sind ebenfalls an der Bildung der Rhizosphäre beteiligt. Diese werden zusammen mit Sacchariden, Aminosäuren, sowie zahlreichen weiteren Stoffwechselprodukten aus der Pflanzenwurzel exsudiert, um Nährstoffe im Boden zu solubilisieren (Ryan *et al.*, 2001; Dennis *et al.*, 2010). Diese können daraufhin in gelöster Form über die Wasseraufnahme von der Wurzel absorbiert werden. Citrat, Oxalat und Malat sind hierbei entscheidend für die Mobilisierung von Phosphat, sowie die Chelatierung von Metallionen und weiteren Mikronährelementen, um diese für die Pflanze verfügbar zu machen (Gardner *et al.*, 1983; Marschner *et al.*, 1986). Durch die Bildung von Aluminium-Komplexen wird zudem die Aufnahme von Aluminium in die Wurzel verhindert (Ma *et al.*, 2001; Ezaki *et al.*, 2001).

Über die Malat-Dehydrogenase und das zytosolische Malat-Enzym, sowie deren antagonistische Enzym-Aktivitäten unter alkalischen und sauren pH Bedingungen, sind Malat, Oxalacetat und Pyruvat in Pflanzen ebenfalls bei der Aufrechterhaltung des zytosolischen pH-Wertes von Bedeutung (Smith und Raven, 1979). Bei einer Azidifizierung des Zytosols wird Malat über das Malat-Enzym zu Pyruvat decarboxyliert. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von CO_2 , sowie zur Bildung von NADH im Zytosol. Über die NADH -Dehydrogenase und die alternative Oxidase kann dieses über die Respiration und die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien an Sauerstoff gebunden werden. Überschüssige Protonen werden somit unter Bildung von Wasser dem Zytosol entzogen werden (Sakano *et al.*, 1998). Umgekehrt können unter alkalischen Bedingungen CO_2 und Hydroxidionen (OH^-) über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in Form von HCO_3^- an Phosphoenolpyruvat gebunden werden. Das bei dieser Reaktion entstehende Oxalacetat kann über die zytosolische Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert werden. Durch dessen Transport in die Vakuole wird dieses dem Zytosol entzogen und der alkalische pH Wert erniedrigt (Hurth *et al.*, 2005).

1.2 Abiotischer Stress

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen sehr häufig abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Zu diesen zählen unter anderem Hitze, Kälte, Trockenheit, eine Versalzung des Bodens, hohe Konzentrationen osmotisch aktiver Teilchen oder die Azidifizierung des Bodens z.B. durch sauren Regen. Pflanzen haben daher eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um sich morphologisch, physiologisch und/oder transkriptionell an die jeweiligen, verschiedenen

Stresssituationen anzupassen. CAM-Pflanzen, benannt nach dem Crassulaceensäure-Stoffwechsel, sowie C₄-Pflanzen können z.B. durch die zeitliche bzw. räumliche Trennung von CO₂-Fixierung und Calvinzyklus an besonders trockenen und heißen Standorten überleben. In CAM-Pflanzen wird dabei CO₂ in Form von HCO₃⁻ an Phosphoenolpyruvat gebunden, wodurch Oxalacetat entsteht. Dieses wird zu Malat reduziert, welches zweifach protoniert in Form von Äpfelsäure in hohen Konzentrationen in der Vakuole gespeichert wird. Da diese Vorfixierung von CO₂ ausschließlich während der Nachtphase stattfindet, können die Pflanzen ihre Schließzellen während der heißen Tagesperiode geschlossen halten. Der Wasserverlust wird dadurch stark reduziert. Während des Tages wird CO₂ über die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat freigesetzt und dem Calvinzyklus zugeführt (Heldt, 2008).

In C₄-Pflanzen hingegen wird CO₂ in den Mesophyllzellen der Blätter ebenfalls in Form von HCO₃⁻ an Phosphoenolpyruvat gebunden. Das daraus entstehende Oxalacetat wird daraufhin über eine Transaminierung in Aspartat umgewandelt. Dieses wird in die Mitochondrien der Bündelscheidenzellen transportiert und dort erneut zu Oxalacetat umgewandelt. Über die Reduktion zu Malat kann durch die Decarboxylierung zu Pyruvat CO₂ in den Bündelscheidenzellen abgegeben und dem Calvinzyklus zugefügt werden. Pyruvat wird daraufhin über eine erneute Transaminierung in Alanin umgewandelt, welches zurück in die Mesophyllzellen diffundiert. Durch die Übertragung der Stickstoffgruppe auf α-Ketoglutarat entsteht erneut Pyruvat, welches in den Chloroplasten der Mesophyllzellen zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert wird. Dieses kann im Zytosol der Zelle erneut zu Oxalacetat carboxyliert werden. Durch die Trennung von CO₂-Vorfixierung in den Mesophyllzellen und der endgültigen Fixierung in den Bündelscheidenzellen können C₄-Pflanzen selbst bei leicht geöffneten Schließzellen eine relativ hohe CO₂-Konzentrationen in den Bündelscheidenzellen der Pflanze erzeugen. Somit wird die Oxygenase-Reaktion der RubisCO, sowie der damit verbundene Wasser- und Energieverlust der Pflanze reduziert (Heldt, 2008).

Die Bildung besonders dickfleischiger Blätter mit stark verdickten, äußeren Zellwänden, die Auflagerung einer Cutin-, sowie einer Wachsschicht auf die Cuticula, oder die Anzahl der Stomata, deren Einsenkung in das Blatt, sowie die Bildung von Trichomen um die Spaltöffnungen stellen weitere Anpassungen von Pflanzen an aride Bedingungen dar, um den Wasserverlust der Pflanze zu verringern (Lüttge, 2005).

C₃-Pflanzen sind dahingegen besser an kältere Temperaturen angepasst und können je nach Pflanzenart lange Frostperioden und Temperaturen selbst unter -40°C überleben. Voraussetzung für die Frosttoleranz einer Pflanze ist allerdings eine Kälteakklimatisierung. Hierbei sind Pflanzen Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes ausgesetzt, welche den widrigeren Kältebedingungen mit Temperaturen unter dem Gefrierpunkt vorausgehen. Während der Akklimatisierung finden mehrere Prozesse im Metabolismus der Pflanzen statt,

welche diesen das Überleben bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ermöglichen. Zu diesen gehören unter anderem die Stabilisierung der Zellmembranen, die Akkumulation von Osmolyten, sowie die Veränderung der Genexpression der Pflanze (Buchanan, 2000).

Durch die Integration von Sterolen und Cerebrosiden, sowie die Veränderung der Phospholipid-Komposition der Membranen wird dabei die Fluidität dieser aufrechterhalten (Silva *et al.*, 1977). Die Akkumulation von protektiven Intermediaten wie z.B. Prolin oder Glycinbetain, sowie die Synthese von Dehydrin-Proteinen (DHNs) und kälteregulierten Proteinen (CORs) dient dem Schutz und der Stabilisierung von Membranen und verhindert die Bildung von Eiskristallen in der Zelle (Janská *et al.*, 2009; Iba *et al.*, 2002). Die Synthese von Fructanen (Livingston *et al.*, 2005), sowie die Akkumulation organischer Verbindungen, wie z.B. Sacchariden (Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*, 2011; Klemens *et al.*, 2014) unterbindet die Formation und Adhäsion von Eiskristallen und den damit einhergehenden Aufschluss der Zelle (Hare *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003; Gusta *et al.*, 2004).

Über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wird die Neusynthese Stress-spezifischer und Stress-unspezifischer Proteine induziert (Ishitani *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003). Da eine Temperaturabsenkung unter den Gefrierpunkt aufgrund des gefrierenden Wassers in der Umgebung der Pflanze ebenfalls zu einer erniedrigten Wasserverfügbarkeit führt, wird durch die Akkumulation von Osmolyten weiterhin das Wasserpotential in der Pflanze gesenkt, um dem mit einhergehenden Trockenstress entgegen zu wirken. Da in Folge von Trockenstress, Salzstress und/oder osmotischem Stress zumeist auch sekundäre Stressfaktoren miteinhergehen, sind viele der genannten Stressantworten nicht spezifisch, sondern übergreifend bei vielen der genannten Stressbedingungen zu finden (Hare *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2007).

Ähnlich verhält es sich ebenfalls bei einer Azidifizierung des Bodens. Diese bewirkt eine Solubilisierung von Aluminium-Ionen in der Rhizosphäre, welche daraufhin über den Wasserstrom von der Pflanze aufgenommen werden. Da eine toxische Aluminium-Konzentration somit durch Protonenstress bedingt wird, stehen multiple Gene, welche an der Antwort beider Stresssituationen involviert sind, unter der Kontrolle der gleichen Transkriptionsfaktoren (Sawaki *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013).

1.3 Transport von Malat und Citrat über die Membranen

Während der Transport kleinerer Moleküle und Gase über die Zellmembranen durch Diffusion entlang eines Gradienten möglich ist, müssen größere und/oder geladene Moleküle mit Hilfe von membrandurchspannenden Transportproteinen über die Membranen der verschiedenen Zell-Kompartimente transportiert werden. Hierbei kann zwischen mehreren Transportmechanismen unterschieden werden. Proteine, welche einen Kanal oder eine Pore durch die

Membran bilden und den Transport spezifischer Substrate durch die Membran ermöglichen, nennt man Translokatoren. Diese lassen sich unterteilen in Uniporter, Antiporter und Symporter. Uniporter erleichtern die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten durch die Membran. Ist dieser Transport an den Gegentausch eines anderen Substrats gekoppelt, spricht man von einem Antiport, der Transport zweier unterschiedlicher Substrate in gleiche Richtung durch die Membran wird als Symport bezeichnet. Beinhaltet ein solcher Transportmechanismus den Austausch einer Netto-Ladung, so wird der Transport als elektrogen bezeichnet. Weiterhin gibt es noch primär und sekundär aktive Transportmechanismen, welche direkt oder indirekt an eine (photo-)chemische Reaktion gekoppelt sind. Beispiele für primär aktive Transportproteine sind die vakuoläre H⁺-ATPase (V-ATPase), sowie die plasmamembranständige H⁺-ATPase (P-ATPase), welche den Transport von Protonen in die Vakuole bzw. den Apoplasten durch die Hydrolyse von ATP energetisieren (Kluge *et al.*, 2003; Haruta *et al.*, 2012). Dadurch wird ein elektrochemischer Gradient über die Membran erzeugt. Der daraus resultierende Protonengradient, sowie das elektrische Potential können genutzt werden, um den sekundär aktiven Transport von Soluten und Ionen entgegen deren Konzentrationsgradienten zu ermöglichen (Buchanan, 2000).

Aufgrund der sehr großen Anzahl an primären und sekundären Stoffwechselmetaboliten existiert eine Vielzahl von Proteinen, die den spezifischen oder unspezifischen Transport dieser Substanzen ermöglichen. Eine Reihe dieser Translokatoren konnte in den letzten Jahren charakterisiert werden, viele weitere Transportproteine sind allerdings noch gänzlich unbekannt oder unzulänglich beschrieben. Wegen ihrer Funktion als Speicherorganell für viele dieser Stoffwechselintermediate ist die Vakuole entscheidend für die Kompartimentierung und Mobilisierung dieser Substanzen. Sie nimmt dabei zwischen achtzig und neunzig Prozent des Zellvolumens ein. Weiterhin ist sie aufgrund der hohen Konzentration an Soluten mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Zellurgors, sowie für die Endlagerung toxischer Verbindungen und nicht verwertbarer Stoffwechselprodukte (Marty, 1999; Winter *et al.*, 1994).

Malat und Citrat liegen ebenfalls überwiegend in den Vakuolen der Pflanzenzelle vor (Szecowka *et al.*, 2013). Der Transport beider Carboxylate über den Tonoplasten wurde deshalb bereits an mehreren Pflanzenspezies untersucht (Martinoia *et al.*, 1985; Oleski *et al.*, Hurth *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2009). Mittels „patch-clamp“ Analysen an isolierten Vakuolen aus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass sowohl ein Malateinwärtskanal, als auch ein Malatauswärtskanal in der vakuolären Membran vorliegen (Iwasaki *et al.*, 1992; Angeli *et al.*, 2013). Bisher wurden in *A. thaliana* zwei Transportproteine charakterisiert, welche den Import von Malat in die Vakuole ermöglichen, der ALMT9 (aluminium-activated malate transporter 9; Kovermann *et al.*, 2007), sowie der TDT (tonoplast dicarboxylate transporter;

Emmerlich *et al.*, 2003). Für letzteren gibt es erste Hinweise, dass dieser auch am Export von Malat aus der Vakuole beteiligt sein könnte (Hurth *et al.*, 2005).

Der Importmechanismus von Citrat konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden, allerdings konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Citrat als Trianion in Form von Citrat³⁻ in die Vakuole transportiert wird, Malat hingegen als Dianion in Form von Malat²⁻ in die Vakuole gelangt (Oleski *et al.*, 1987; Rentsch und Martinoia, 1991). Citrat wirkt weiterhin inhibierend auf den Import von Malat in die Vakuole. Zudem werden beide Transportmechanismen durch das Ionophor Carbonylcyanid-*m*-Chlorophenylhydrazon (CCCP) gehemmt, der Transport ist demnach abhängig vom elektrochemischen Gradienten (Rentsch und Martinoia, 1991; Emmerlich *et al.*, 2003). In *Citrus sinensis* konnte weiterhin ein Transportprotein charakterisiert werden, welches den Export von Citrat während der Fruchtreife der Pflanze ermöglicht. Citrat wird hierbei einfach protoniert in Form von Citrate²⁻H aus der Vakuole transportiert (Shimada *et al.*, 2006).

Der Austausch von Malat, zwischen den Mitochondrien bzw. den Chloroplasten und dem Zytosol, erfolgt, wie bereits erläutert, über einen Translokator, welcher den Gegentausch mit Oxalacetat ermöglicht (Zoglowek *et al.*, 1988). Für Citrat existieren ebenfalls Transportproteine in der Innenmembran der Mitochondrien, die den Gegentausch mit anderen Dicarbonsäuren ermöglichen (Picault *et al.*, 2004).

Die Exsudation von Citrat und Malat über die Plasmamembran aus der Zelle erfolgt über Transportproteine aus der Familie der ALMT-Proteine, sowie der MATE-Proteine (multidrug and toxic compound extrusion proteins). Diese sind bei der Bildung der Rhizosphäre, der Mobilisierung von Nährstoffen aus dem Boden, sowie der Detoxifizierung schädlicher Substanzen im Boden von Bedeutung (Meyer *et al.*, 2009).

1.4 Vorarbeiten zum tonoplastidären Dicarboxylat Transporter (TDT)

Der tonoplastidäre Dicarboxylat Transporter wurde aufgrund seiner ähnlichen Aminosäuresequenz zu Proteinen der Solute Carrier Familie 13 (SLC13) des menschlichen Organismus entdeckt (Emmerlich *et al.*, 2003). Zwei dieser Proteine, NaS1 und NaS2 (Na(+)-sulfate cotransporter), sind für den Co-Transport von Sulfat mit Natrium über die Plasmamembran verantwortlich. Die drei weiteren Proteine, NaDC1, NaDC3 und NaCT (Na(+)-dependent dicarboxylate transporter; Na(+)-coupled citrate transporter), katalysieren den Natrium-abhängigen Transport von Di- und Tricarboxylaten über die Plasmamembran der Zelle (Pajor *et al.*, 2006). Der TDT weist hierbei die höchste Sequenz-Ähnlichkeit zum NaDC1 auf. Dieser ist in Zellen der menschlichen Niere lokalisiert und an der Resorption von Citrat-Zyklus Intermediaten bei der glomerulären Filtration beteiligt. Er ermöglicht den elektrogenen

Transport von Succinat²⁻, sowie den pH-abhängigen Transport von CitratH²⁻ durch den Symport mit drei Na⁺-Ionen (Pajor *et al.*, 1996).

Da zu diesem Zeitpunkt noch kein vakuolärer Malat-Transporter in *A. thaliana* identifiziert werden konnte, wurde der AtTDT aufgrund seiner Homologie zum NaDC1 untersucht. Mittels GFP-Lokalisationsstudien konnte eine Lokalisierung des Proteins im Tonoplasten von *A. thaliana* verifiziert werden. Anhand zweier unabhängig generierter k.o.-Mutanten wurde das Protein anschließend auf einen möglichen Transport von Di- und Tricarboxylaten analysiert. Diese zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen deutlich verringerten Malatgehalt. Mittels Aufnahmeversuche an isolierten Pflanzen-Vakuolen konnte ebenfalls ein verringerter Import von [¹⁴C]-markiertem Malat in die Vakuolen der k.o.-Pflanzen nachgewiesen werden. Der Import wurde zudem durch die Anwesenheit von Citrat inhibiert, eine verringerte Aufnahme von [¹⁴C]-markiertem Citrat in die Vakuolen der k.o.-Pflanzen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Emmerlich *et al.*, 2003). Weiterhin zeigten k.o.-Pflanzen einen erhöhten Citratgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Hurth *et al.*, 2005).

Mittels Northern-blot Analysen an Wildtyp-Pflanzen konnte ein erhöhter Transkriptgehalt des TDT unter aziden Bedingungen festgestellt werden. Isolierte Protoplasten aus k.o.-Pflanzen waren zudem anfälliger gegenüber einer Ansäuerung des Zytosols als Wildtyp Protoplasten. Da Malat an der Aufrechterhaltung des zytosolischen pH-Wertes beteiligt ist, wurde daher eine Export-Funktion des TDT postuliert (Hurth *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Verlauf dieser Dissertation wurden Pflanzen charakterisiert, die den tonoplastidären Dicarboxylat Transporter überexprimieren. Diese wurden im Vergleich zu Wildtyp-, bzw. k.o.-Pflanzen bezüglich ihrer Carboxylat Gehalte, sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Weiterhin wurde der Transporter erstmals heterolog in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert, um elektrophysiologische Transportstudien durchzuführen. Zusätzlich erfolgte die heterologe Expression des AtTDT in *Escherichia coli*. Die Reinigung des Proteins, sowie die anschließende Rekonstitution des Transporters in Proteoliposomen ermöglichte dessen biochemische Charakterisierung. Durch Aufnahmeversuchen mit [¹⁴C]-markiertem Substrat sollte eine pH-abhängige Aufnahme des Transporters untersucht, sowie dessen Substratspezifität weiter aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Ambion (USA), AppliChem (Darmstadt), BASF (Ludwigshafen), Bayer (Leverkusen), Biorad (München), Duchefa (Harlem, Niederlande), Fisher Scientific (Schwerte), Fluka (Neu-Ulm), GE Health Care (Mississauga, Canada) Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), MPB Biochemicals (Eschwege), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Göttingen), Qiagen (Hilden), Riedel de Haën (Seelze), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) oder Stratagene (Heidelberg) in höchstem Reinheitsgrad bezogen. Zur *in vitro*-Manipulation von DNA wurden Enzyme der Firmen Fisher Scientific (Schwerte) und NEB (Frankfurt) sowie selbst erzeugte Polymerasen verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurde stets deionisiertes Milli-Q Wasser verwendet.

2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

Nachfolgend sind die Methoden der Pflanzenanzucht, sowie physiologische Methoden und pflanzenspezifische Techniken beschrieben.

2.2.1 Pflanzenmaterial

Die in dieser Dissertation durchgeführten Analysen erfolgten an *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. der Varietät Wassilewskija (Tab. 2.1). Hierbei wurde sowohl mit Wildtyp-Pflanzen, als auch mit verschiedenen, transgenen Pflanzen gearbeitet. Die verwendeten Pflanzen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Pflanzen

Pflanze	Resistenz	Beschreibung
<i>Wassilewskija</i>	-	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp
<i>tdt1-1 / tdt1-2</i>	Kan ^R	TDT-Knockout-Linien (Emmerlich et al. 2003)
<i>P_{TDT}:GUS</i>	Basta ^R	Durch TDT-Promotor regulierte β -Glucuronidase, TDT-Promotor:GUS-Pflanzen (Hurth, 2005)
<i>Oex15 / oex24</i>	Kan ^R , Hyg ^R	Überexpression des <i>AfTDT</i> in <i>tdt1-1</i> <i>CaMV35S</i> -Promotor, OCS-Terminator (Wic, 2009; Frei, 2010)

2.2.2 Anzucht auf Erde

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf ED-73 Einheitserde (DIN 11540-80T). Um eine zeitgleiche Keimung der Samen zu gewährleisten, wurden die Samen nach der Aussaat für zwei Tage im Dunkeln bei 4°C inkubiert (Weigel und Glazebrook, 2002) und anschließend in einer Klimakammer, bei einer Temperatur von 23°C und einer Tageslänge von 10 Stunden unter Lichtintensitäten von 140 bis 160 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert.

2.2.3 Anzucht in Hydrokultur

Die Anzucht in Hydrokultur erfolgte nach Conn *et al.* (2013). Die Pflanzen wurden für zwei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert und anschließend in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 23°C und einer Tageslänge von 10 Stunden unter Lichtintensitäten von 140 bis 160 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Nach 5-7 Tagen erfolgte ein erster, gradueller Medienwechsel des Germination Mediums mit Standard Nutrient Solution über einen Zeitraum von drei Tagen. Während des fortwährenden Wachstums der Pflanzen wurde wöchentlich jeweils ein weiterer Medienwechsel mit Standard Nutrient Solution bis zur Ernte des Pflanzenmaterials durchgeführt.

Germination Medium:

Makroelemente:

0,75mM	CaCl ₂
1mM	KCl
0,25mM	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O
1mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,2mM	KH ₂ PO ₄

Mikroelemente:

50mM	NaFe(III)EDTA
50mM	H ₃ BO ₃
5mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O
10mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,5mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O
0,1mM	Na ₂ MoO ₃

Standard Nutrient Solution:

Makroelemente:

2mM	NH ₄ NO ₃
3mM	KNO ₃
0,1mM	CaCl ₂
2mM	KCl
2mM	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O
2mM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,6mM	KH ₂ PO ₄
1,5mM	NaCl

Mikroelemente:

50mM	NaFe(III)EDTA
50mM	H ₃ BO ₃
5mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O
10mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,5mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O
0,1mM	Na ₂ MoO ₃

2.2.4 Anzucht in Steril-Kultur

Um die Auswirkung bestimmter Substrate auf das Pflanzenwachstum unter einheitlichen Anzuchtbedingungen zu gewährleisten, wurden Pflanzen in Steril-Kultur angezogen. Die Pflanzen wurden hierfür auf Agar-Platten oder in sterilen Erlenmeyer-Schüttelkolben kultiviert. Zur Anzucht wurde, soweit nicht anders angegeben, 0,5 MS-Anzuchtmedium (Murashige und Skoog, 1962) verwendet.

0,5 MS Medium:

2,203 mg *l ⁻¹	Murashige & Skoog Medium (Duchefa)
1% (w/v)	Saccharose
0,05% (w/v)	MES
pH 5,7	KOH
0,8% (w/v)	Agar

2.2.5 Oberflächensterilisation der Samen

Die Anzucht in Steril-Kultur erfordert eine vorausgegangene Sterilisation der Samenoberfläche, um eine Kontamination des Mediums durch Mikroorganismen und Pilze zu verhindern. Hierzu wurde eine definierte Anzahl an Samen in ein Reaktionsgefäß mit 70-80% (v/v) Ethanol für 2min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Sedimentation der Samen (30s, 13.000rpm, Zentrifuge 5417R, Eppendorf), wurde der Überstand abgenommen und 1 ml Natriumhypochlorit (15% v/v) zu den Samen hinzugegeben. Unter Gelegentlichem Schütteln wurden die Samen für 10min inkubiert. Das Natriumhypochlorid wurde nach erneuter Zentrifugation (30s, 13.000rpm, RT) entfernt und die Samen wurden dreimal mit 1ml sterilem Milli-Q-Wasser gewaschen. Bis zur Verwendung wurden die Samen für mindestens 24h im Dunkeln bei 4°C stratifiziert.

2.2.6 Ernte und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Zur Quantifizierung von Metaboliten (Kap. 2.6.3 ff.) oder zur Isolierung von Gesamt-RNA (Kap. 2.4.9) wurde Pflanzenmaterial direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Pflanzenproben aus Steril-Kulturen wurden zuvor dreimal mit MES gepufferter Lösung (3mM MES, pH 5,7) gewaschen. Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials erfolgte mit flüssigem Stickstoff unter Verwendung von Mörser und Pistill. Alle Pflanzenproben wurden in 100 mg Aliquots abgewogen und bis zur Messung bei -70°C

gelagert. Für die Verwendung von getrocknetem Pflanzenmaterial wurden die Proben in einem Gefriertrockner (Christ, Osterode am Harz) für bis zu 48h lyophilisiert.

2.3 Mikroorganismen

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen, sowie deren Anzuchtbedingungen aufgeführt.

2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Mit Hilfe von *Escherichia coli* Zellen des Stammes XL1-blue (Bullock *et al.*, 1987) wurden Klonierungen und Vermehrungen der Plasmid Vektoren (Kap. 2.4.1) durchgeführt. Für die heterologe Expression des A β TDT wurden der *Escherichia coli* Stamm BLR (DE3) pLysS (Studier *et al.*, 1986) verwendet. In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Bakterienstämme und deren Resistenzen aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	Tet ^R	Klonierung und Amplifizierung von DNA	Bullock <i>et al.</i> 1987
<i>Escherichia coli</i> BLR (DE3) pLysS	Tet ^R , Cm ^R	Heterologe Expression des A β TDT	Studier <i>et al.</i> 1986

2.3.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* des Stammes XL1blue erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in selektivem YT-Medium (Sambrock *et al.*, 1989) bzw. nach erfolgter Transformation für eine Stunde in ψ B-Medium (Hanahan, 1983). Die Anzucht des Stammes BLR(DE3) pLysS zur heterologen Expression des A β TDT erfolgte unter gleichen Bedingungen in besonders nährreichen TB-Medium.

YT- Medium:

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

ψB-Medium:

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

TB-Medium:

1,2% (w/v)	Pepton
2,4% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,4% (v/v)	Glycerin

Agarplatten der entsprechenden Medien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Die Medien wurden bei 121°C für 20min autoklaviert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika (Tab. 2.3). Zur Aufbewahrung der rekombinanten Bakterien wurden Übernacht-Kulturen mit Glycerin (15% (v/v)) versetzt und bei -70°C gelagert.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampizilin (Amp)	200 µg*mlt ⁻¹
Chloramphenicol (Clm)	25 µg*mlt ⁻¹
Tetrazyklin (Tet)	10 µg*mlt ⁻¹

2.4 Molekularbiologische Methoden

Im Nachfolgenden sind die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden beschrieben, sowie die hierbei verwendeten Oligonukleotide und Plasmide aufgeführt.

2.4.1 Verwendete Vektoren und Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Konstrukte sind in Tabelle 2.4 aufgeführt:

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren und Konstrukte

Vektor/Konstrukt	Merkmale	Referenz
pBSK	Amp ^R , β-gal ⁺ , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pET16b	Amp ^R , Expressionsvektor, 10x Histidin-Tag	Novagen, Heidelberg
pGemHJ	Amp ^R , Oozytentransformationsvektor	
pBSK::A _f TDT	A _f TDT in pBSK	Diese Arbeit
pET16b::A _f TDT	A _f TDT mit integriertem Histidin-Tag in pET16b	Gasber (2007), diese Arbeit
pGemHJ::A _f TDT	A _f TDT mit integriertem HA-Tag in pGemHJ	Diese Arbeit

2.4.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide sind kurze, einzelsträngige DNA-Fragmente, die hier als Primer zur Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kapitel 2.4.5) und der quantitativen RT-PCR (Kapitel 2.4.13) verwendet wurden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Primer Sequenz (5'-3')
AtTDT-for	atgaacggtggtgatgtcg
AtTDT-rev	ctaaactcctcccattgatg
AtTDT-HA-for	naccattgaccatacagatgtccagattacgctaacggtggtga
UBQ10-for	ggcctgtataatccctgatgaataag
UBQ10-rev	aaagagataacaggaacgggaaacatagt
AtTDT-rt-for	ccgtcgaacactacaacatcc
AtTDT-rt-rev	gctgttggtggcgagatgc

2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Fähigkeit von Bakterienzellen fremde DNA aus der Umgebung aufzunehmen wird als Kompetenz bezeichnet. Der Prozess der Aufnahme von Fremd-DNA durch die Zelle wird als Transformation bezeichnet. Diese Aufnahme wird durch Behandlung der Bakterienzellen mit eiskalter CaCl_2 -Lösung verstärkt (Mandel und Higa, 1970). Zusätzlich kann die Transformationseffizienz durch Zugabe von Rubidiumchlorid gesteigert werden (Hanahan, 1983). Aus einer Übernachtskultur wurden *E. coli* Zellen in einem Verhältnis 1:100 in ΨB Medium angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert (10min, 5000rpm, 4°C), in 20ml TFB1-Lösung resuspendiert und erneut auf Eis inkubiert (10min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10min, 5000rpm, 4°C) wurde das Pellet in 2 ml TFB2-Lösung aufgenommen. Jeweils 120 μl der Zellsuspension wurden aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

TFB1 Lösung:

30mM	KCH_3CO_2
50mM	MnCl_2
100mM	RbCl
10mM	CaCl_2
15% (v/v)	Glycerin steril filtriert
pH 5,5	CH_3COOH

TFB2 Lösung:

10mM	MOPS
75mM	CaCl ₂
10mM	RbCl
15% (v/v)	Glycerin steril filtriert
pH 7,0	NaOH

2.4.4 Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

Die Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Hierfür wurde die Plasmid-DNA aus 1½ bis 3ml Übernachtskulturen unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.4.5 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter DNA-Abschnitte erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion = PCR) nach Saiki *et al.*, (1988). Als Polymerasen wurden hierbei selbst hergestellte Pfu- bzw. Taq-Polymerasen verwendet.

2.4.6 Restriktion von DNA

DNA-Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Fisher Scientific (Schwerte) und NEB (Frankfurt) entsprechen den jeweiligen Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.7 Gelelektrophorese, Extraktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 2001) wurde die DNA aufgetrennt und durch das Nucleospin® Gel and PCR Clean Up Kit (Macherey-Nagel, Düren) die entsprechenden Fragmente extrahiert. Diese wurden anschließend mit Hilfe der T4-Ligase (Fisher Scientific, Schwerte) in die gewünschten Vektoren (Tab. 2.3.1) ligiert.

2.4.8 DNA-Sequenzanalysen

Die Sequenzanalysen von PCR-Produkten, sowie von selbst hergestellten DNA-Konstrukten wurden durch die Firma Seq-IT (Kaiserslautern) vorgenommen.

2.4.9 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Identifizierung von homozygoten T-DNA-Insertionslinien erfolgte mittels PCR (Kapitel 2.4.5), wobei genomische DNA (gDNA) der untersuchten Pflanzen hierbei als Matrize diente. Die Isolierung der gDNA erfolgte nach der „simple DNA prep“-Methode der University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC), USA.

2.4.10 Isolation von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von RNA aus dem Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana* erfolgte aus in flüssigem Stickstoff geerntetem Pflanzenmaterial mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurde ein Verdau dieser mit RNase freier DNase (Macherey & Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.11 Synthese des ersten cDNA-Strangs

Die Synthese der „complementary“ DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers. Als Template für die cDNA-Synthese diente 1 µg der zuvor isolierten RNA (Kapitel 2.4.10). Die erhaltene cDNA wurde 1:10 verdünnt und als Template für RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.4.12 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von isolierter DNA bzw. RNA wurde mit einem NanoDrop® ND-1000 (Peqlab, USA) photometrisch bestimmt.

2.4.13 Quantitative RT-PCR

Für die Expressionsanalyse mittels quantitativer Reverse Transkriptase (RT)-PCR diente cDNA aus *A. thaliana* (Kapitel 2.4.11) als Template. Die Reaktion wurde mit Hilfe des iQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, München) gemäß den Angaben des Herstellers in Echtzeit am iCycler mit dem MyiQ Detection System (Bio-Rad, München) durchgeführt. Als Referenzgen wurde Polyubiquitin10 (*ubq10*, At4g05320) verwendet und der Transkriptgehalt des jeweilig zu untersuchenden Gens in Relation zu diesem normalisiert.

2.5 Heterologe Expression des AtTDT

Zur elektrophysiologischen sowie biochemischen Charakterisierung des tonoplastidären Malat-Transporters wurde dieser in *Xenopus laevis* Oozyten, sowie in *Escherichia coli* heterolog exprimiert.

2.5.1 Heterologe Expression des AtTDT in *Xenopus laevis* Oozyten

Die heterologe Expression des AtTDT und dessen elektrophysiologische Charakterisierung in *X. laevis* Oozyten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Xing-Zhen Chen und dessen Mitarbeitern an der *University of Alberta* in Edmonton, Kanada. Hierfür wurde die cDNA des AtTDT mittels des *forward*-Primers AtTDT-HA-for (Kap. 2.4.2), über eine PCR (Kap. 2.4.5), durch einen N-terminalen HA-Tag erweitert und in den Oozyten-spezifischen Vektor pGemHJ (Kap. 2.4.1) integriert. Durch die Restriktionsendonuklease *Sall* wurde der Vektor linearisiert und dessen cDNA-Matrize mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase in cRNA umgeschrieben. Die cRNA Synthese mittels *in vitro*-Transkription (mMessage mMachine™, Ambion, USA), sowie die anschließende Aufreinigung der cRNA mittels „RNeasy® MinElute™ Cleanup Kits“ (Qiagen, Hilden) erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Die cRNA wurde bei -70°C bis zur Injektion der Oozyten gelagert.

2.5.2 Expression der cRNA in *X. laevis*-Oozyten

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche wurden im „Biological Sciences Vivarium“ der *University of Alberta* gehalten und durch Immersion der Tiere in 0,2% tricaine methanesulphonate (pH 7,4; Sigma, Oakville, Canada) betäubt. Oozyten der Entwicklungsstufe V-VI wurden aus den Fröschen heraus operiert und mittels collagenase Behandlung der so gewonnenen Ovarien vereinzelt. Einzelne Oozyten wurden jeweils mit 10µl Wasser, welches 10ng cRNA-Transkript

enthielt, injiziert. Als Kontrolle dienten Oozyten, welche mit RNase-freiem Wasser injiziert wurden. Die Oozyten wurden für 4 Tage bei 18°C in Bath-Lösung inkubiert, welche täglich gewechselt wurde.

Bath-Lösung:

1mM	CaCl ₂
100mM	NaCl ₂
2mM	KCl
1mM	MgCl ₂
10mM	Hepes
pH 7,5	Tris

2.5.3 Elektrophysiologische Experimente

Die elektrophysiologischen Analysen an den Oozyten wurden in Bath-Lösung durchgeführt (pH 7,5). Bei Messungen unter sauren pH-Wert Bedingungen wurde dieser vor der Messung mit Salzsäure angepasst (pH 5,5-6,5). Strom- und Spannungsmessungen erfolgten durch klassische zwei-Mikroelektroden-voltage-clamp Techniken an einem Verstärker (TEV-200A) der Firma Dagan (Minneapolis, USA). Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas der Firma Warner Instruments (Hamden, USA) mit einem „micropipette puller“ (P-87) der Firma Sutter Instruments (Novato, USA) hergestellt. Diese enthielten 3M KCl-Lösung und wurden auf einen Widerstand von 0,5-3MΩ an deren Spitze eingestellt. Die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mithilfe des Digidata 1320A Konverter und der Software pClamp 9.2 der Firma Axon Instruments (Union City, USA). SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose, USA) wurde zur weiteren Daten Analyse wie der Datenaufzeichnung und -anpassung verwendet.

2.5.4 Western-blot und Immunofluoreszens

Die Western-blot Analysen der heterolog exprimierenden Oozyten erfolgte wie von Mahmood und Yang (2012) beschrieben über einen monoklonalen anti-HA Antikörper aus der Maus (cat# MMS.101P, Covance, Emeryville, USA). Als Kontrollprotein fungierte β-Actin, welches ebenfalls durch einen monoklonalen Antikörper aus der Maus (cat# sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) detektiert wurde. Die Lokalisierung in der Plasmamembran der Oozyten erfolgte über einen sekundären Cy3-konjugierten, anti-Maus Antikörper aus einem Esel (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Hierfür wurden die Oozyten an einem „Vectashield“ (Vector labs, Burlington, Canada) angebracht und mit einem „AIVI

spinning disc konfokal Mikroskop“ (Cell Imaging Faculty, Faculty of Medicine and Dentistry, *University of Alberta*, Canada) analysiert.

2.5.5 Heterologe Expression in *E. coli*

Die heterologe Expression des AfTDT erfolgte in *Escherichia coli* Zellen des Stammes BLR (DE3) pLyS (DE3) (Merck, Darmstadt), in denen der AfTDT über den Vektor pET16b inseriert wurde. Hierfür wurde eine Vorkultur bei 37°C in YT-Medium unter Selektionsbedingungen über Nacht angezogen und im Anschluss zum Überimpfen von sterilem TB-Medium in Kulturkolben mit Schikanen zur besseren aeroben Anzucht im Verhältnis 1:100 genutzt. Die Induktion der Expression des AfTDT erfolgte während des linearen Wachstums der Bakterien bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration). Nach einer Stunde Wachstum bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttler wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10min bei 4°C und 5000g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in Aufschlusspuffer solubilisiert und bis zur Aufreinigung der Membranen in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -20°C gelagert.

Aufschlusspuffer (AP-Puffer):

10mM	Tris
1mM	EDTA
10% (v/v)	Glycerin
pH 7,5	HCl

2.5.6 Aufschluss von *E. coli*-Zellen zur Isolation von Membranen

Zur Reinigung von integrierten, rekombinanten Membranproteinen wurden die in Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend nach Zugabe von PMSF (1mM Endkonzentration) und DNase (1µm/ml) unter permanenter Kühlung im Eiswasserbad sonifiziert. Die Sonifikation erfolgte mittels eines Ultraschallstabes (Bioblock Scientific, Danbury, USA) bei höchster Stufe und 50% Pulsdauer. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 20.000g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen zu sedimentieren. Die im Überstand verbliebenen Membranen wurden in einem Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000g für 30min bei 4°C sedimentiert und bis zur Solubilisierung der Proteine bei -20°C gelagert.

2.5.7 Solubilisierung und Reinigung von Membranproteinen mittels immobilisierter Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Die Reinigung des rekombinant exprimierten AfTDT mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) erfolgte über eine N-terminale Sequenzerweiterung in Form eines Histidin-Tags. Für die Reinigung wurde „Ni-Sephasore 6 Fast Flow“ der Firma GE Healthcare, München verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung der Imidazol-Gruppe des Histidin-Tags an die immobilisierten Nickel-Ionen der Nickel-Sepharose. Da Imidazol selbst wiederum stark an Nickel-Ionen bindet, ist es zum einen möglich, durch aufsteigende Konzentrationen von Imidazol, schwach gebundene Proteine von der Matrix zu lösen, während das zu reinigende Proteine aufgrund der stärkeren Bindung des Histidin-Tags an der Matrix gebunden bleibt. Eine ausreichend hohe Konzentration an Imidazol verdrängt jedoch auch die starke Bindung des poly-Histidin-Motivs an die Nickel-Ionen. Die bei -20°C gelagerten Membranen wurden zur Reinigung zunächst auf Eis aufgetaut und danach mit LS-Bindepuffer versetzt und per Ultraschall bei höchster Stufe und 50% Pulsdauer resuspendiert. Anschließend wurde zu dieser Membranemulsion ein Detergenz (DDM, 1% Endkonzentration) hinzugegeben und unter Rühren für 60min bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000g für 30min bei 4°C, bei dem nicht solubilisierte Proteine und Lipide sedimentiert wurden. Die gelösten Proteine und Lipide verblieben im Überstand. Dem Überstand wurde je nach Expression-Level des zu reinigenden Proteins Ni-Sepharose (1ml Ni-Sepharose/5-10mg Protein) hinzugegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C unter Rühren inkubiert. Die Trennung der an die Ni-Sepharose gebundenen Proteine von dem im Überstand verbliebenen Proteinen erfolgte über eine Säule mit Fritte („Econo-Pac-Chromatography-Column“) der Firma Bio-Rad (München). Schwach gebundene Proteine wurden hierbei mit 10 Volumen (gemessen an der Ni-Sepharose) LS-Bindepuffer und anschließend mit 6 Volumen LS-Waschpuffer entfernt. Die Elution erfolgte anschließend mit dem zweifachen Volumen LS-Elutionspuffer. Allen Puffer-Medien wurden zuvor mit entsprechenden Konzentrationen an Detergenz versetzt (0,5% DDM). Von allen Fraktionen der Reinigung wurden Proben genommen und deren Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

LS-Bindepuffer:

10mM	NaCl
20mM	Imidazol
50mM	Phosphat-Puffer
pH 7,9	NaOH

LS-Waschpuffer:

10mM	NaCl
20mM	Imidazol
50mM	Phosphat-Puffer
pH 7,9	NaOH

LS-Elutionspuffer:

10mM	NaCl
20mM	Imidazol
500mM	Phosphat-Puffer
pH 7,9	NaOH

Im Anschluss an die Reinigung konnte das im Eluat vorliegende Protein quantifiziert und für die Rekonstitution in Liposomen genutzt werden, um Transportstudien an Proteoliposomen durchzuführen.

2.5.8 Quantifizierung des Proteingehaltes

Der Gehalt des im vorherigen Kapitel beschriebenen, aufgereinigten Proteins wurde nach der Methode nach Bradford gemessen (Bradford, *et al.* 1976). Hierfür wurden 500 µl Bradford Reagenz mit H₂O und Proteinlösung gemischt (5-10µl Protein) um ein Gesamtvolumen von 1000µl zu erhalten. Das gleiche Volumen an LS-Elutionspuffer (mit Detergenz) wurde verwendet, um als Blank zu fungieren. Die Messungen erfolgten in einem BioPhotometer der Firma Eppendorf (www.eppendorf.com).

2.5.9 Rekonstitution von Transportproteinen in Proteoliposomen

Nach der Aufreinigung des eluierten Proteins wurden 50µL des Eluats mit einer homogenen Emulsion von 400µl L-α-Phosphatidylcholine (125mg/ml, type IV, Sigma), in TGL-Puffermedium gelöst, sowie mit 50µL des jeweiligen Substrats für die Beladung der Proteoliposomen gemischt und für 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurde das Gemisch in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Proteoliposomen wurden anschließend auf Eis aufgetaut und für 20 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Bioblock Scientific, Danbury, USA) bei geringem output und 50% duty cycle sonifiziert und auf eine NAP-5 Säule der Firma GE

Healthcare (München), welche dreimal zuvor mit TGA-Puffer äquilibriert wurde, aufgetragen, um externes Substrat herunter zu waschen. Im Anschluss wurden die Proteoliposomen mit 1000µL TGA-Puffer aus der Säule eluiert und für darauffolgende Transportstudien verwendet.

TGL-Puffer:

100mM	Hepes
30mM	Kaliumgluconat
pH 7,0	KOH

TGA-Puffer:

10mM	Hepes
150mM	Kaliumgluconat
pH 7,0	KOH

2.5.6 Transportstudien an rekonstituierten Proteoliposomen

Die Transportstudien an den rekonstituierten Proteoliposomen erfolgten durch die Zugabe von 100µL Proteoliposomen zu 100µl Aufnahme-medium unter ständigem Schütteln bei 30°C. Die Aufnahme des radioaktiven Substrats wurde durch das Überführen der Proben auf Anionen-Austauscher-Säulen (Dowex 1x8 Cl, 200-400 mesh, Sigma) gestoppt, und die Proteoliposomen im Anschluss mit 1500µl Tricine (200mM, pH 7,5) von der Säule herunter gewaschen. Die aufgenommene Radioaktivität konnte im Anschluss durch Zugabe von 4ml Szintillation-Cocktail in einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 2500 TR, Canberra Industry, USA) gemessen werden.

Aufnahmemedium:

100µM	Malat bzw. Citrat (in TGA-Puffer gelöst)
0,5 µCi/ml	[¹⁴ C]-Malat bzw. [¹⁴ C]-Citrat
pH 5,5; 7,0; 8,5	KOH

2.5.7 SDS-Page

Die Trennung von Proteingemischen wurde unter denaturierenden Bedingungen durch Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen „Mini-Protean 3“ Elektrophorese-Systemen (Bio-Rad, München), wobei die Gel-Größe 8 cm x 8 cm x 0,75 mm betrug und die Laufkammer mit einfach konzentriertem Laufpuffermedium gefüllt war. Es wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 3% im Sammelgel und 12% im Trenngel verwendet. Die Gele liefen im Sammelgel zunächst bei 100V konstanter Spannung, nach dem Einlaufen in das Trenngel wurde die anliegende Spannung auf bis zu 200 V erhöht. Zur Vorbereitung der verschiedenen Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese mit sechsfach konzentriertem SDS-Gelladepuffermedium versetzt. Zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse der aufgetrennten Proteine wurde als Referenz ein „Prestained Protein Marker Broad Range (6 -175 kDa)“ der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) aufgetragen.

Sammelgel:

3% (w/v)	Acrylamid
0,08% (w/v)	Bisacrylamid
125mM	Tris-HCl
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	TEMED
0,05% (w/v)	APS
pH 6,8	HCl

Trenngel:

12% (w/v)	Acrylamid
0,44% (w/v)	Bisacrylamid
300mM	Tris-HCl
0,08% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	TEMED
0,05% (w/v)	APS
pH 8,8	HCl

SDS-Laufpuffer:

25mM	Tris-HCl
192mM	Glycin
1% (w/v)	SDS
pH 8,3	HCl

SDS-Ladepuffer (6-fach):

375mM	Tris-HCl
60% (v/v)	Glycerin
0,3% (w/v)	SDS
1,5% (w/v)	Bromphenolblau
pH 6,8	

Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einer Färbelösung basierend auf dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue R-250 eine Stunde lang eingefärbt. Danach wurde das Gel so lange in Entfärbelösung inkubiert, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren.

Färbelösung:

0,4% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blue R-250
9% (v/v)	Essigsäure
45% (v/v)	Ethanol

Entfärbelösung:

9% (v/v)	Essigsäure
45% (v/v)	Ethanol

2.5.7 Western-blot und Immunofärbung

Nach der Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran (BioTrace NT; Darmstadt) mit einer Porengröße von 0,45µm transferiert. Dies geschah im „Wet-Blotting“-Verfahren in einem Mini-Tank Elektroblotter Modell VEP der Firma Peqlab (Erlangen). Die Proteine wurden bei 400mA für eine Stunde in Transferpuffermedium auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte die

Inkubation des Blots für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-Puffermedium mit 3% BSA (w/v), um die nicht durch Protein benetzten Bereiche der Membran zu sättigen. Der Nachweis des durch die heterologe Expression gebildeten Proteins erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen anti-polyhistidin-Antikörpers (Firma Sigma Aldrich, Deisenhofen). Dieser IgG-Antikörper ist gegen Epitope mit mehr als fünf Histidinen gerichtet und wurde 1:10.000 in TBS-Puffermedium mit 3% BSA (w/v) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT für mindestens 2 Stunden. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3 Waschschrte (10 min in TBS-, 10 min in TBST-, und 10 min TBS-Puffermedium) entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper (Konzentration 1:10.000 in TBS mit 3% (w/v) BSA), bei dem es sich um einen Anti-Maus-IgG handelte (Sigma Aldrich, Deisenhofen). Zum Test der Antikörperseren kam ein entsprechendes Anti-Kaninchen IgG (Sigma Aldrich, Deisenhofen) zum Einsatz. Zusätzlich ist dieser Antikörper mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert (Blake et al., 1984). Dieser Antikörper erkennt den primären Antikörper und ermöglicht dadurch den Nachweis des rekombinanten Proteins. Nach mindestens einstündiger Inkubation wurde überschüssiger Antikörper wie oben beschrieben von der Membran gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Inkubation in AP-Puffermedium, dem NBT und BCIP zugesetzt wurden, welche ein Substrat für die Alkalische Phosphatase darstellen. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag, gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauvioletttes Präzipitat. Die zunächst nur schwach gelbe Entwicklerlösung führt überall dort, wo die alkalische Phosphatase an die Proteine gebunden ist, zu einer blauviolettten Färbung. Die Reaktion wurde sofort nach dem Erscheinen von Banden durch Zugabe von Wasser abgestoppt.

Transfer-Puffer:

25mM	Tris
192mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
1% (w/v)	SDS
pH 8,3	HCl

TBS-Puffer:

20mM	Tris
150mM	NaCl
pH 7,5	HCl

TBST-Puffer:

20mM	Tris
150mM	NaCl
0,1% (v/v)	Tween 20
pH 7,5	HCl

AP-Puffer:

100mM	Tris
100mM	NaCl
5mM	MgCl ₂
pH 9,5	HCl

2.6 Biochemische und physiologische Methoden

2.6.1 Histochemischer Nachweis der β -Glucoronidase-Aktivität

Die Aktivität der β -Glucoronidase in *AfTDT-Promotor::GUS*-Pflanzen wurde durch einen histochemischen Färbenachweis bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen und Altersstufen der Pflanzen analysiert. Zum Nachweis der Reportergen-Aktivität wurde das zu untersuchende Pflanzengewebe mit dem synthetischen Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucoronid) infiltriert, welches nach oxidativer Kondensation und Spaltung einen blauen Farbniederschlag bildet. Dieser verbleibt unmittelbar am Ort der Entstehung. Die Intensität der Blaufärbung im Gewebe ist daher ein Maß für die GUS-Aktivität und somit ein Indikator für die gewebespezifische Aktivität des *AfTDT*-Promotors. Der Nachweis der GUS-Aktivität erfolgte nach Weigel und Glazebrook (2002). Nach Ernte verschiedener Gewebeproben und deren Überführung in 90% Aceton (gekühlt) folgte eine Inkubation für 20min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Aceton-Lösung verworfen und es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit Färbepuffermedium. Daraufhin wurden die Gewebeproben in Färbelösung aufgenommen, welche 2mM X-Gluc enthielt. Danach erfolgte die Infiltration des Gewebes mit der Lösung in

einem Exsikkator für 30min. Anschließend wurden die Proben für mindestens drei Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde daraufhin verworfen und die Proben für jeweils 30min in Ethanol-Lösungen aufsteigender Konzentration (25%, 35%, 50%, 75%) inkubiert. Die Lagerung der gefärbten Gewebeproben erfolgte in 75% Ethanol bei Raumtemperatur bis zur Dokumentation mit Hilfe des Stereomikroskops Leica MZ10F (Leica Camera AG, Solms).

Färbepuffermedium:

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

2.6.2 Extraktion von Carbonsäuren

Um den Gehalt von Carbonsäuren zu ermitteln wurden je 100mg gemörsertes Pflanzenmaterial in 1ml deionisiertem Wasser aufgenommen und gevortext. Die Proben wurden anschließend für 10min bei 95°C aufgeköcht, um die enthaltenen Enzyme zu inaktivieren. Danach wurden die Proben für 10min bei 20.000g zentrifugiert. Für die anschließenden Untersuchungen wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.6.3 Extraktion von Zucker

Um die Zucker aus dem Pflanzenmaterial zu extrahieren, wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 1ml versetzt und gevortext. Anschließend wurde das Gemisch für eine Stunde bei 95°C im Thermomixer gekocht und geschüttelt, um die enthaltenen Enzyme zu inaktivieren. Der Ansatz wurde für 10min bei 20.000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.6.4 Quantifizierung von Zuckern und Carbonsäuren

Die Konzentrationen von Zuckern und Carbonsäuren 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.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte die physiologische Bedeutung, sowie die biochemische Funktionsweise des tonoplastidären Dicarboxylat-Transporters (TDT) aus *Arabidopsis thaliana* weiterführend analysiert werden. Hierfür wurden TDT-Überexpressions-Pflanzen charakterisiert, um die Auswirkungen einer erhöhten Abundanz des Transportproteins auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersuchen zu können. Da in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass die TDT-Expression unter abiotischen Stressbedingungen, sowohl bei der zytosolischen Azidifizierung (Hurth *et al.*, 2005), als auch unter Trockenstress (Hurth, 2005, Frei 2010), osmotischem Stress (Wic, 2009) oder Kältestress (Schulze *et al.*, 2012) bei der Stressantwort der Pflanze modifiziert wird, wurden Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen ebenfalls spezifisch unter einigen der genannten Stressbedingungen untersucht.

Im zweiten Teil dieser Dissertation standen biochemische Analysen des Transportproteins im Vordergrund. Diese sollten weiteren Aufschluss über die Transporteigenschaften des TDT geben. Hierzu wurden Transportstudien an Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, sowie an Proteoliposomen, in denen das rekombinant synthetisierte Transportprotein in die Lipiddoppelschicht der Membran integriert wurde, durchgeführt, um die Substratspezifität und weitere Transporteigenschaften des Proteins aufzuklären.

3.1 Charakterisierung von *AfTDT*-Überexpressions-Pflanzen

Im menschlichen Organismus sind fünf Gene der SLC13 Familie (solute carrier family 13) vorhanden. Diese kodieren für plasmamembranständige Proteine, welche für den Co-Transport von Natrium mit Sulfat (Na(+)-sulfate cotransporter; NaS1 und NaS2), sowie für den Natrium-abhängigen Transport von Di- und Tricarboxylaten verantwortlich sind (Na(+)-dependent dicarboxylate transporter; NaDC1 und NaDC3; Na(+)-coupled citrate transporter; NaCT; Pajor *et al.*, 2006). In *Arabidopsis thaliana* konnte in vorangegangenen Arbeiten ein Gen identifiziert werden, welches hohe Ähnlichkeiten zu diesen Transportproteinen aufweist. Mittels GFP-Lokalisationsstudien konnte dessen Lokalisierung in der vakuolären Membran gezeigt werden, sodass dieses Protein als tonoplastidärer Dicarboxylat Transporter bezeichnet wurde. Insbesondere zu NaDC1, mit 65,6% ähnlichen und 38,4% identischen Aminosäuren, konnte eine hohe Homologie festgestellt werden. Dieser in der Plasmamembran menschlicher Nieren-Zellen lokalisierte Carrier ist an der Resorption von Citrazyklus-Intermediaten bei der glomerulären Filtration beteiligt (Pajor *et al.*, 1996).

Da zuvor noch kein vakuolärer Malat-Transporter im Tonoplasten von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden konnte, wurde der *AfTDT*, aufgrund der Homologie zum NaDC1, auf eine mögliche Beteiligung am Transport von Malat in die Vakuole hin untersucht (Emmerlich *et al.*,

2003). Anhand von Carbonsäure-Messungen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt der Dicarbonsäure Malat in k.o.-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen deutlich verringert ist. Durch Aufnahmeversuche mit [^{14}C]-markiertem Malat an isolierten Pflanzen-Vakuolen konnte zudem ein stark verringerter Import von Malat in die Vakuolen der k.o.-Pflanzen, im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, allerdings war ein geringer Import von Malat an isolierten Vakuolen der k.o.-Pflanzen weiterhin messbar. Ein Transport von Malat in die pflanzliche Vakuole ist demnach, wenn auch verringert, über Malat-Kanäle im Tonoplasten, wie z.B. den *AtALTM9* immer noch möglich (Meyer *et al.*, 2010).

Importstudien an pflanzlichen Vakuolen zeigten, trotz eines erhöhten Gehaltes der Tricarbonsäure Citrat im Blattgewebe der k.o.-Mutanten, keine veränderten Transportraten von Citrat über den Tonoplasten beider Genotypen (Hurth *et al.*, 2005).

Aufgrund dieser Akkumulation von Citrat in den k.o.-Pflanzen, und der gleichzeitigen Abnahme des Malatgehaltes, wurde postuliert, dass überschüssiges Malat über anaplerotische Stoffwechselwege in den Mitochondrien in Citrat umgewandelt wird, um einer Akkumulation im Zytosol entgegen zu wirken. Dieses kann weiterhin uneingeschränkt in die Vakuole importiert werden, was wiederum zu einem Anstieg des Citratgehaltes in den k.o.-Pflanzen führt. Trotz dieser Veränderungen im Metabolismus der Pflanzen konnten bis *dato* keine phänotypischen Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und k.o.-Pflanzen beobachtet werden.

Um die Bedeutung des *AfTDT* für den pflanzlichen Stoffwechsel detaillierter analysieren zu können, wurden TDT-Überexpressions-Linien generiert (Wic, 2006). Mittels Northern-blot Analysen wurde der erhöhte Transkriptgehalt in den Überexpressions-Pflanzen verifiziert. Zwei dieser unabhängigen Überexpressions-Linien, *Oex15* und *Oex24*, wiesen einen bis zu vierzigfach erhöhten Transkriptgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf (Frei, 2010).

In dieser Arbeit wurden die Malat- und Citratgehalte dieser Pflanzen, zusammen mit Wildtyp- und k.o.-Pflanzen, im diurnalen Verlauf bestimmt (Abb. 3.1). Die Carboxylatgehalte der k.o.-Linien *tdt1* und *tdt2* sind nahezu identisch, daher sind diese repräsentativ durch die k.o.-Linie *tdt1* in der Abbildung dargestellt.

Wie bereits zuvor gezeigt, sind bei den k.o.-Pflanzen verminderte Malatgehalte, bei gleichzeitiger Akkumulation von Citrat im Blattgewebe, im Vergleich zum Wildtyp, zu jedem gemessenen Zeitpunkt messbar. Der Malatgehalt steigt in beiden Genotypen während der Lichtphase an und nimmt während der Dunkelphase wieder ab. Citrat hingegen akkumuliert im Verlauf der Dunkelphase, während der Lichtphase nimmt der Citratgehalt wieder ab.

Im Vergleich dazu weisen beide Überexpressions-Linien gegenüber dem Wildtyp einen stark erhöhten Malatgehalt auf. Während der Wildtyp $6,2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ zu Beginn der Lichtphase und $18,8 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ Malat gegen Ende der Lichtphase aufweist, sind in den Überexpressions-Linien Malatgehalte von $20 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ zu Beginn der Lichtphase und $45 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ gegen

Ende der Lichtphase messbar. Die Überexpressions-Linien besitzen demnach zwischen zweieinhalb- bis vierfach erhöhte Malatgehalte im Vergleich zum Wildtyp.

Ähnlich zu den k.o.-Linien ist bei beiden Überexpressions-Linien ebenfalls ein reziprokes Verhältnis von Malat zu Citrat erkennbar. Allerdings zeigen beide Überexpressionslinien eine erhöhte Akkumulation von Malat bei gleichzeitig verminderten Citratgehalten. Während der Wildtyp im Verlauf der Dunkelphase Citratgehalte von bis zu $50 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ akkumuliert, welche innerhalb der Lichtphase auf $30 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ absinken, weisen beide Überexpressions-Linien zwei- bis dreifach erniedrigte Gehalte an Citrat auf.

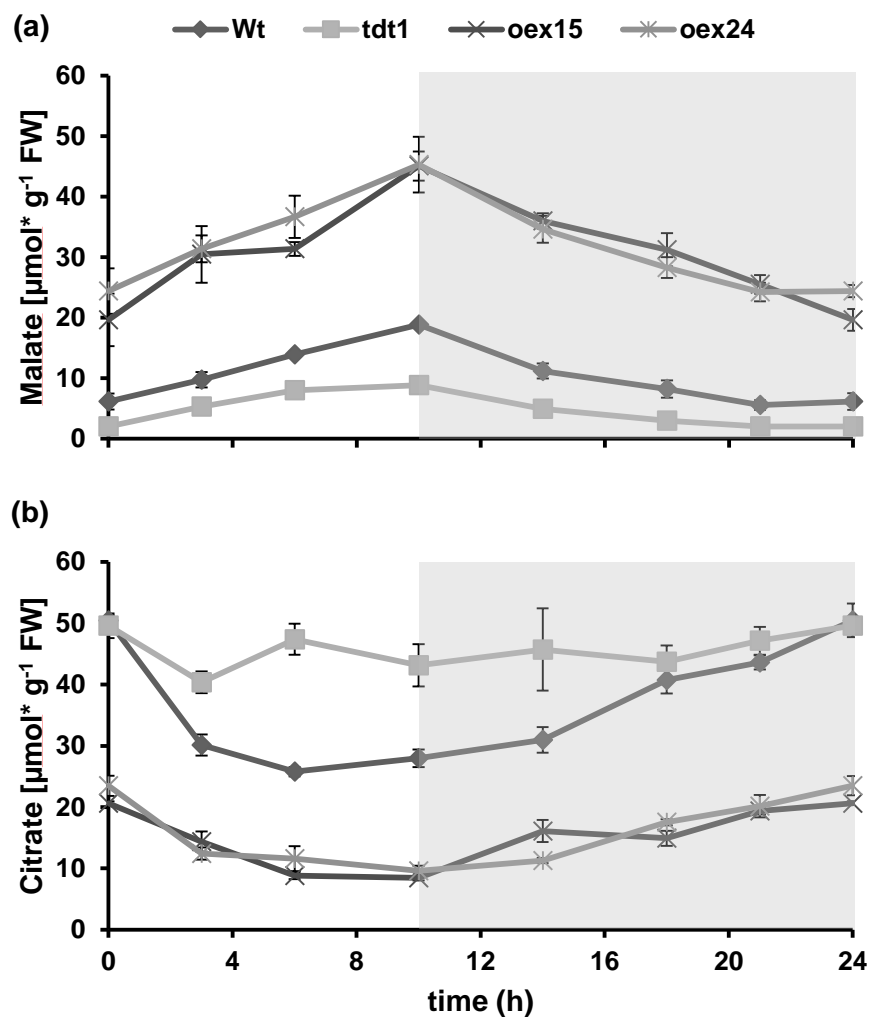


Abbildung 3.1: Malat- und Citratgehalte von Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen im diurnalen Tagesverlauf. Wildtyp-Pflanzen, k.o.-Pflanzen (*tdt1*) und TDT-Überexpressions-Pflanzen (Oex15 und Oex24) wurden fünf Wochen auf Erde unter Standardbedingungen kultiviert. Die Probenentnahme der Pflanzen erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils vier biologischen Replikaten \pm Standardfehler.

Ebenso wie die k.o.-Pflanzen, weisen die Überexpressions-Linien unter Standardbedingungen keine Wachstumsunterschiede zum Wildtyp auf. Aus diesem Grund wurden Wildtyp-Pflanzen,

k.o.-Pflanzen und TDT-Überexpressions-Pflanzen unter Stressbedingungen untersucht, bei denen die Gen-Expression des TDT nachweislich verändert wird.

3.2 Charakterisierung von AfTDT-Überexpressions-Pflanzen nach der Applikation von osmotischem Stress bzw. Trockenstress

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des AfTDT in Wildtyp-Pflanzen in verschiedenen Stresssituationen ändert. So konnte mittels Northern-blot Analysen und quantitativer real-time-PCR eine erhöhte Transkriptmenge des TDTs unter Trockenstressbedingungen nachgewiesen werden (Hurth, 2005; Frei, 2010). Weiterhin konnten anhand von Promotor-GUS-Analysen gezeigt werden, dass Pflanzen unter osmotischen Stressbedingungen eine verstärkte β -Glucuronidase-Aktivität aufweisen (Wic, 2009).

Aufgrund seiner osmotischen Wirksamkeit wird Malat vermehrt unter Bedingungen synthetisiert, welche mit einer verminderten Wasserverfügbarkeit einhergehen, um das Wasserpotential der Pflanze zu senken (Beck *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurden Wildtyp-Pflanzen, k.o.-Pflanzen und TDT-Überexpressions-Pflanzen unter osmotischen, sowie unter Trockenstressbedingungen kultiviert und deren Carboxylatgehalte analysiert (Abb. 3.2 f.).

Unter osmotischen Stressbedingungen ist, im Vergleich zu den jeweils korrespondierenden Pflanzen unter Standardbedingungen, in Wildtyp-Pflanzen, wie auch in Überexpressions-Pflanzen, eine deutliche Akkumulation von Malat im pflanzlichen Blattgewebe messbar. Der Malatgehalt ist im Pflanzengewebe der Überexpressions-Linien von $16 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FG}$, auf 36 bzw. $47 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FG}$, um das zwei- bis zweieinhalbfache erhöht. Der Wildtyp weist einen bis zu dreifach erhöhten Malatgehalt unter osmotischen Stressbedingungen auf. Reziprok weisen sowohl Wildtyp-Pflanzen, als auch Überexpressions-Pflanzen unter osmotischen Stressbedingungen einen verminderten Citratgehalt auf. Dieser ist bei Wildtyp-Pflanzen von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FG}$ auf $4,5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FG}$ gesunken, bei den Überexpressions-Pflanzen ist der Citratgehalt um etwa 50-75% reduziert. Interessanterweise zeigen die k.o.-Pflanzen, repräsentativ durch die k.o.-Linie *tdt1* dargestellt, ebenfalls eine geringe Akkumulation von Malat unter osmotischen Stressbedingungen, ein verminderter Citratgehalt ist hierbei jedoch nicht zu beobachten.

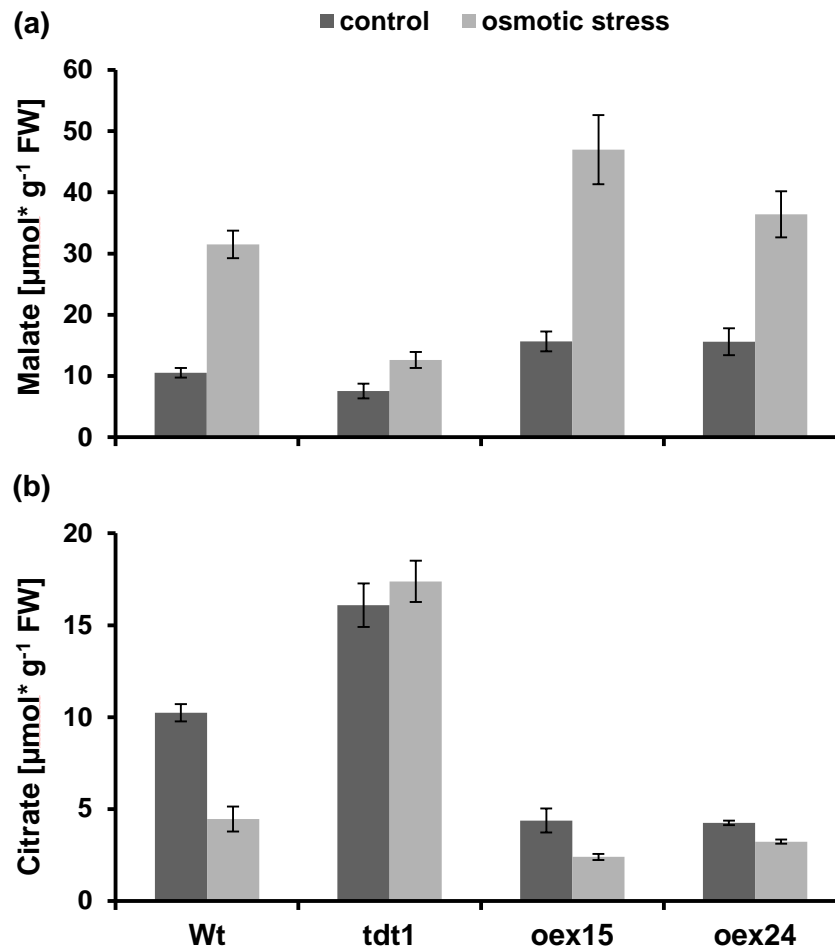


Abbildung 3.2: Malat- und Citratgehalte von Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen unter osmotischen Stressbedingungen. Wildtyp-Pflanzen, k.o.-Pflanzen (*tdt1*) und TDT-Überexpressions-Pflanzen (*Oex15* und *Oex24*) wurden jeweils vor der Stressapplikation unter Standardbedingungen angezogen. Die Aufzucht erfolgte in Hydrokultur, die Applikation des osmotischen Stress erfolgte nach drei Wochen Wachstum durch die Zugabe von Sorbitol (150mM) zum „Basal Nutrient Medium“ über einen Zeitraum von vier Tagen. Um eine Kontamination des Mediums durch Mikroorganismen zu verhindern wurde dieses täglich gewechselt. Die zugehörigen Kontrollproben wuchsen ohne die Zugabe von Sorbitol unter Standardbedingungen bis zur Probenentnahme weiter. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils sechs biologischen Replikaten \pm Standardfehler.

Um den reziproken Verlauf des Auf- und Abbaus von Malat und Citrat im diurnalen Verlauf zu berücksichtigen, erfolgten die Probenentnahmen jeweils zu Beginn der Licht- bzw. Dunkelphase. Da zu beiden Zeitpunkten jedoch die gleiche Tendenz zwischen Kontrollpflanzen und gestressten Pflanzen im Carboxylatgehalt zu erkennen ist, sind hierbei repräsentativ nur die Malat- und Citratgehalte zu Beginn der Dunkelphase dargestellt.

Unter Trockenstressbedingungen lässt sich ein ähnliches Verhalten der jeweiligen Genotypen, wie unter osmotischen Stressbedingungen beobachten. Wildtyp-Pflanzen und Überexpressions-Pflanzen weisen hierbei erneut eine stärkere Akkumulation von Malat, sowie einen zeitgleich stattfindenden Abbau von Citrat im Blattgewebe auf. Die Reduzierung des

Citratgehaltes in den Überexpressions-Pflanzen ist dabei allerdings nicht ganz so ausgeprägt, wie unter osmotischen Stressbedingungen. Ähnlich wie unter osmotischen Stressbedingungen lassen sich auch hier bei den k.o.-Pflanzen erneut nur geringe bis gar keine Unterschiede im Carboxylatgehalt der gestressten k.o.-Pflanzen zu den korrespondierenden Kontroll-Pflanzen feststellen. Weiterhin konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen festgestellt werden.

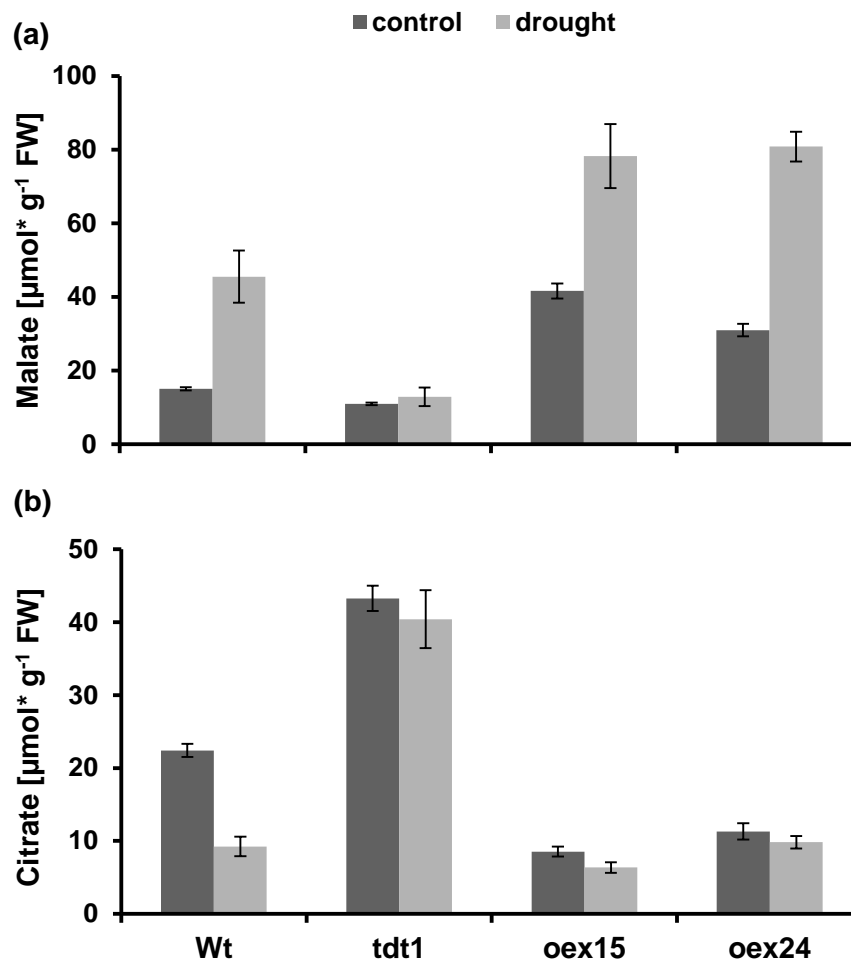


Abbildung 3.3: Malat- und Citratgehalte von Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen unter Trockenstressbedingungen. Die Aufzucht unter Trockenstressbedingungen erfolgte auf Erde, die Applikation des Trockenstress erfolgte nach zweieinhalb Wochen Wachstum, indem die Pflanzen jeweils für zwei weitere Wochen nicht mehr bewässert wurden. Die zugehörigen Kontrollproben wurden weiterhin bewässert. Die Probenentnahme der Pflanzen erfolgte jeweils zu Beginn der Lichtphase, sowie zu Beginn der Dunkelphase. Da zu den beiden jeweiligen Zeitpunkten die gleiche Tendenz zwischen Kontrollpflanzen und gestressten Pflanzen im Carboxylatgehalt zu erkennen war, sind hierbei repräsentativ nur die Malat und Citratgehalte zu Beginn der Dunkelphase dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils mindestens zehn biologischen Replikaten \pm Standardfehler.

3.3 Charakterisierung von *AfTDT*-Überexpressions-Pflanzen nach der Azidifizierung des Zytosols

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Transkriptgehalt des TDTs unter aziden Bedingungen erhöht ist. Dies wurde anhand von Blattscheiben festgestellt, welche unter zunehmend sinkendem pH-Wert im Dunkeln inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten hierbei Pflanzenproben, welche zu Beginn des Experiments am Ende der Lichtphase entnommen wurden (Hurth *et al.*, 2005). Zu diesem Zeitpunkt war allerdings noch nicht bekannt, dass sich der Transkriptgehalt des TDTs ebenfalls im diurnalen Verlauf ändert (Frei, 2010). Vor diesem Hintergrund wurde das Experiment wiederholt, um die Auswirkungen der veränderten Expression während der Licht- und der Dunkelphase im Zusammenhang mit der veränderten Expression während der Ansäuerung des zytosolischen pH-Wertes zu beobachten. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

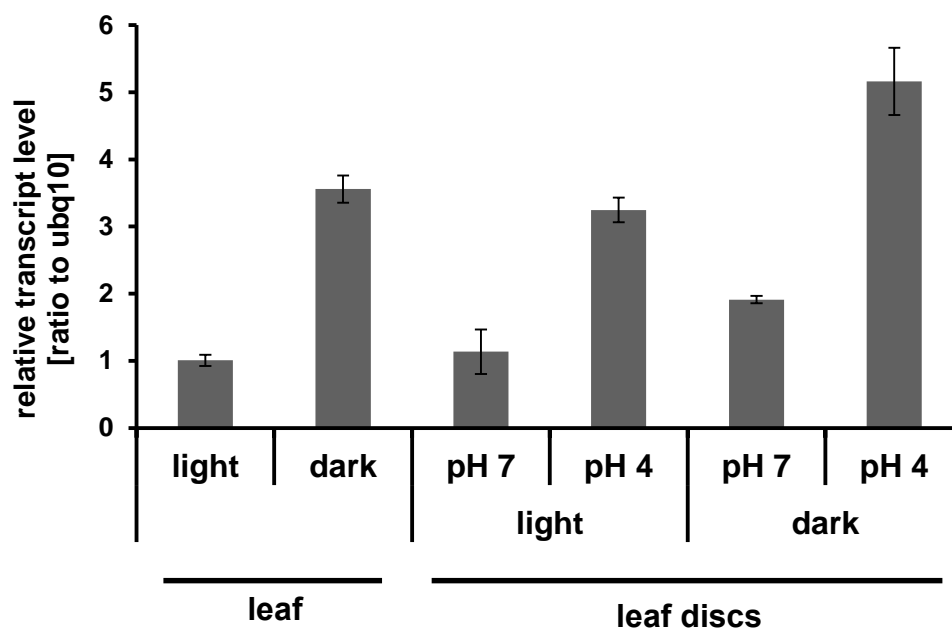


Abbildung 3.4: Änderung der relativen Transkriptmenge während der zytosolischen Ansäuerung jeweils zum Ende der Licht- bzw. Dunkelphase. Aus den Blättern von fünf Wochen alten Wildtyp-Pflanzen wurden jeweils zum Ende der Licht-, bzw. Dunkelphase Blattscheiben isoliert und bei verschiedenen pH-Werten (pH 4 und pH 7) im Dunkeln bzw. im Licht inkubiert. Anschließend wurde der relative Transkriptgehalt der Pflanzenproben ermittelt. Als Kontrolle dienten Blattproben, die jeweils zu Beginn der Licht-, bzw. Dunkelphase entnommen wurden. Die Ergebnisse sind auf das Referenzgen Polyubiquitin10 (*ubq10*) normalisiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils vier biologischen Replikaten \pm Standardfehler.

Wie zu erwarten, zeigen die Kontrollproben, welche jeweils zum Ende der Licht-, bzw. Dunkelphase entnommen wurden, einen Anstieg der Transkriptmenge im Verlauf der

Dunkelphase. Die Erhöhung des Transkriptgehaltes unter aziden Bedingungen konnte ebenfalls bestätigt werden. Blattscheiben, die in Medium mit pH 4 inkubiert wurden, weisen einen höheren Transkriptgehalt auf als solche, die in Medium mit pH 7 inkubiert wurden. Dies ist sowohl unter Bedingungen der Fall, in denen die isolierten Blattscheiben belichtet wurden, als auch unter Bedingungen, in denen die isolierten Blattscheiben im Dunkeln inkubiert wurden. Unter sauren Bedingungen findet demnach eine Erhöhung der Transkriptmenge statt, die nicht durch die Belichtung der Pflanze reprimiert wird. Diese Gen-Induktion unter aziden Bedingungen wird in unbelichteten Blattscheiben sogar noch verstärkt. Umgekehrt ist zu beobachten, dass die Inkubation der Blattscheiben unter neutralen Bedingungen in belichteten Blattscheiben ähnlich niedrig ist, wie unter Kontrollbedingungen zum Ende der Lichtphase. In unbelichteten Blattscheiben führt jedoch die Inkubation der Blattscheiben unter neutralen Bedingungen zu einer Repression der Genexpression (Abb. 3.4).

Vor dem Hintergrund dieser Daten wurde der Carboxylatgehalt von Wildtyp-, k.o.-, und Überexpressions-Pflanzen in Blattscheiben untersucht, die unter aziden und neutralen Bedingungen inkubiert wurden. Diese wurden während des Experiments belichtet, da der Transkriptgehalt unter diesen Bedingungen denen unter Standardbedingungen in Wildtyp-Pflanzen entspricht. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass sowohl der Malatgehalt, als auch der Citratgehalt in den Pflanzen unter aziden Bedingungen erniedrigt ist. Da die Pflanzenproben während des Versuchs belichtet wurden, synthetisieren diese in dieser Zeit Malat und bauen Citrat ab. Ein erniedrigter Malatgehalt impliziert deshalb, dass die Pflanzen unter aziden Bedingungen weniger Malat bilden, oder einen Teil des synthetisierten Malats unter diesen Bedingungen verbrauchen. Citrat wird dahingegen minimal stärker abgebaut.

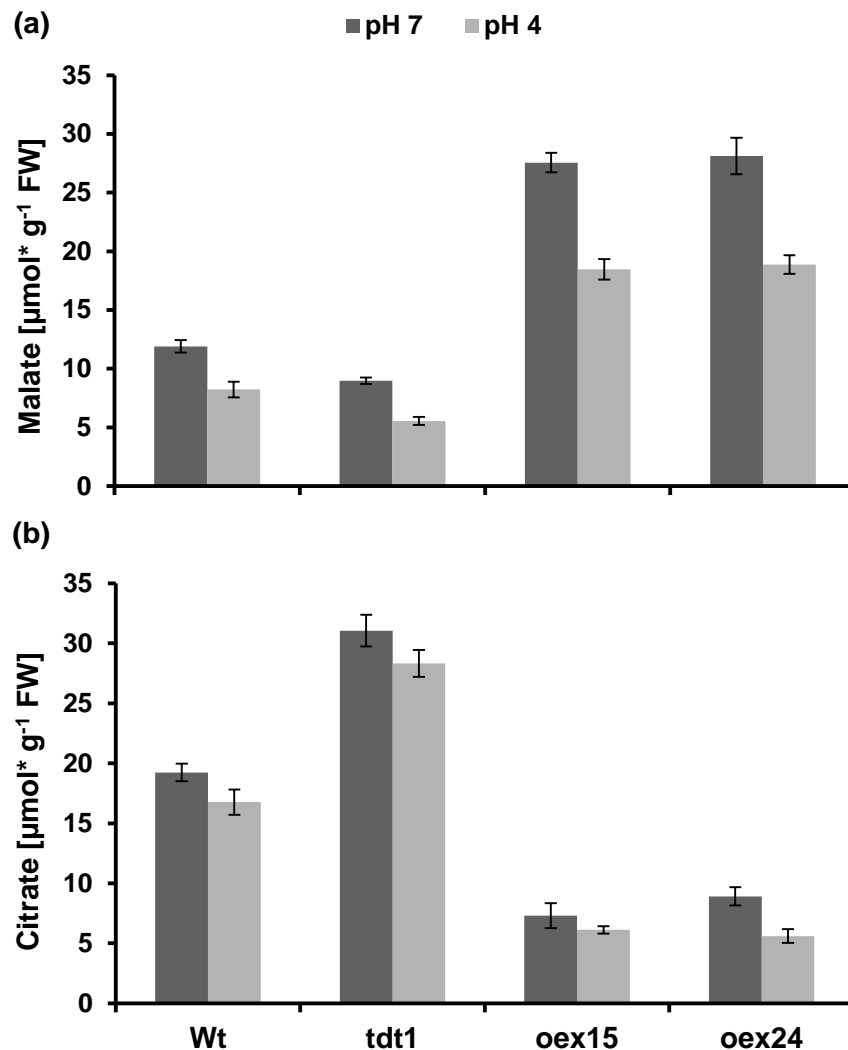


Abbildung 3.5: Malat- und Citratgehalte von Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen unter aziden Bedingungen. Wildtyp-Pflanzen, k.o.-Pflanzen (*tdt1*) und TDT-Überexpressions-Pflanzen (*Oex15* und *Oex24*) wurden fünf Wochen unter Standardbedingungen auf Erde kultiviert. Aus den jeweiligen Pflanzen wurden Blattscheiben isoliert und unter aziden Bedingungen in MES gepufferter Lösung über einen Zeitraum von acht Stunden inkubiert. Die zugehörigen Kontrollproben wurden unter neutralen pH-Wert Bedingungen inkubiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils vier biologischen Replikaten \pm Standardfehler.

3.4 Biochemische Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der tonoplastidäre Dicarboxylat Transporter nicht am Import von Citrat in die Vakuole beteiligt ist (Hurth *et al.*, 2005). Dennoch sind die Transportproteine der SLC13 Familie NaDC1, NaDC3 und NaCT des Menschen in der Lage, sowohl Di-, als auch Tricarbonsäuren zu transportieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Transport der Tricarbonsäure Citrat im Gegensatz zu dem Transport von Dicarbonsäuren pH sensitiv ist (Pajor *et al.*, 1996; Pajor *et al.*, 2006).

Aufgrund des reziproken Verhaltens von Malat und Citrat in Überexpressions-Pflanzen und k.o.-Mutanten unter Standardbedingungen, sowie dem alternierenden Auf- und Abbau beider Carbonsäuren unter Trockenstress- und osmotischen Stressbedingungen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, ob der tonoplastidäre Dicarboxylat Transporter bei der Mobilisierung von Citrat aus der Vakuole involviert ist.

Hierfür wurde die cDNA des *AfTDT* durch einen N-terminalen HA-Tag erweitert und in den Oozyten Expressions-Vektor pGemHJ kloniert. Dieser wurde mit *SaI* linearisiert. Über *in-vitro*-Transkription wurde die cRNA des Gens synthetisiert. Diese wurde in Oozyten injiziert und die Expression des Transporters nach drei Tagen Inkubationsdauer überprüft. Die nachfolgenden Experimente an den Oozyten erfolgten allesamt während eines Forschungsaufenthalts an der *University of Alberta* in Edmonton, Kanada, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Xing-Zhen Chen, wofür ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanke.

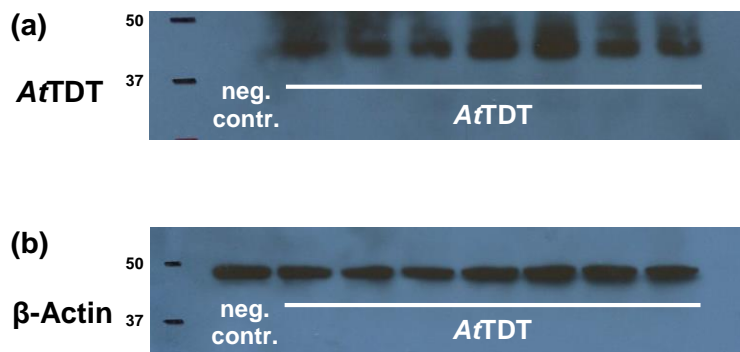


Abbildung 3.6: Western blot und Immunodetektion des *AfTDT* in Oozyten aus *Xenopus laevis*.

Oozyten wurden mit cRNA des tonoplastidären Dicarboxylat-Transporters aus *A. thaliana* injiziert, als negativ-Kontrolle dienten Oozyten, welche mit Wasser injiziert wurden. (a) Die Detektion des heterolog exprimierten *AfTDT* erfolgte über einen HA-Tag spezifischen Antikörper, sowie einen sekundären anti-mouse Antikörper mittels Chemilumineszenz und anschließender Exposition und Entwicklung eines Röntgenfilms. (b) Als Kontrollprotein diente β -Actin, welches über einen Actin-spezifischen Antikörper detektiert wurde.

Die Detektion des Transportproteins erfolgte über einen HA-Tag spezifischen Antikörper aus der Maus, sowie über einen sekundären anti-Maus-Antikörper. Durch die Zugabe eines Detektionsreagenz katalysieren diese zusammen eine chemische Reaktion, in deren Folge die Expression des Transportproteins durch die Entwicklung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann. In Abbildung 3.6a ist zu erkennen, dass Oozyten, welche mit cRNA des *AfTDT* injiziert wurden, ein deutliches Signal bei einer Größe von ca. 45 kDa aufweisen. Kontroll-Oozyten, welche mit Wasser injiziert wurden, zeigen hierbei kein Signal. β -Actin (Abb. 3.6b) mit einer Größe von nahezu 50 kDa konnte in allen injizierten Oozyten nachgewiesen werden.

Mittels Immunofluoreszenz war es weiterhin möglich, die Lokalisierung des Proteins in den Oozyten zu überprüfen. Hierfür wurde ein sekundärer Cy3-konjugierter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Durch die Emission von Indocarbocyanat-Konjugaten des Cy3-konjugierten Antikörpers bei 570nm Wellenlänge kann die Lokalisation des Transportproteins an einem konfokalen Mikroskop visualisiert werden.

In Abbildung 3.7 ist zu erkennen, dass Oozyten, welche mit *AfTDT*-cRNA injiziert wurden, nach der Inkubation mit dem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper eine deutliche Fluoreszenz an der Plasmamembran aufweisen. Oozyten, welche mit Wasser injiziert wurden, zeigen dagegen keine definierte Fluoreszenz, lediglich eine undefinierte Hintergrund-Fluoreszenz ist zu erkennen.

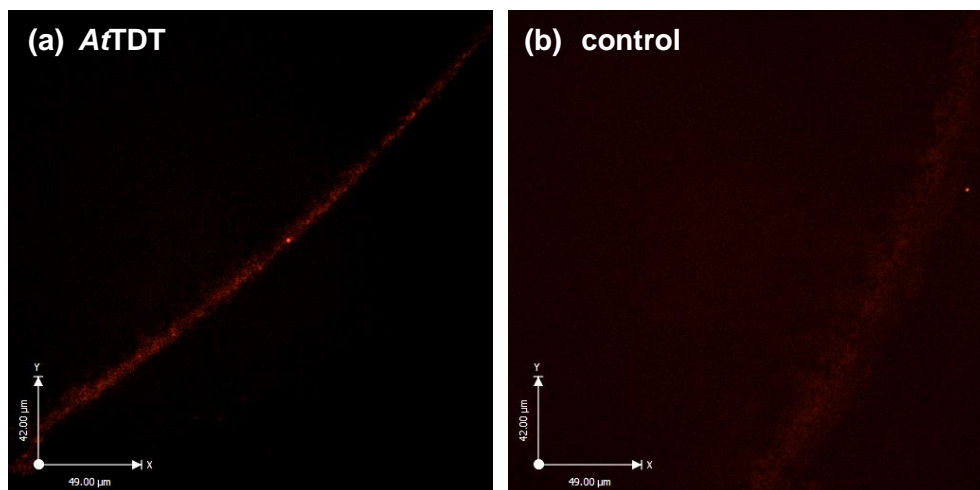


Abbildung 3.7: Lokalisation des *AfTDT* mittels Immunofluoreszenz in Oozyten aus *X. laevis*. Die Lokalisation und Detektion des *AfTDT* in der Plasmamembran von Oozyten erfolgte durch einen monoklonalen HA-Antikörper über einen eingefügten HA-Tag am N-terminalen Ende des Proteins. Mittels eines sekundären Cy3- konjugierten Anti-HA Antikörpers aus einem Esel wurde über die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers die Lokalisation an einem „Vectashield“ mittels eines „AIVI Spinning-Disc“ konfokal Mikroskops sichtbar gemacht.

3.5 Elektrophysiologische Analysen zum *AfTDT*

Mittels Immunodetektion, sowie Immunofluoreszenz konnte, wie in Abbildung 3.6 und 3.7 gezeigt, sowohl die Expression des *AfTDT*, als auch dessen Lokalisation in der Plasmamembran injizierter Oozyten nachgewiesen werden. Diese konnten somit genutzt werden, um einen Transport von Citrat über die Membran zu überprüfen. Hierfür wurden Oozyten mittels zwei-Mikroelektroden „voltage-clamp“ Technik „gepatched“ und mit Bath-Lösung umspült. Diese wurde sowohl ohne, als auch mit Citrat-Lösung versetzt (5mM Endkonzentration). Da der TDT in den Oozyten in die Plasmamembran integriert wurde, ist

davon auszugehen, dass sich die Orientierung des Transportproteins im Vergleich zu dessen tonoplastidären Orientierung in der Pflanzenzelle umkehrt, da der zytosolisch orientierte Teil des Proteins gleich bleibt. Somit zeigt der Teil des Proteins, welcher *in vivo* dem Lumen der Vakuole zugewandt ist, in den Oozyten aus der Zelle heraus. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert der Bath-Lösung sowohl unter neutralen, als auch unter leicht aziden pH Bedingungen eingestellt, um die Auswirkungen einer Ansäuerung der Lösung auf die Aufnahme von Citrat zu beobachten. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

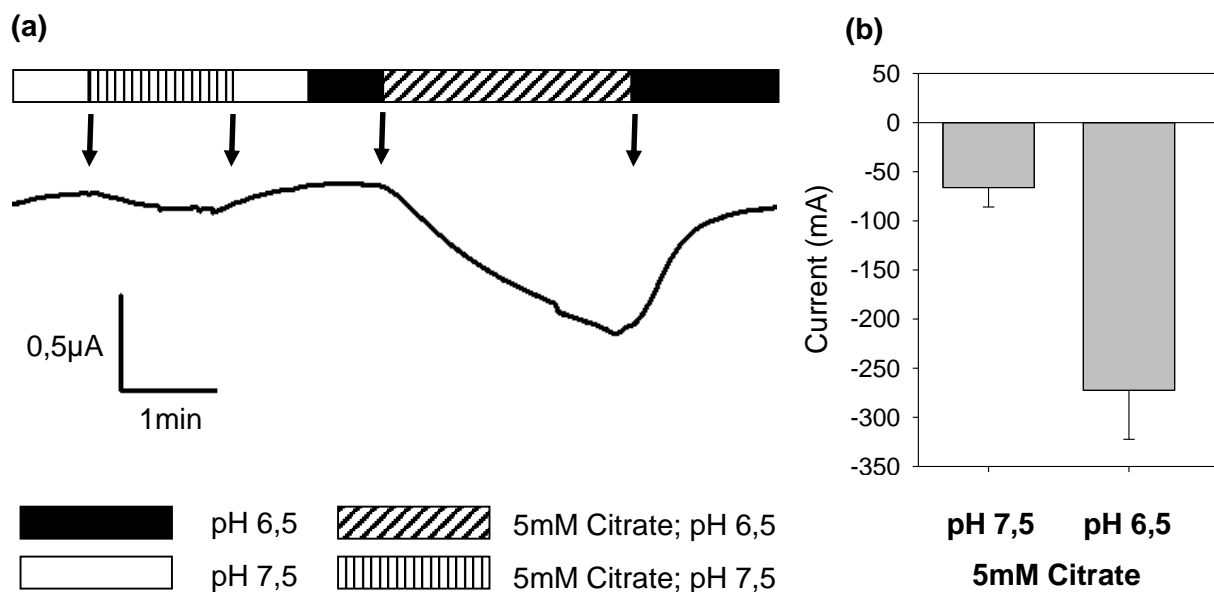


Abbildung 3.8: AfTDT-vermittelter Einwärts-Strom an Oozyten von *Xenopus laevis*. (a) Mittels zwei-Mikroelektroden „voltage-clamp“ Technik wurden Oozyten „gepatched“ und mit Bath-Lösung umspült. Diese wurde zuvor auf einen pH-Wert von 6,5 bzw. 7,5 eingestellt. Durch die Pfeile sind Zeitpunkte markiert, an denen zusätzlich Citrat (5mM) in der Lösung enthalten war. (a) Dargestellt ist eine repräsentative Messung. (b) Insgesamt wurden zwischen neun und elf Oozyten „gepatched“, die Mittelwerte \pm Standardfehler dieser Messungen sind ebenfalls dargestellt.

An den Oozyten lässt sich nach der Applikation von 5mM Citrat ein negativer Einwärts-Strom über die Membran messen. Dieser liegt bei ca. -60mA. Unter pH Bedingungen von 6,5 erhöht sich der an der Membran gemessene Strom von -60mA auf in etwa -260mA.

3.6 Transportstudien zum AfTDT an Proteoliposomen

Anhand der Oozyten-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Citrat einen elektrogenen Transport über die Membran ermöglicht. Hierbei ist allerdings nicht eindeutig, ob

es sich um einen Citrat-Import in die Zelle, oder um einen Gegentausch mit, bzw. einen Export von exogen vorliegenden Stoffwechselmetaboliten aus der Zelle handelt. Um zu verifizieren, ob der Translokator den Transport von Citrat über die Membran ermöglicht, wurde das Protein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, gereinigt und anschließend in Liposomen rekonstituiert. Der hierfür verwendete Bakterienstamm (Kap. 2.5.5 ff.) wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Trentmann zur Verfügung gestellt. Die Solubilisierung des Transportproteins mittels DDM wurde bereits in früheren Arbeiten optimiert (Gasber, 2007). Durch die Integration des Transporters in die Lipidmembran können über Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem Substrat Aussagen über den Transportmechanismus des Proteins getroffen werden. Der Vorteil dieses Systems gegenüber Oozyten ist hierbei die Möglichkeit, die Proteoliposomen mit definierten Mengen an spezifischen Substanzen zu beladen. Der Transport von exogen vorliegenden Stoffwechselmetaboliten kann somit ausgeschlossen werden. Aufgrund des reziproken Verhaltens von Malat und Citrat in k.o.- und Überexpressions-Pflanzen wurden Proteoliposomen generiert, die mit Citrat, Malat oder TGL-Puffer als Kontrolle vorbeladen wurden. Der pH-Wert in den Proteoliposomen wurde auf einen Wert von 7 genormt. Anschließend wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-markiertem Citrat, bzw. Malat in die Proteoliposomen quantifiziert. Der pH-Wert im Aufnahme-medium wurde hierbei variiert, um den Protonierungsgrad des angebotenen Substrats zu verändern. Die Ergebnisse der Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem Citrat über einen Zeitraum von 30 Minuten sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

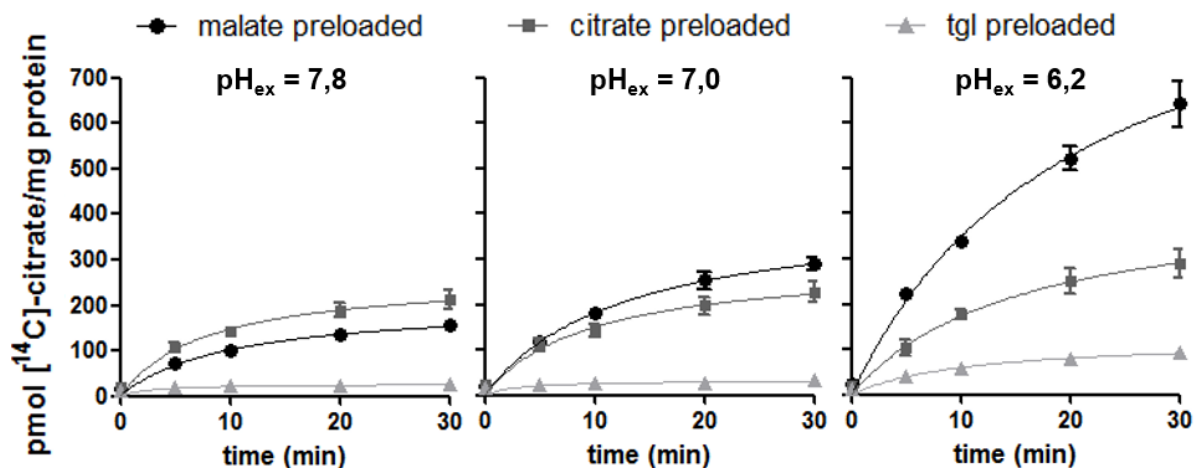


Abbildung 3.9: Zeitabhängige Aufnahme von [¹⁴C]-markiertem Citrat. Proteoliposomen wurden mit 5mM Malat, Citrat oder TGL als „Leer“-Kontrolle vorbeladen. Der pH-Wert in den Proteoliposomen (pH_{in}) wurde auf 7 genormt. Durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Citrat (Endkonzentration 50μM; pH_{ex} 7,8; 7,0; 6,2) wurde die Aufnahme über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils fünf unabhängigen Versuchen ± Standardfehler.

Sowohl an Proteoliposomen, die mit Malat, als auch an solchen, die mit Citrat vorbeladen wurden, ist eine Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat zu beobachten.

Die Aufnahme ist hierbei in Citrat-vorbeladenen Proteoliposomen nur wenig durch den extern vorliegenden pH-Wert verändert und beträgt in allen Versuchsreihen nach 30 Minuten zwischen 200 und 300 pmol/mg Protein. Die Aufnahme in Malat-vorbeladene Proteoliposomen ist dagegen deutlich durch den extern vorliegenden pH-Wert beeinflusst. Bei externen pH Werten von 7,8 werden nach 30 Minuten in etwa 160 pmol Citrat in die Proteoliposomen aufgenommen. Unter neutralen pH-Bedingungen werden ca. 300 pmol, unter aziden pH Bedingungen sogar mehr als 600 pmol Citrat/mg Protein aufgenommen. Interessanterweise ist unter gleichen Bedingungen auch eine gesteigerte Aufnahme von Citrat in nicht vorbeladene Proteoliposomen zu beobachten. Bei einem externen pH-Wert von 6,2 lässt sich in diese eine von 20pmol auf 100pmol/mg Protein gesteigerte Aufnahme von Citrat feststellen.

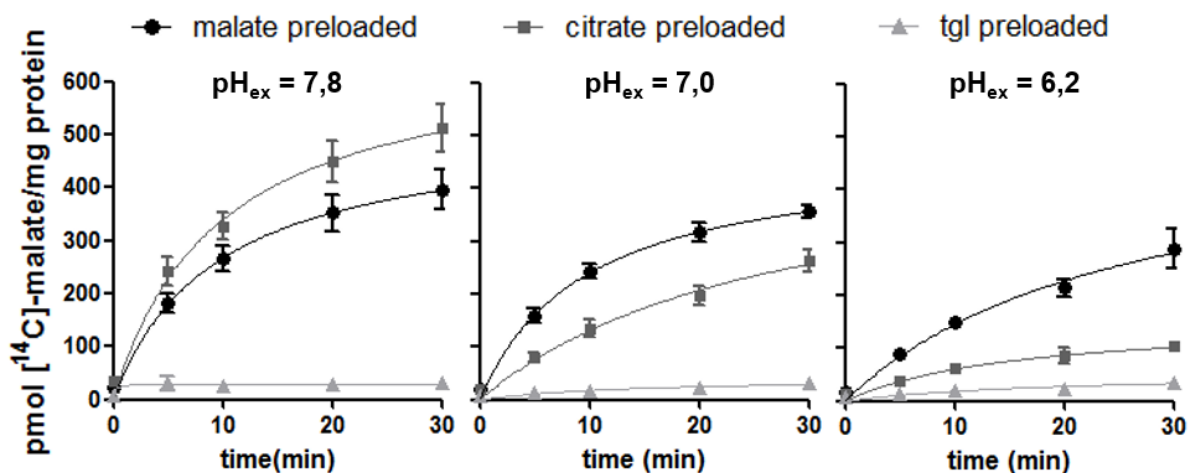


Abbildung 3.10: : Zeitabhängige Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -markiertem Malat. Proteoliposomen wurden mit 5mM Malat, Citrat oder TGL als „Leer“-Kontrolle vorbeladen. Der pH-Wert in den Proteoliposomen wurde auf 7 genormt. Durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Malat (Endkonzentration 50 μM ; pH 7,8; 7,0; 6,2) wurde die Aufnahme über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler.

Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Malat ist sowohl in Citrat-vorbeladene, als auch in Malat-vorbeladenen Proteoliposomen zu beobachten (Abb. 3.10). Diese ist bei einem externen pH-Wert von 7,8 am höchsten. Nach 30 Minuten werden in die Citrat-vorbeladenen Proteoliposomen 500 pmol Malat/mg Protein aufgenommen. Bei externen pH-Werten von 7,0 beträgt die aufgenommene Menge an Malat nur noch 260 pmol, bzw. 100 pmol unter externen pH-Bedingungen von 6,2.

In Proteoliposomen, welche mit Malat vorbeladen wurden, ist ebenfalls eine inhibierende Wirkung des zunehmend saureren pH-Wertes auf die Aufnahme von Malat zu erkennen. Diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, als in den Citrat-vorbeladenen Proteoliposomen. Nach 30 Minuten werden unter alkalischen Bedingungen in etwa 400 pmol Malat/mg Protein

aufgenommen. Unter neutralen Bedingungen werden in etwa 350 pmol Malat aufgenommen, unter aziden Bedingungen nur noch 290 pmol/mg Protein.

3.7 Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte des AfTDT

Die Aufnahmeversuche an Proteoliposomen zeigten, dass der AfTDT den Transport von Citrat und Malat über die Membran ermöglicht. Dieser Transport ist weiterhin beeinflusst vom pH-Wert im Aufnahmemedium. Der Citrat-Import ist unter aziden Bedingungen begünstigt, während der Malat-Import unter alkalischen Bedingungen erhöht ist. Zudem ist eine transstimulierende Wechselwirkung von Malat auf den Import von Citrat, sowie von Citrat auf die Aufnahme von Malat zu beobachten. Um die Transporteigenschaften des Proteins weiter aufzuklären, wurden Untersuchungen durchgeführt, welche die Aufnahme von Citrat, bzw. Malat in Abhängigkeit zur Substrat-Konzentration zeigen. Hierfür wurden Proteoliposomen mit jeweils 5mM Substrat vorbeladen und die Aufnahme in Abhängigkeit der Citrat-, bzw. Malat-Konzentration gemessen. In Anbetracht der Trans-Stimulation wurde dabei spezifisch die Aufnahme von Citrat in Malat-vorbeladene, sowie die Aufnahme von Malat in Citrat-vorbeladenen Proteoliposomen, in Abhängigkeit des externen pH-Wertes untersucht. Die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Aufnahmeuntersuchungen sind in Abbildung 3.11 abgebildet.

Ähnlich zu den Ergebnissen der zeitabhängigen Aufnahmeuntersuchungen ist erneut eine Abhängigkeit der Citrat-, sowie der Malat-Aufnahme in Relation zum externen pH-Wert zu erkennen. Unter alkalischen pH-Bedingungen werden etwa 6,2 nmol Citrat/mg Protein*h in die Proteoliposomen aufgenommen. Bei neutralen bzw. aziden pH-Werten erfolgt die Sättigung der Citrat-Aufnahme bei 9,8 bzw. 9,2 nmol/mg Protein*h. Bei externen pH-Werten von 6,2 ist hierbei die halbmaximale Geschwindigkeit der aufgenommenen Citrat Menge bei etwa 150µmol erreicht. Unter neutralen bzw. alkalischen pH-Werten ist diese bei in etwa 300 µM bzw. 365 µM erreicht.

Die transstimulierte Aufnahme von radioaktiv markiertem Malat in Citrat-vorbeladene Proteoliposomen erreicht unter alkalischen Bedingungen die höchste Konzentration an aufgenommenem Substrat von ca. 16,2 nmol/mg Protein*h. Unter neutralen bzw. aziden pH-Bedingungen ist eine geringere Aufnahme von [14 C]-Malat in die Proteoliposomen zu erkennen. Diese beträgt bei einem externen pH-Wert von 7,0 etwa 9,5 nmol/mg Protein*h, bei einem externen pH Wert von 6,2 beträgt diese nur etwa 7,7 nmol/mg Protein*h. Gleichermaßen beträgt der K_m -Wert unter alkalischen Bedingungen ca. 200µM, unter neutralen bzw. alkalischen Bedingungen beträgt die halbmaximale Geschwindigkeit an aufgenommenem Substrat hingegen ca. 440 µM, respektive 490 µM.

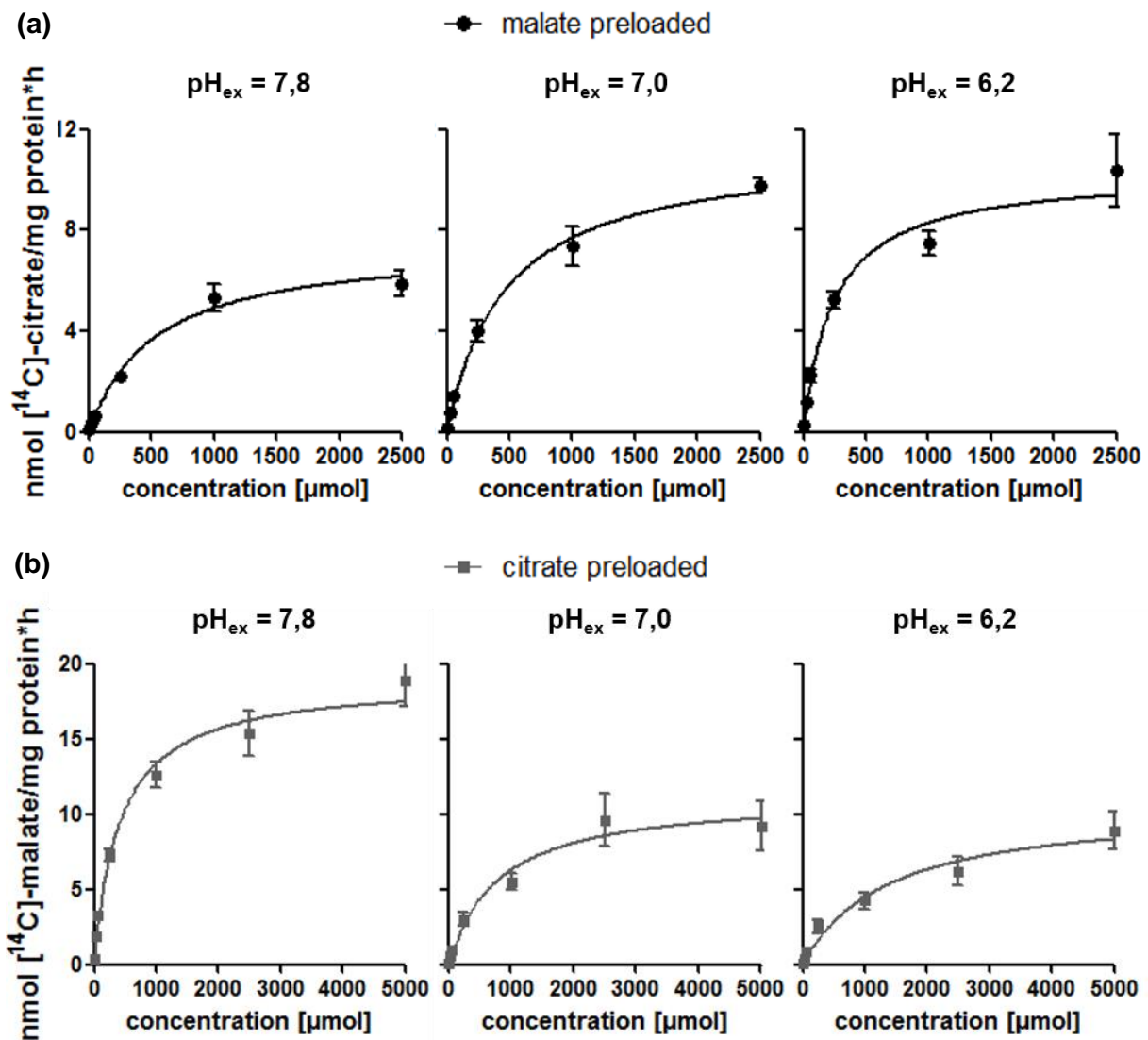


Abbildung 3.11: Konzentrationsabhängige Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat, bzw. Malat. Proteoliposomen wurden mit 5mM des jeweiligen Substrats vorbeladen. (a) Die Inkubation der mit Malat vorbeladenen Proteoliposomen erfolgte bei aufsteigenden Konzentrationen an ^{14}C -Citrat für drei Minuten. (b) Die Inkubation der mit Citrat vorbeladenen Proteoliposomen erfolgte unter aufsteigenden Konzentrationen an ^{14}C -Malat für drei Minuten. Die Aufnahmeuntersuchungen erfolgten unter extern variierenden pH-Werten von pH 7,8; 7,0 und 6,2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler.

Die aus den Konzentrationsabhängigen Aufnahmeuntersuchungen ermittelten K_m - und V_{max} -Werte sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: K_m - und V_{max} -Werte von Citrat und Malat in Abhängigkeit des externen pH Wertes.

pH external / internal	citrate uptake / malate preloaded		malate uptake / citrate preloaded	
	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg protein* h)	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg protein* h)
7,8 / 7,0	$363,7 \pm 30,51$	$6,2 \pm 0,37$	$197,8 \pm 12,59$	$16,2 \pm 0,64$
7,0 / 7,0	$303,2 \pm 16,69$	$9,8 \pm 0,38$	$443,0 \pm 46,20$	$9,5 \pm 0,68$
6,2 / 7,0	$158,0 \pm 10,37$	$9,2 \pm 0,40$	$488,9 \pm 46,76$	$7,7 \pm 0,51$

3.8 Import von [^{14}C]-Citrat in Abhängigkeit des pH Wertes

In Kapitel 3.6 f. konnte gezeigt werden, dass sowohl die Transportrate, als auch die Affinität des Citrat-Transportes vom extern vorliegenden pH-Wert beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden Aufnahmeuntersuchungen durchgeführt, welche den Import von Citrat in Proteoliposomen über ein breiteres Spektrum von pH-Werten zwischen 4,0 bis 7,0 zeigen. Weiterhin wurde die aufgenommene Menge an Citrat mit den vorliegenden Protonierungsformen verglichen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

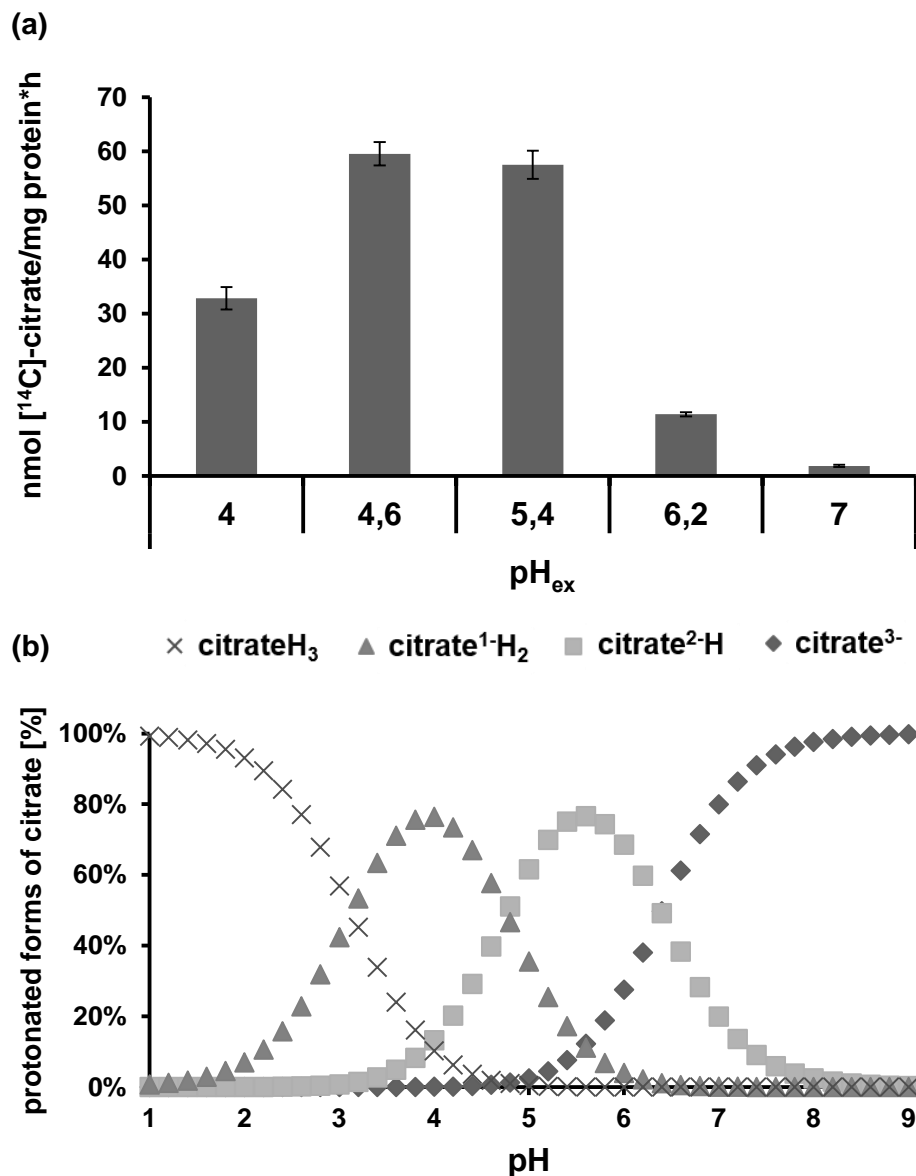


Abbildung 3.12: pH-abhängige Aufnahme von [^{14}C]-markiertem Citrat. Proteoliposomen wurden mit 50 μM Malat vorbeladen. Der pH-Wert in den Proteoliposomen (pH_{in}) wurde auf 7 genormt. (a) Durch die Zugabe von radioaktiv markiertem Citrat (Endkonzentration 50 μM ; pH_{ex} 7,0; 6,2; 5,4; 4,6; 4,0) wurde die Aufnahme über einen Zeitraum von 2 min gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler. (b) Berechnung der vorliegenden Protonierungsformen von Citrat in Relation zum pH-Wert mittels „CurTiPot“-Analyseprogramm.

Bei einem extern vorliegenden pH-Wert von 6,2 ist erneut ein erhöhter Import von Citrat im Vergleich zu neutralen pH-Bedingungen zu beobachten. Dieser ist von ca. 1,9 nmol/mg Protein^{*h} auf 11,4 nmol/mg Protein^{*h} um das Fünf- bis Sechsfache erhöht. Bei externen pH Werten von 5,4 und 4,6 ist eine weitere Steigerung des Citrat Imports auf 57,5 bzw. 59,5 nmol/mg Protein^{*h} zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 4,0 im Aufnahme-medium sinkt die Importrate wieder auf einen Wert von etwa 33 nmol/mg Protein^{*h} ab.

Weiterhin sind die jeweiligen Protonierungs-Formen von Citrat bei unterschiedlichen pH Werten dargestellt. Diese wurden mittels der „CurTiPot“ Microsoft Excel Kalkulationstabelle von Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz errechnet (Gutz, I. G. R., CurTiPot - pH and Acid-Base Titration Curves: Analysis and Simulation Freeware, Version 4).

Dabei wird deutlich, dass die dreifach protonierte Form von Citrat (CitratH₃) bei einem pH-Wert von 1,0 und niedriger nahezu die einzig vorliegende Form von Citrat ist. Bei steigendem pH nimmt die Abundanz von CitratH₃ zunehmend ab. Ab pH-Werten von 5,0 und höher sind letztlich weniger als 1% der dreifach protonierten Form von Citrat vorhanden.

Die zweifach protonierte Form des Citrats (Citrat¹H₂) liegt bis zu einem pH-Wert von 1,0 zu weniger als 1% vor. Bei einem zunehmend steigendem pH-Wert erhöht sich der Anteil von Citrat¹H₂ bis zu einem pH-Wert von 4,0, bei dem die zweifach protonierte Form 75% des Citrats ausmacht. Ab diesem pH-Wert ist ein erneuter Rückgang dieser protonierten Form zu beobachten.

Bei einem pH-Wert von 6,4 liegen weniger als 1% des Citrats in zweifach protonierter Form vor. Die einfach protonierte Form des Citrats (Citrat²H) verhält sich ähnlich zu der zweifach protonierten Form, allerdings sind Anstieg, Maximum und Abfall der einfach protonierten Form um etwa 1½ bis 2 pH-Einheiten ins alkalische verschoben. Die Konzentration an Citrat²H zeigt einen Anstieg ab einem pH-Wert von 3,0. Bei pH 5,6 liegen über 75% des vorliegenden Citrats in einfach protonierter Form vor. Bei pH-Werten über 5,6 ist ein Rücklauf der einfach protonierten Form des Citrats zu erkennen. Ab einem pH-Wert von 8,4 liegen erneut weniger als 1% des Citrats in zweifach deprotonierter Form vor.

Die dreifach deprotonierte Form von Citrat (Citrat³⁻) verhält sich reziprok zur dreifach protonierten Form. Ab einem pH-Wert von 4,8 ist ein stetiger Anstieg an dreifach deprotoniertem Citrat zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 6,4 liegen Citrat³⁻ und Citrat²H in nahezu gleichen Teilen zu knapp 50% vor. Bei alkalischeren pH-Bedingungen ist Citrat³⁻ die am meisten abundante Form und liegt ab einem pH-Wert von 8,4 zu über 99% vor.

Wird für die Transportrate von Citrat in die Proteoliposomen eine Gaußsche Verteilung angenommen, so lässt sich diese mit der Protonierung von Citrat in Abhängigkeit des pH-Wertes vergleichen (Abb. 3.13). Dabei wird deutlich, dass die Importrate einen ähnlichen Verlauf aufweist, wie die Verteilung des einfach protonierten bzw. zweifach protonierten Citrats. Somit lässt sich für den Import ein Maximum bei einem pH-Wert von etwa 5,0

postulieren. Die Transportrate korreliert demnach weder eindeutig mit der zweifach vorliegenden, noch mit der einfach vorliegenden Protonierungs-Form von Citrat, sondern liegt um in etwa eine halbe, bis eine pH-Einheit verschoben zwischen Citrat²⁻H und Citrat¹⁻H₂.

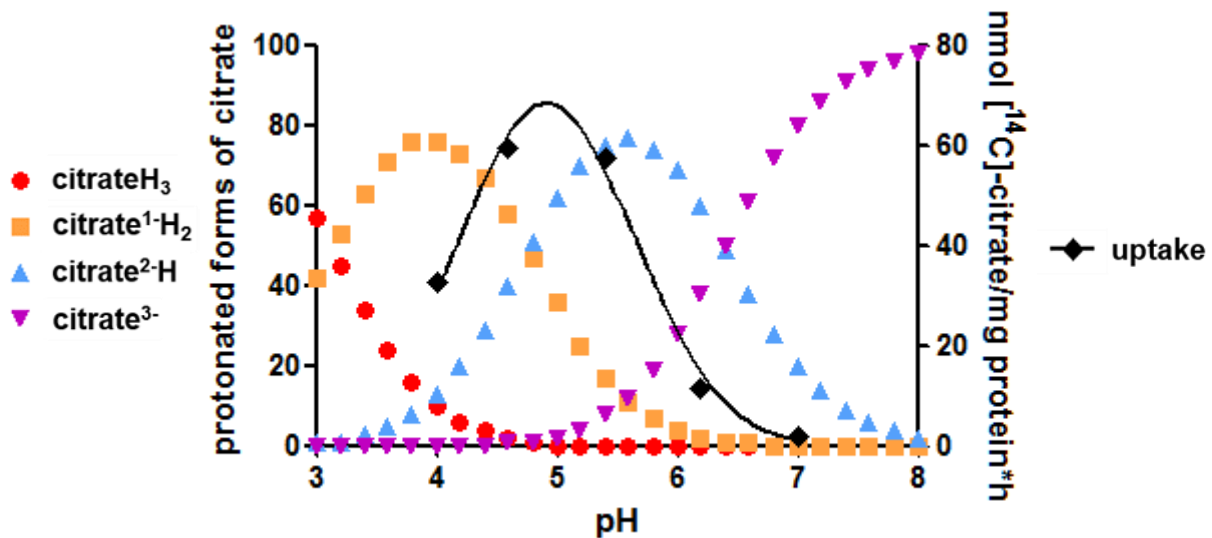


Abbildung 3.13: pH-abhängige Citrat Aufnahme in Relation zum Protonierungsgrad. Vergleich der in Abbildung 3.13 gezeigten pH abhängigen Protonierung in Relation zur pH abhängigen Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat. Für den Import von Citrat wurde eine Gaußsche Verteilung angenommen.

3.9 Bestimmung des Substratspektrums des AfTDT

In Kapitel 3.5 ff. konnte gezeigt werden, dass der tonoplastidäre Dicarboxylat Transporter in der Lage ist, sowohl Citrat, als auch Malat zu transportieren. Anhand der elektrophysiologischen Messungen an Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Transport von Citrat elektrogen ist. Eine pH-Sensitivität des Citrat-Transports konnte ebenfalls gezeigt werden. Weiterhin konnte an Proteoliposomen beobachtet werden, dass der Transport von Malat im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich begünstigt wird. Eine trans-stimulierende Wechselwirkung von Citrat auf den Malat-Import und *vice versa* konnte ebenfalls beobachtet werden. Die Summe dieser Ergebnisse deutet auf einen möglichen Gegentausch von Citrat und Malat durch den Transporter hin. Weiterhin konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass der Fumarat Gehalt in *tdt*-k.o.-Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp verringert ist (Hurth *et al.*, 2005).

Die Proteine der SLC13 Familie des Menschen sind zudem in der Lage, Succinat, sowie das Tetraoxyanionen Sulfat (SO₄²⁻) im Co-Transport mit Natrium zu transportieren (Pajor *et al.*, 2006). Aus diesen Gründen wurde der Citrat, sowie der Malat Import ebenfalls an Proteoliposomen untersucht, die mit Fumarat, Succinat oder Sulfat vorbeladen wurden. Phosphat (PO₄²⁻) wurde aufgrund dessen Strukturähnlichkeit zu Sulfat ebenfalls untersucht.

Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Glutamat, Succinat, Pyruvat und Acetat wurde ebenfalls in Malat, Citrat und TGL vorbeladene Proteoliposomen untersucht.

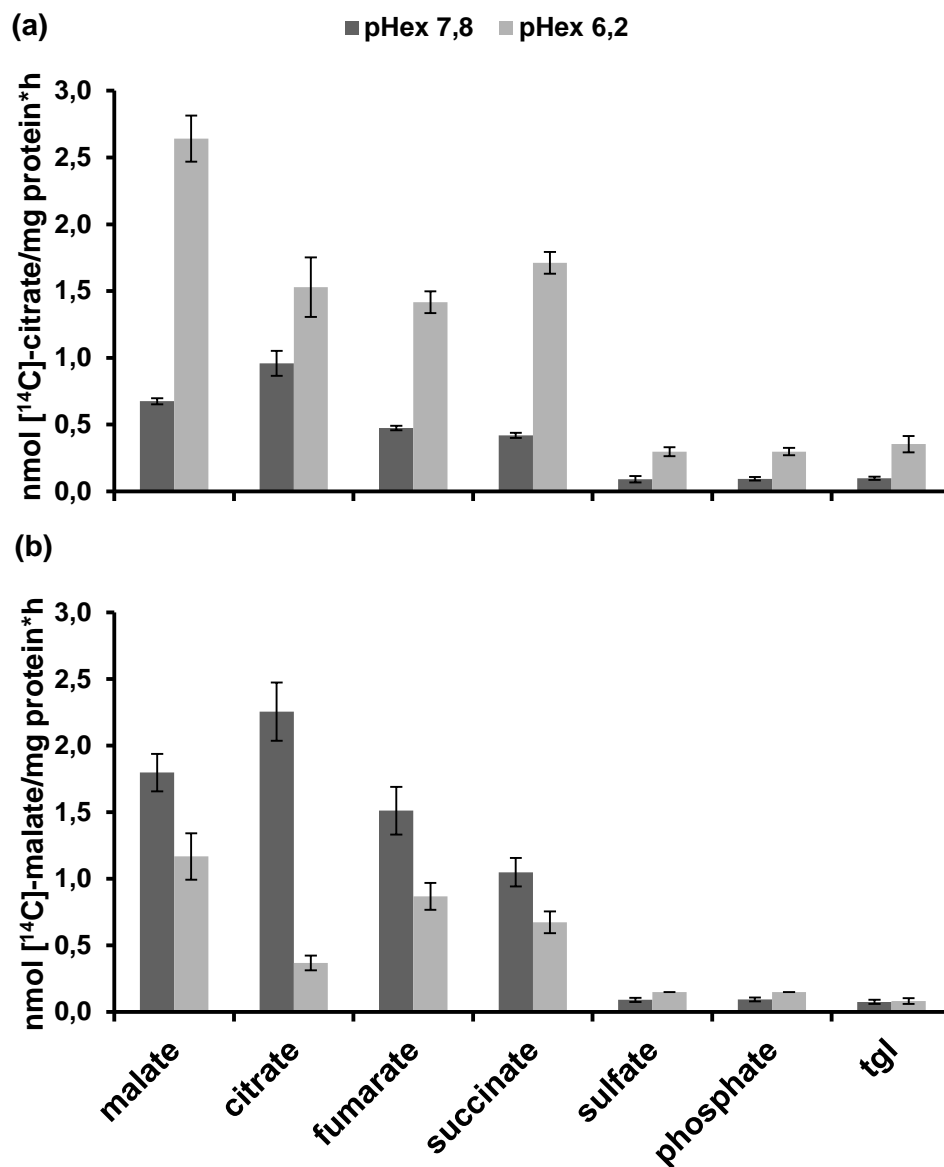


Abbildung 3.14: Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -markiertem Citrat, bzw. Malat. Proteoliposomen wurden mit 5mM Substrat (Malat, Citrat, Fumarat, Succinat, Sulfat, Phosphat und TGL als „leer“-Kontrolle) vorbeladen. Die pH-abhängige Aufnahme von Citrat, bzw. Malat in die Proteoliposomen wurde über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Der pH-Wert in den Proteoliposomen (pH_{in}) wurde auf 7 genormt. Die Aufnahmeuntersuchungen erfolgten unter extern variierenden pH-Werten von pH 7,8 bzw. 6,2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler.

Die Aufnahme in Malat- und Citrat-vorbeladene Proteoliposomen zeigt erneut den transstimulierenden Effekt von Malat auf den Citrat-Import unter aziden Bedingungen bzw. von Citrat auf den Malat-Import unter alkalischen Bedingungen. Dieser ist ebenfalls bei Proteoliposomen zu beobachten, welche mit Fumarat, bzw. Succinat vorbeladen sind. Hierbei zeigt sich ein gesteigerter Citrat-Import von 0,47, bzw. 0,42 nmol/mg protein*h auf 1,42, bzw.

1,71 nmol/mg Protein*h bei externen pH-Werten von 6,2, verglichen zu pH-Werten von 7,8. Der Malat-Import ist hingegen nur von 1,51, bzw. 1,05 nmol/mg Protein*h auf 0,87, bzw. 0,67 nmol/mg Protein*h erniedrigt. Somit weisen sowohl Fumarat, als auch Succinat eine ähnliche trans-stimulierende Wechselwirkung auf den Citrat- und den Malat-Transport auf, als Malat. Sulfat bzw. Phosphat zeigen dahingegen keine Auswirkung auf die Citrat- bzw. Malat-Aufnahme. Diese ist vergleichbar mit nicht vorbeladenen Proteoliposomen. Eine Aufnahme von Glutamat, Pyruvat und Acetat in Proteoliposomen konnte ebenfalls nicht gemessen werden. Lediglich radioaktiv markiertes Succinat wurde in Proteoliposomen aufgenommen. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Aufnahmeverhalten, wie für Malat. Für Succinat konnte ebenfalls eine gesteigerte Transportrate bei alkalischen pH-Bedingungen verglichen zu sauren pH-Bedingungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Carbonsäuren sind ein essentieller Bestandteil zahlreicher Stoffwechselprozesse innerhalb des pflanzlichen Metabolismus. Über den Citratzyklus sind sie an der Respiration des aus der Glykolyse stammenden Pyruvats und somit an der Generierung von Reduktionsäquivalenten und der Energetisierung der Zelle beteiligt. Während der Keimung spielen sie ebenfalls eine wichtige Rolle beim Abbau von Fettsäuren und der Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die Glukoneogenese. Weiterhin sind sie über Transaminierungsreaktionen an der Nitratassimilation, sowie am Abbau und der Neusynthese vieler Aminosäuren beteiligt.

Citrat und Malat sind die am stärksten akkumulierenden Carboxylate im Stoffwechsel der Pflanze (Chia *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2009). Diese werden überwiegend in der Vakuole gespeichert, der zytosolische Anteil ist daher eher gering (Gerhardt *et al.*, 1987; Szecowka *et al.*, 2013). Citrat wird nach dessen Synthese im Zytosol als Trianion (Citrat^{3-}) in die Vakuole transportiert, der hierfür verantwortliche Carrier konnte bisher allerdings noch nicht auf molekularer Ebene identifiziert werden. Malat wird als Dianion (Malat^{2-}) in die Vakuole transportiert (Oleski *et al.*, 1987; Rentsch und Martinoia, 1991). Im sauren Milieu der Vakuole werden Citrat und Malat protoniert, in dissoziierter Form können sie daraufhin nicht mehr aus der Vakuole diffundieren (Lüttge *et al.*, 1979).

Bisher konnten in *Arabidopsis thaliana* zwei Transportproteine charakterisiert werden, die den Transport von Malat in die Vakuole ermöglichen: der Aluminium-aktivierte Malat Transporter 9 (ALMT9; Kovermann *et al.*, 2007) und der tonoplastidäre Dicarboxylat Transporter (TDT; Emmerlich *et al.*, 2003; Hurth *et al.*, 2005). Letzterer wurde von Dr. Vera Emmerlich aufgrund seiner Homologie zu Proteinen der SLC13 (Solute Carrier family 13) Gen-Familie des menschlichen Organismus untersucht (NaDC1; NaDC3; NaCT; Pajor *et al.*, 2006). Mitglieder der SLC13 Familie katalysieren einen Natrium-abhängigen Transport von Di- und Tricarboxylaten über die Plasmamembran menschlicher Nierenzellen, um Stoffwechselintermediate während der glomerulären Filtration zu resorbieren (Pajor *et al.*, 1996). Im Jahr 2006 konnte ein weiteres Transportprotein identifiziert werden, welches eine hohe Homologie zum *AfTDT* und zum *HsNADC1* aufweist. Der Citrat Transporter 1 aus *Citrus sinensis* (*CsCit1*) ist vermutlich während der Fruchtreife für den Export von Citrat aus der Vakuole verantwortlich (Shimada *et al.*, 2006).

Ziel dieser Dissertation ist es, den tonoplastidären Dicarboxylat Transporter (TDT) hinsichtlich seiner physiologischen Bedeutung und seiner Transporteigenschaften weiterführend zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zwei unabhängige Überexpressions-Linien bezüglich ihrer Carboxylatgehalte im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen und *tdt*-k.o.-Pflanzen charakterisiert. Weiterhin wurde das *AfTDT*-Gen erstmals heterolog in Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* exprimiert und elektrophysiologische Transportstudien mittels „patch-clamp“-Analysen

durchgeführt. Letztlich wurden Aufnahmeuntersuchungen an Proteoliposomen durchgeführt, in die das rekombinante Transportprotein integriert wurde, um so das Substratspektrum, sowie die pH-Abhängigkeit des Transportproteins zu untersuchen.

Da der *AtTDT* vermutlich auch bei der Beantwortung mehrerer abiotischer Stresssituationen beteiligt ist, wurden die Malat- und Citratgehalte sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter ausgewählten Stressbedingungen untersucht.

4.1 Die Überexpression des TDT führt zu reziproken Änderungen im Malat- und Citratgehalt

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des tonoplastidären Dicarboxylat Transporters in den k.o.-Linien *tdt1* und *tdt2* zu einem verringerten Malatgehalt führt. Reziprok akkumulieren die T-DNA-Insertionsmutanten jedoch mehr Citrat, als der Wildtyp (Hurth *et al.*, 2005). Weiterhin wurden von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit zwei unabhängige Überexpressionslinien generiert (Oex15 und Oex24), welche einen bis zu vierzigfach erhöhten Transkriptgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen (Frei 2010).

Diese Überexpressions-Pflanzen wurden im Verlauf dieser Arbeit zusammen mit Wildtyp- und k.o.-Pflanzen für fünf Wochen unter Standardbedingungen auf Erde kultiviert. Anschließend wurden die Malat- und Citratgehalte der jeweiligen Pflanzen-Linien im diurnalen Verlauf bestimmt (Abb. 3.1). Die Überexpressions-Pflanzen weisen zu jedem gemessenen Zeitpunkt einen um zwei- bis dreifach höheren Malatgehalt als der Wildtyp auf. Reziprok dazu ist der Citratgehalt in den Überexpressions-Linien ebenfalls um das Zwei- bis Dreifache erniedrigt. Die Überexpressions-Pflanzen zeigen somit ein gegenläufiges Verhältnis zu den k.o.-Pflanzen. Diese zeigen wie erwartet einen bis zu zweifach erniedrigten Malatgehalt, bei gleichzeitig bis zu zweifach erhöhtem Citratgehalt gegenüber Wildtyp-Pflanzen. Um dieses Phänomen zu interpretieren wird anschließend kurz auf die Kompartimentierung und die Metabolisierung von Malat und Citrat eingegangen.

Sowohl Malat, als auch Citrat liegen überwiegend in der Vakuole der Pflanzenzelle vor (Szecowka *et al.*, 2013). Malat wird während der Lichtphase synthetisiert und in der Vakuole gespeichert. Während der Dunkelphase wird es aus der Vakuole wieder mobilisiert um der Pflanze als Kohlenstoffquelle zu dienen und die Pflanze zu energetisieren (Zell *et al.*, 2010). Citrat hingegen wird während der Dunkelphase synthetisiert und in der Vakuole gespeichert. Während der Lichtphase wird Citrat erneut mobilisiert und dient der Pflanze als Vorstufe für die Nitratassimilation (Cheung *et al.*, 2014). Sowohl der Citrat-Import über einen noch unbekanntem Translokator, als auch der Malat-Import *via AtALMT9* sind dabei in Überexpressions-Pflanzen und k.o.-Pflanze weiterhin möglich (Hurth *et al.*, 2005; Kovermann *et al.*, 2007).

Bisher wurde postuliert, dass ein Fehlen des TDT-Transportproteins mit einer Akkumulation von Malat im Zytosol der k.o.-Pflanzen einhergeht. Um einer toxischen Konzentration von Malat entgegenzuwirken, wird dieses über anaplerotische Stoffwechselwege in den Mitochondrien der k.o.-Pflanzen zu Citrat umgewandelt. Dieses kann weiterhin in die Vakuole transportiert und somit dem Stoffwechsel entzogen werden (Hurth *et al.*, 2005).

Das würde allerdings im Umkehrschluss bedeuten, dass die Überexpressions-Pflanzen, trotz erhöhter Malatgehalte, einen Malat-Mangel im Zytosol der Pflanzenzellen aufweisen. Um den vorherrschenden Mangel an Malat auszugleichen, wird Citrat daher aus den Vakuolen der Überexpressions-Pflanzen mobilisiert und vermehrt im Citratzyklus der Pflanzen zu Malat abgebaut. Der Citratgehalt wäre daher auf Kosten des Malatgehaltes verringert.

Dies ist jedoch aufgrund der Gesamt-Carboxylatgehalte der jeweiligen Pflanzen-Linien unwahrscheinlich, da die Synthese von Malat über Citrat nur ein Citrat-Molekül, die Synthese von Citrat über Malat jedoch zwei Malat-Moleküle verbraucht. Es wäre daher anzunehmen, dass Unterschiede im Gesamt-Carboxylatgehalt zwischen Wildtyp-, k.o.- und Überexpressionspflanzen vorzufinden sind, dieser ist jedoch in allen Genotypen annähernd gleich. Des Weiteren sind die Überexpressions-Pflanzen, genau wie die k.o.-Pflanzen, weiterhin in der Lage, Malat im diurnalen Verlauf auf- und abzubauen. Trotz veränderter Citratgehalte, zeigen die jeweiligen Pflanzen-Linien auch hierbei noch den typischen diurnalen Verlauf während der Licht-, bzw. Dunkelphase. Der Import, sowie die Mobilisierung von Malat und Citrat sind demnach immer noch möglich.

Es wäre daher ebenfalls denkbar, dass der Import von Malat durch einen gekoppelten Gegentausch mit Citrat über das TDT-Transportprotein assoziiert ist. Der verringerte Malat-Import in die Vakuolen der k.o.-Pflanzen würde somit mit einem verringerten Export von Citrat einhergehen, sodass Citrat in den Vakuolen der k.o.-Pflanzen anstaut. Die erhöhte Abundanz des TDT-Transporters würde hingegen in den Überexpressions-Pflanzen eine gesteigerte Malat-Aufnahme in die Vakuole katalysieren, in Folge dessen Citrat vermehrt aus der Vakuole exportiert wird.

4.2 Der TDT katalysiert den pH-sensitiven Export von Citrat aus der Vakuole

An den Carboxylatgehalten der beiden Überexpressionslinien wird deutlich, dass die erhöhte Expression des TDT, sowie die damit verbundene Akkumulation von Malat mit einer Abnahme des Citratgehaltes der Pflanzen einhergehen. Ein umgekehrt reziprokes Verhalten der beiden Carboxylate zueinander konnte bereits in früheren Arbeiten an k.o.-Pflanzen gezeigt werden. Eine Import-Funktion des Transportproteins für Citrat konnte anhand von Aufnahmeversuchen an intakten Vakuolen von Wildtyp- und k.o.-Pflanzen ausgeschlossen werden (Hurth *et al.*,

2005). Dennoch weisen einige der homologen Transportproteine der SLC13 Familie aus dem menschlichen Organismus ebenfalls eine Transportaktivität für Citrat auf (Pajor *et al.*, 2006). Ein weiteres homologes Protein aus *Citrus sinensis* katalysiert ebenfalls den Transport von Citrat über den Tonoplasten, dabei handelt es sich jedoch um einen Citrat-Exporter (Shimada *et al.*, 2006).

Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob der TDT in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls eine Export-Funktion für Citrat aufweist. Zu diesem Zweck wurde das Transportprotein erstmals heterolog in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert. Diese wurden daraufhin auf Spannungsänderungen über die Plasmamembran der Oozyten in Anwesenheit von Citrat im Außenmedium untersucht. Eine Expression des Transportproteins in injizierten Oozyten konnte dabei mittels Western-blot und Immunodetektion über HA-Tag spezifische Antikörper bestätigt werden (Abb. 3.6). Die Lokalisierung des Proteins konnte mittels Immunofluoreszenz in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

Hierbei ist davon auszugehen, dass der zum Zytosol hin orientierte Teil des TDT-Transportproteins, aufgrund der gerichteten Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran gleich bleibt. Während der andere Teil des Proteins daher in *Arabidopsis thaliana* in das Lumen der Pflanzenvakuole hineinragt, ist dieser in der Plasmamembran der Oozyten vermutlich nach außen orientiert (persönliche Korrespondenz, Prof. Chen). Durch die Zugabe von Citrat zum Außenmedium können daher die Begebenheiten der pflanzlichen Vakuole simuliert werden, indem das Außenmedium während der Spannungsmessungen angesäuert wird.

Anhand der Daten aus Abbildung 3.8 wird ersichtlich, dass die Applikation von Citrat zu einem negativen Einwärts-Strom in die Zelle führt. Das bedeutet, dass entweder positive Ladung in die Zelle hinein oder negative Ladung aus der Zelle heraus transportiert wird. Da Citrat bei den gemessenen pH-Werten überwiegend als Citrat³⁻ bzw. Citrat²⁻-H vorliegt (Abb. 3.12), lässt sich daraus schließen, dass der Citrat-Import in die Oozyten entweder an den Symport mit Protonen gekoppelt ist, sodass insgesamt eine positive Nettoladung in die Zelle transportiert wird, oder der Transport an den Gegentausch nativ vorliegender Stoffwechselintermediate aus der Zelle gekoppelt ist, sodass insgesamt eine negative Nettoladung aus der Zelle heraus transportiert wird.

Die Azidifizierung des Außenmediums von pH 7,5 auf pH 6,5 führt weiterhin zu einer Spannungssteigerung über die Membran. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem negativ gerichteten Einwärts-Strom um einen Transport positiver Ladung in die Oozyte handelt, da ein erhöhter pH-Gradient über die Membran, sowie die höhere Protonenkonzentration außerhalb der Zelle zu einem vermehrten Einstrom in die Oozyten führt (Abb. 3.8).

Neben den elektrophysiologischen Messungen an Oozyten wurde das Transportprotein zusätzlich heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, *via* IMAC gereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Die Proteoliposomen wurden mit verschiedenen Substraten vorbeladen und

anschließend die Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat bzw. Malat bei unterschiedlich vorherrschenden pH-Werten untersucht (Abb. 3.9 ff.). Der Transport von Citrat über den TDT konnte hierbei erneut bestätigt werden. Zudem konnte eine erhöhte Citrat-Aufnahme in Proteoliposomen beobachtet werden, welche mit Malat, Citrat, Fumarat, oder Succinat vorbeladen wurden. Dies deutet erneut auf einen Gegentausch von Citrat mit den vorbeladenen Substraten hin. Dennoch war eine pH-abhängige, jedoch reduzierte Aufnahme von Citrat in Proteoliposomen messbar, die lediglich mit TGL-Puffer vorbeladen wurden. Ein streng gekoppelter Antiport von Citrat mit den untersuchten Carboxylate ist daher auszuschließen.

Die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte ergab eine hohe Affinität für die Aufnahme von Citrat unter aziden Bedingungen, diese nahm bei neutralen bzw. alkalischen pH Werten ab. Die Geschwindigkeit des Citrat-Imports in die Proteoliposomen war unter sauren pH-Werten ebenfalls erhöht (Abb. 3.11). Eine Steigerung der Importrate konnte in Malat-vorbeladene Proteoliposomen bis zu einem pH-Wert von 5,0 beobachtet werden, unter stärker aziden Bedingungen war erneut ein Rückgang der Aufnahmerate zu erkennen (Abb. 3.12 f.). Dieser Verlauf korreliert in etwa mit dem Vorhandensein der beiden Protonierungs-Formen Citrat¹-H₂ und Citrat²-H, deckt sich jedoch mit keiner der beiden Formen gänzlich. Dennoch lässt sich anhand der Daten Citrat²-H als transportierte Protonierungs-Form des Citrats herleiten, da ein Rückgang der Transportrate bei einem pH-Wert von 4,0 bereits zu erkennen, die Abundanz von Citrat¹-H₂ allerdings bei pH 4 am höchsten ist (Abb. 3.13).

Die steigende Citrat-Transportrate trotz rückläufiger Citrat²-H Konzentration kann hingegen durch die Protonen getriebene Aufnahme von Citrat erklärt werden, da trotz Abnahme der Citrat²-H Konzentration die Protonen Konzentration im Medium weiter ansteigt. Somit wird die Abnahme der Importrate durch die treibende Kraft der höher werdenden Protonenanzahl kompensiert. Ab einem pH-Wert von 5,0 nimmt die Konzentration des vorliegenden Citrat²-H jedoch so weit ab (Abb. 3.13), dass diese nicht mehr kompensiert werden kann, daher kommt es zu einem Abfall der aufgenommenen Citrat-Menge.

Der Transport von radioaktiv markiertem Malat über den TDT konnte ebenfalls an Proteoliposomen gemessen werden. Ähnlich wie bei der Citrat Aufnahme konnten hierbei trans-stimulierende Wechselwirkungen durch die Vorbeladung der Proteoliposomen mit Citrat, Malat, Fumarat und Succinat auf den Malat-Import beobachtet werden (Abb. 3.10; Abb. 3.14). Die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte zeigte unter alkalischen Bedingungen eine hohe Affinität für die Malat Aufnahme, diese nahm bei neutralen bzw. aziden pH-Werten ab. Die Geschwindigkeit des Malat-Imports in die Proteoliposomen war unter alkalischen pH-Bedingungen ebenfalls erhöht (Abb. 3.11; Tab. 3.1). Eine Malat Aufnahme in nicht vorbeladene Proteoliposomen konnte hingegen nicht gemessen werden.

Anhand der Transportstudien an Oozyten und Proteoliposomen lässt sich zusammenfassend sagen, dass der TDT sowohl Citrat, als auch Malat und Succinat nachweislich transportieren kann. Da Fumarat einen ähnlich stimulierenden Effekt auf die Aufnahme von Malat und Citrat aufweist (wie Malat bzw. Succinat) kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass Fumarat ebenfalls als Substrat des Transportproteins fungiert. Weiterhin ist der Transport von Citrat über den TDT elektrogen. Citrat wird als Dianion (Citrat^{2-}) transportiert, daher ist davon auszugehen, dass der Transport von Citrat an drei oder mehr Protonen gekoppelt ist. Da der Natrium-abhängige Transport von Citrat durch den humanen Carrier NaDC1 an drei Natrium-Ionen gekoppelt ist (Pajor *et al.*, 2006), erscheint der Export von Citrat^{2-} zusammen mit drei Protonen aus der pflanzlichen Vakuole sehr wahrscheinlich.

Die Aufnahme von Malat und Succinat ist unter aziden Bedingungen verringert, die Aufnahme unter neutralen bzw. alkalischen Bedingungen wird dahingegen begünstigt. Somit zeigt sich für den Transport beider Dicarboxylate ein gegenläufiges Transportverhalten im Vergleich zur Citrat-Aufnahme. Sulfat und Phosphat haben keinen positiven Effekt auf den Import und scheiden somit als potentielle Substrate aus (Abb. 3.14).

Malat, Succinat und Fumarat liegen unter neutralen pH-Bedingungen fast ausschließlich in deprotonierter Form vor (Malat^{2-} , Succinat^{2-} , Fumarat^{2-}). Somit sind die Unterschiede im Transportverhalten des Proteins gegenüber Di- bzw. Tricarboxylaten unter physiologischen Bedingungen sinnvoll. Malat wird über den TDT aus dem Zytosol in die Vakuole transportiert. Der Import erfolgt hierbei als Dianion (Oleski *et al.*, 1987; Rentsch und Martinoia, 1991). Malat wird in der Vakuole teilweise protoniert und liegt dort daher in Form von Malat^{2-} und Malat^{1-} vor. Zusätzlich bewirkt das saure Milieu der Vakuole, dass die Affinität des Transportproteins für Malat^{2-} sinkt. Der Export wird dadurch weiterhin benachteiligt.

Citrat hingegen wird über das TDT-Transportprotein aus der Vakuole exportiert. Diese ist, aufgrund der Aktivität der vakuolären ATPase, sowie der PPase saurer als das Zytosol. Dies hat zur Folge, dass Citrat in der Vakuole überwiegend einfach protoniert in Form von Citrat^{2-} vorliegt. Durch den vorherrschenden Protonengradienten über den Tonoplasten wird der Citrat Export aus der Vakuole über den Co-Transport mit drei Protonen energetisiert. Im Zytosol deprotoniert Citrat aufgrund des alkalischeren pH-Wertes überwiegend zu Citrat^{3-} und kann somit nicht mehr durch den TDT in die Vakuole importiert werden.

Die trans-stimulierende Wechselwirkungen der jeweiligen Carboxylate auf die Malat bzw. Citrat Aufnahme ist durch die Konformationsänderung des Proteins während des Transportprozesses zu erklären. Der Export von Citrat aus der Vakuole ist energetisch effektiver, wenn das Protein daraufhin vom Zytosol ein Dicarboxylat in die Vakuole importiert, um die ursprüngliche Konformation des Proteins für einen erneuten Export von Citrat wieder einzunehmen. Da allerdings der Citrat-Transport, wenn auch verringert, in nicht vorbeladene

Proteoliposomen weiterhin nachgewiesen werden konnte, scheint ein obligater Antiport Mechanismus jedoch nicht vorzuliegen.

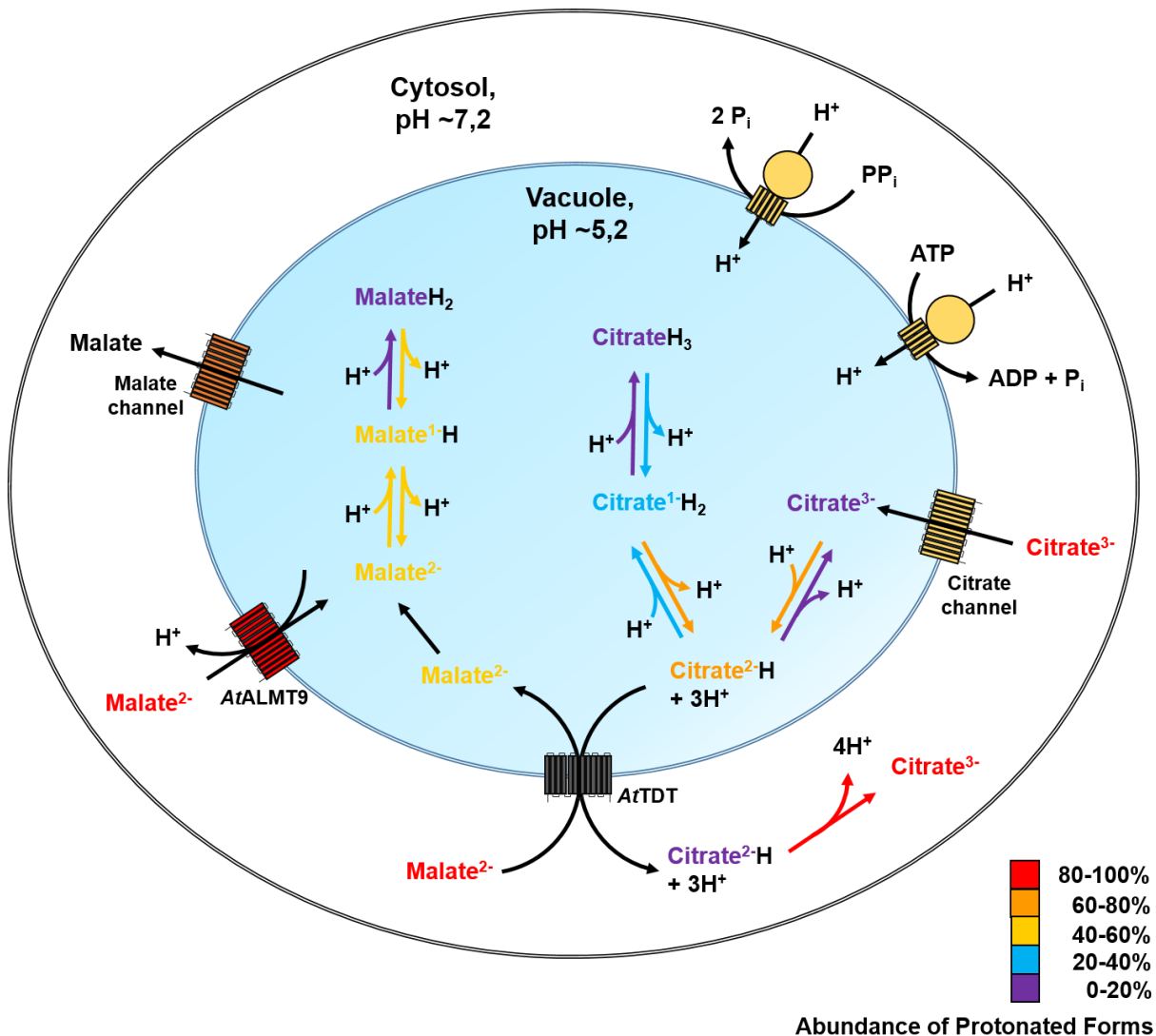


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Malat und Citrat Transports über den Tonoplasten.

Die Energetisierung sekundärer Transportmechanismen erfolgt durch den Transport von Protonen in die Vakuole über die V-PPase, sowie die V-ATPase durch die Spaltung von Pyrophosphat bzw. ATP. Der daraus resultierende elektrochemische Gradient wird genutzt um den Import von Substrat, wie z.B. Malat²⁻, durch den Gegentausch mit Protonen über den AtALMT9 zu katalysieren. Weiterhin ermöglicht der elektrochemische Gradient den Import von Anionen, z.B. Citrat³⁻ in die Vakuole. Durch die Protonierung von Malat und Citrat aufgrund des sauren Milieus der Vakuole können diese in hohen Konzentration akkumulieren. Ein Malatauswärtskanal wurde ebenfalls von Iwasaki *et al.*, 1992 beschrieben. In welcher Form dieser Kanal Malat aus der Vakuole transportiert, oder ob es sich dabei um den TDT handelt, ist noch unklar. Der AtTDT katalysiert unter Standardbedingungen den Gegentausch von Malat und Citrat. Citrat wird hierbei vermutlich zusammen mit drei Protonen exportiert.

Unter *in vivo* Bedingungen ist dennoch der Antiport von Citrat gegen Malat in gleichen Verhältnissen begünstigt, da sowohl k.o.-, als auch Überexpressions-Pflanzen ein reziprokes Verhalten der beiden Carboxylate zueinander aufweisen. Die zeitliche Verschiebung von

Malat-Akkumulation und Citrat-Abbau während der Lichtphase, und Citrat-Akkumulation und Malat-Abbau während der Dunkelphase (Ab. 3.1) unterstreicht ebenfalls die Assoziation des Malat-Imports im Gegentausch mit Citrat.

4.3 Der TDT erfüllt unterschiedliche Funktionen in Reaktion auf verschiedene, abiotische Stresssituationen

Eine veränderter Transkriptmenge bzw. eine dadurch erhöhte Abundanz im Proteingehalt des TDT, als Reaktion auf zahlreiche, abiotische Stressfaktoren, konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden. So konnte ein steigender Transkriptgehalt in Pflanzen beobachtet werden, welche über einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen unter Wassermangel kultiviert wurden (Hurth, 2005). Ebenso konnte ein gesteigerter Transkriptgehalt an Blattscheiben gemessen werden, welche über 24h in azider Lösung im Dunkeln inkubiert wurden. Diese zeigten weiterhin verringerte Malatgehalte verglichen zu Pflanzenproben, die unter neutralen Bedingungen inkubiert wurden (Hurth *et al.*, 2005). Mittels Proteomanalysen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der TDT höher Abundant in angereicherten Tonoplasten-Membranen von Pflanzen zu finden ist, welche über einen Zeitraum von vier Tagen bei Temperaturen von 4°C inkubiert wurden. Diese zeigten weiterhin einen erhöhten Malatgehalt, bei gleichzeitig verringerten Citratkonzentrationen im Pflanzengewebe (Schulze *et al.*, 2012). Eine erhöhte Promotoraktivität des nativen TDT-Promotors unter Trockenstress, Kältestress, sowie unter osmotischem Stress konnte ebenfalls mittels der Aktivität der β -Glucuronidase in Promotor-GUS-Pflanzen gezeigt werden (Wick 2009; Frei, 2010; Wandra, 2012).

Aus diesem Grund wurden Wildtyp-, k.o.- und Überexpression-Pflanzen Trockenstress-, osmotischen Stress- und Säurestressbedingungen ausgesetzt und im Anschluss die Malat- und Citratgehalte der jeweiligen Pflanzenlinien untersucht (Kap. 3.2 ff.).

Nach der Applikation von Trockenstress, bzw. osmotischem Stress ist hierbei eine Akkumulation von Malat, bei gleichzeitiger Abnahme des Citratgehaltes in Wildtyp- und Überexpressions-Pflanzen zu beobachten. Die k.o.-Pflanzen zeigen nur geringe bis gar keine Änderungen im Citratgehalt, der Malatgehalt der k.o.-Pflanzen ist ebenfalls nur geringfügig erhöht.

Tendenziell ähnliche Änderungen im Carboxylatgehalt konnten bereits während der Akklimatisierung von Wildtyp-Pflanzen an Kältestressbedingungen beobachtet werden. Diese zeigten ebenfalls einen erhöhten Malatgehalt, bei gleichzeitig verringerten Citrat-Konzentrationen (Schulze *et al.*, 2012).

Die Applikation von Trockenstress (Hurth, 2005), osmotischem Stress (Wic, 2008) und Kältestress (Schulze *et a.*, 2012) führt demnach zu einer Akkumulation der TDT-

Transkriptmenge. Die erhöhte Abundanz des Proteins ermöglicht es der Pflanze, Malat in stärkerem Maße zu akkumulieren. Diese Malat-Akkumulation geht aufgrund des Gegentauchs mit Citrat mit einer Abnahme der Citrat-Konzentration einher.

Der AtTDT ist demnach maßgeblich an der Akkumulation von Malat und der Mobilisierung von Citrat unter Stress beteiligt. Trotz der Unfähigkeit der k.o.-Pflanzen, Malat unter Stress zu akkumulieren, bzw. Citrat zu mobilisieren, konnte jedoch bisher überraschenderweise kein Phänotyp zwischen den k.o.-Pflanzen und den Wildtyp-, bzw. Überexpressions-Pflanzen beobachtet werden.

Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass neben Malat noch viele weitere Stoffwechselintermediate vermehrt synthetisiert werden, um das Wasserpotential der Pflanze zu senken (Beck *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2010). Eine erniedrigte Wasserverfügbarkeit führt z.B. ebenfalls zu einer Akkumulation von Sacchariden wie Glukose, Fruktose und Saccharose (Wormit, 2006; Hummel *et al.*, 2012).

Die fehlende, oder zumindest stark eingeschränkte Malat-Akkumulation in den k.o.-Pflanzen könnte daher bei den genannten Stresssituationen durch andere Stoffwechselmetabolite ausgeglichen werden. In der Tat weisen alle Genotypen nach einer Kältebehandlung zehn- bis vierzigfach erhöhte Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose auf, als unter Standardbedingungen (Daten nicht gezeigt). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen im Zuckergehalt gemessen werden, eine Kompensation durch eine veränderte Anreicherung von Sacchariden kann daher ausgeschlossen werden.

Weiterhin ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass der hohe Citratgehalt in den k.o.-Pflanzen einen Mangel an Malat zumindest teilweise kompensieren kann. Falls Citrat unter den genannten Stressbedingungen eine ähnliche Wirkung auf das osmotische Potential der Pflanze ausübt, wäre es schwierig, geringe Unterschiede in der Suszeptibilität der jeweiligen Genotypen nachzuweisen.

Bei Wassermangel wird allerdings auch Prolin aufgrund seiner protektiven Eigenschaften ebenfalls vermehrt synthetisiert. Ausgangssubstrat für die Synthese von Prolin ist die Aminosäure Glutamat, welches über α -Ketoglutarat ebenfalls über Citrat gebildet wird. Es wäre daher interessant zu analysieren, ob die Mobilisierung und der Abbau von Citrat bei den untersuchten Stresssituationen Unterschiede im Prolingehalt der jeweiligen Genotypen zur Folge haben. Dies könnte sich möglicherweise auf die Frosttoleranz der jeweiligen Pflanzenlinien bemerkbar machen, da eine Akkumulation von Prolin insbesondere unter Kältestress zu einer erhöhten Frosttoleranz beiträgt (Nanjo *et al.*, 1999).

Säurestress, hervorgerufen durch die Azidifizierung des Zytosols, führt ebenfalls zu einem erhöhten Transkriptgehalt des TDT in Wildtyp-Pflanzen. Dies konnte an isolierten Blattscheiben nachgewiesen werden, die bei unterschiedlichen pH-Werten für 24h im Dunkeln

inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Pflanzenproben, die zu Beginn des Experiments am Ende der Lichtphase entnommen wurden (Hurth *et al.*, 2005).

Zum damaligen Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, dass der TDT zudem auch diurnal reguliert wird. Der Transporter weist gegen Ende der Dunkelphase einen hohen Transkriptgehalt auf. Während der Lichtphase kommt es zu einer Abnahme der Transkriptmenge, diese nimmt während der Dunkelphase erneut zu (Frei, 2010). Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen einer zytosolischen Azidifizierung auf den Transkriptgehalt des TDT, unter Berücksichtigung der dunkelinduzierten Transkript-Akkumulation analysiert (Abb. 3.4), die Experimente von Dr. Marco Hurth konnten dabei bestätigt und erweitert werden.

Wie zu erwarten, konnte eine Steigerung der TDT-Transkriptmenge während der Dunkelinkubation, sowie während der Azidifizierung des Zytosols beobachtet werden. Die dunkelinduzierte und die pH-induzierte Transkriptsteigerung ist dabei kumulativ, da Blattscheiben, die unter ansäuernden Bedingungen im Dunkeln inkubiert wurden, den höchsten Transkriptgehalt aufweisen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die induzierende Wirkung einer zytosolischen Ansäuerung stärker ist, als die reprimierende Wirkung des Lichts, da die Belichtung der Pflanzenproben, die bei pH 4,0 inkubiert wurden, ebenfalls einen erhöhten TDT-Transkriptgehalt aufweisen.

Interessanterweise zeigen die Pflanzenproben, die unter neutralen pH-Bedingungen im Dunkeln inkubiert wurden, einen leicht verringerten Transkriptgehalt, als die Kontrollproben am Ende der Dunkelphase. Die Inkubation der Pflanzenproben bei pH 7,0 scheint demnach eine reprimierende Wirkung auf den Transkriptgehalt des TDT zu haben. Diese wirkt antagonistisch auf die dunkelinduzierte Transkriptsteigerung, was letztlich zu einem geringeren Transkriptgehalt führt, als unter korrespondierenden Kontrollbedingungen.

Unter *in vivo* Bedingungen wird der Apoplast durch die Aktivität der P-ATPase angesäuert um den Transport verschiedener Substanzen über die Plasmamembran sekundär zu energetisieren. Je nach Pflanzenart und Pflanzengewebe liegen hierbei unterschiedliche pH-Werte außerhalb der Zelle vor. In den meisten Pflanzen liegt dieser zwischen pH 5 und 6, durch die aktive Ansäuerung in im Wachstum befindlichen Pflanzengewebe können jedoch auch leicht saurere pH-Werte vorherrschen (Grignon und Sentenac, 1991).

Die Inkubation der Blattscheiben bei pH 4,0 führt daher zu einer erhöhten Konzentration an Protonen im Apoplasten, in Folge dessen die P-ATPase weniger Protonen aus dem Zytosol in den Apoplasten transportiert, bzw. das Zytosol zusätzlich durch den gesteigerten Import von Protonen über sekundär aktive Transporter verstärkt angesäuert wird. Die Azidifizierung des Zytosols wiederum induziert die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat über das zytosolische Malat Enzym. Bei dieser Reaktion werden Protonen an NAD⁺ gebunden, diese werden

anschließend über die alternative Oxidase an Sauerstoff gebunden und somit dem Zytosol entzogen (Sakano *et al.*, 1998).

Umgekehrt bedeutet dies, dass die Inkubation der Blattscheiben bei pH 7 vermutlich zu einer Alkalisierung des Apoplasten führt, da verstärkt Protonen aus dem Zytosol in den Apoplasten transportiert werden müssen, um den Protonengradienten über die Plasmamembran aufrecht zu erhalten. Dies führt weiterhin zu einem erhöhten Verbrauch von ATP in der Zelle, um den gesteigerten Transport von Protonen aus der Zelle zu energetisieren.

Unter alkalischen Bedingungen im Zytosol ist die Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase erhöht, welche die Umsetzung von PEP zu Oxalacetat durch die Bindung von HCO_3^- katalysiert. Das dabei freigesetzte Phosphat wirkt regulatorisch auf die Phosphofruktokinase in der Zelle, diese wiederum fördert den Abbau von Glukose in dessen Folge Phosphoenolpyruvat erneut gebildet wird. Durch einen pflanzenspezifischen, alternativen Stoffwechselweg der Glykolyse wird Glukose über PEP nicht zu Pyruvat, sondern über Oxalacetat zu Malat umgesetzt, hierbei entstehen pro Molekül Glukose zwei Moleküle Malat, gleichzeitig werden vier Protonen freigesetzt. Somit stellen diese Stoffwechselprozesse einen Weg dar, den zytosolischen pH-Wert wieder zu neutralisieren. Der erhöhte Verbrauch von ATP zur Energetisierung des Protonengradienten über die Plasmamembran wird dabei durch den verstärkten Abbau von Glukose ebenfalls gedeckt (Sakano *et al.*, 1998).

Aufgrund der Akkumulation des TDT-Transkriptgehaltes unter aziden Bedingungen bei gleichzeitigem Abbau von Malat im Zytosol, wurde dem Transportprotein eine Exportfunktion für Malat zugesprochen (Hurth *et al.*, 2005).

Weiterhin lässt sich anhand der Northern-blot Analysen von Dr. Marco Hurth in Verbindung mit den hier gezeigten quantitativen Expressionsanalysen des Transportproteins schließen, dass die Inkubation der Blattscheiben unter neutralen Bedingungen einen inhibierenden Effekt auf den Transkriptgehalt des TDT hat. An der Alge *Eremosphaera viridis*, sowie der C_4 -Pflanze *Amaranthus caudatus* und der C_3 -Pflanze *Vicia faba* konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Belichtung jeweils zu einer Alkalisierung des Zytosols führt, zugleich findet im Dunkeln eine zytosolische Azidifizierung statt (Raghavendra *et al.*, 1992; Bethmann *et al.*, 1998). Es wäre demnach denkbar, dass die licht- bzw. dunkelinduzierten Änderungen im Transkriptgehalt des TDT indirekt über pH-Änderungen des Zytosols stattfinden.

Tatsächlich konnten an Zellkulturen von *Vigna radiata* anhand von Kälteexperimenten gezeigt werden, dass die Applikation von Kältestress ebenfalls zu einer Azidifizierung des Zytosols führt. Hierbei konnte eine Korrelation der zytosolischen pH-Änderungen in Zusammenhang mit der Suszeptibilität der Zellen bei akklimatisierten und nicht akklimatisierten Zellen beobachtet werden. Nicht akklimatisierte Zellen zeigten einen drastischeren pH-Abfall des Zytosols, bei zeitgleich erhöhter Sterberate, als akklimatisierte Zellen (Yoshida *et al.*, 1999).

Unter Trockenstressbedingungen konnte ebenfalls eine Azidifizierung des Zytosols festgestellt werden. Die Akkumulation von Malat, sowie von Prolin und Asparagin, die unter diesen Bedingungen als Protonenakzeptoren fungieren, dienen dabei ebenfalls der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase im Zytosol (Venekamp, 1989). Eine pH-vermittelte Abnahme der Wasserpermeabilität durch die Hemmung von Aquaporinen bei zytosolischer Ansäuerung konnte ebenfalls an *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden (Fischer und Kaldenhoff, 2008). Somit lässt sich ein Zusammenhang zwischen den jeweiligen, unterschiedlichen Stressbedingungen, der damit einhergehenden Änderungen des zytosolischen pH-Wertes, sowie der Verminderung der Wasserverfügbarkeit aufzeigen.

Während der Malatgehalt jedoch unter Trockenstress, osmotischem Stress und Kältestress erhöht ist, wird Malat bei einer Azidifizierung des Zytosols abgebaut (Sakano *et al.*, 1998; Hurth *et al.*, 2005). Messungen der Carboxylatgehalte an Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen bestätigen, dass Blattscheiben, die in pH-Medium mit pH 4,0 inkubiert wurden, einen geringeren Malatgehalt aufweisen, als Pflanzenproben, die unter neutralen Bedingungen inkubiert wurden (Abb. 3.5).

Weiterhin ist der Citratgehalt, welcher unter Trockenstress, osmotischem Stress und Kältestress stark verringert ist, unter azidifizierenden Bedingungen nur geringfügig verändert. Die Auswirkungen einer erhöhten TDT-Transkriptmenge auf die Akkumulation von Malat, bzw. die Mobilisierung von Citrat, scheint daher unter abiotischen Stressbedingungen, insbesondere bei einer zytosolischen Ansäuerung, wesentlich komplexer zu sein, als bisher angenommen. Inwiefern die verschiedenen Affinitäten des TDT-Transportproteins auf den Malat-, bzw. den Citrat-Transport bei unterschiedlichen pH-Werten hierbei eine Rolle spielen, ist ebenfalls unklar.

Der bisher fehlende Genotyp zwischen den jeweiligen Pflanzen-Linien lässt jedoch vermuten, dass der Metabolismus der Pflanze eine sehr hohe Flexibilität in Bezug auf die Malat- und Citratgehalte aufweist. Da die beiden Carboxylate über anaplerotische Stoffwechselwege jeweils ineinander umgewandelt werden können, sowie durch den Abbau von Glukose, Aminosäuren oder über Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen aus zahlreichen, weiteren Stoffwechselintermediaten gebildet werden können, herrschen bei den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen vermutlich keine Mangelscheinungen, die einen Wachstumsunterschied in den jeweiligen Pflanzen-Linien hervorrufen würden.

4.4 Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit wurden TDT-Überexpressions-Pflanzen auf deren veränderte Malat- und Citratgehalte analysiert. Weiterhin konnte die Funktion des TDT unter verschiedenen Stresssituationen weiter aufgeklärt werden. Dennoch konnten bisher nach wie vor keine

phänotypischen Unterschiede im Wachstum, weder unter Standardbedingungen, noch unter den untersuchten Stressbedingungen aufgezeigt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein Fehlen bzw. eine Überabundanz des Proteins unter bisher noch nicht untersuchten Bedingungen Änderungen im Wachstum oder in der Überlebensrate der jeweiligen Pflanzen-Linien bewirken.

Eine Charakterisierung der jeweiligen Pflanzen-Linien z.B. unter Kältestress wäre daher von großem Interesse. Über Aminosäuremessungen, insbesondere unter Stressbedingungen, könnte untersucht werden, ob Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen Unterschiede in deren Prolingehalt aufweisen. Konduktivitätsmessungen an akklimatisierten und nicht akklimatisierten Pflanzen könnten Aufschluss darüber geben, ob Unterschiede in der Frosttoleranz der jeweiligen Genotypen vorliegen.

Da viele abiotische Stressfaktoren zumeist mit einem sekundären Stress einhergehen, wäre es auch denkbar, dass Unterschiede zwischen den jeweiligen Pflanzen-Linien erst unter extremen Bedingungen durch die Kombination zweier Stressbedingungen auftreten, dies könnte ebenfalls experimentell untersucht werden.

Weiterhin konnte der Transportmechanismus des TDT, insbesondere in Bezug auf den Citrat-Export weiter aufgeklärt werden. Der Transportmechanismus für den Import von Malat, Succinat und Fumarat ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt. Elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten ergaben bisher keine eindeutigen Ergebnisse, ob der Transport von Dicarbonsäuren ebenfalls elektrogen ist. Dies könnte damit zusammen hängen, dass der Einbau des Proteins in die Plasmamembran von Oozyten gerichtet ist, während in Liposomen eine ungerichtete Orientierung zu vermuten ist. Der Import von Malat könnte daher im Zytosol der Pflanzenzelle z.B. durch die Phosphorylierung des Proteins, oder durch eine kompetitive Hemmung durch Stoffwechselintermediate reguliert sein, um einen gerichteten Transport von Substrat über die Membran zu gewährleisten. „Patch-clamp“-Analysen an isolierten Vakuolen von Wildtyp-, k.o.- und Überexpressions-Pflanzen könnten Aufschluss über das Transportverhalten des Proteins in Bezug auf Dicarboxylate liefern, da hierbei die native Orientierung des TDTs in der pflanzlichen Vakuole, im Gegensatz zu der Orientierung in Oozyten oder Proteoliposomen gewährleistet werden kann.

Letztlich wäre es interessant zu untersuchen, ob der TDT in der Lage ist, noch weitere Substrate in die Vakuole zu transportieren, bzw. diese aus der Vakuole zu mobilisieren. Aufnahme Untersuchungen mit weiteren Di- und Tricarboxylaten, wie z.B. Isocitrat, α -Ketoglutarat oder Oxalacetat könnten Aufschluss darüber geben, ob der TDT für den Transport weiterer Stoffwechselintermediate des Citratzyklus verantwortlich ist.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des tonoplastidären Dicarboxylat Transporters zu einem erhöhten Gehalt an Malat bei gleichzeitig vermindertem Citratgehalt in den Überexpressions-Pflanzen führt. Somit konnte, ähnlich wie in den k.o.-Pflanzen, ein reziprokes Verhalten von Citrat und Malat aufgezeigt werden.

Elektrophysiologische Analysen an Oozyten von *X. laevis* in Zusammenhang mit Aufnahmeversuchen an Proteoliposomen zeigten weiterhin, dass der Transport von Citrat ebenfalls durch den TDT katalysiert wird. Anhand eines negativen Einwärts-Strom an Oozyten konnte gezeigt werden, dass dieser Citrat-Transport elektrogen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Citrat²⁻H die transportierte Form von Citrat darstellt. Dieses wird vermutlich zusammen mit drei Protonen transportiert.

Die Dianionen Malat und Succinat, sowie höchstwahrscheinlich auch Fumarat, werden ebenfalls über den TDT transportiert. Unter Standardbedingungen werden diese in die Vakuole importiert. Im Gegenzug wird Citrat aus der Vakuole exportiert. Die trans-stimulierende Wechselwirkung von Malat, Succinat und Fumarat auf den Citrat Transport und *vice versa* bestärkt den in dieser Arbeit postulierten Antiport der jeweiligen Carboxylate über den Tonoplasten. Dieser ist jedoch nicht obligat, was an dem verringerten Transport von Citrat ohne Gegensubstrat über die Membran gezeigt werden konnte.

Unter Trockenstress und osmotischen Stress konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die erhöhte Expression des TDTs maßgeblich an der Akkumulation von Malat und der Mobilisierung von Citrat unter den genannten Stressbedingungen beteiligt ist.

Letztlich konnte mittels Säurestressexperimenten nachgewiesen werden, dass die Malatakkumulation, bei gleichzeitigem Citrat Abbau nicht zwingend miteinander gekoppelt sind, unter Säurestress müssen daher weitere regulatorische Effekte auf den Malat-Import bzw. den Citrat-Export vorherrschen.

6. Literatur

- Bauwe, H., Hagemann, M., & Fernie, A. R.** (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15(6), 330–6. doi:10.1016/j.tplants.2010.03.006
- Bba, E., Heldt, H. W., & August, R.** (1985). Energy - dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts, 806, 311–319.
- Beck, E. H. B., Ettig, S. F., Nake, C. K., Artig, K. H., & Hattarai, T. B.** (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress, 32(April), 501–510.
- Bimboim, H. C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., & Jensenayb, R. G.** (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, Vol. 7, 1099-1 11 1, July 1995
- Bradford, M.** (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., & Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5, 376–379.
- Cheung, C. Y. M., Poolman, M. G., Fell, D. a, Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J.** (2014). A Diel Flux Balance Model Captures Interactions between Light and Dark Metabolism during Day-Night Cycles in C3 and Crassulacean Acid Metabolism Leaves. *Plant Physiology*, 165(2), 917–929. doi:10.1104/pp.113.234468
- Clifford, S. C., Arndt, S. K., Corlett, J. E., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M., & Jones, H. G.** (1998). The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 967–977. doi:10.1093/jxb/49.323.967
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., ... Gilliham, M.** (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*, 9(1), 4. doi:10.1186/1746-4811-9-4
- De Angeli, A., Zhang, J., Meyer, S., & Martinoia, E.** (2013). AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 4, 1804. doi:10.1038/ncomms2815

- De Silva, N. S.** (1978). Phospholipid and Fatty Acid Metabolism in Relation to Hardiness and Vernalization in Wheat during Low Temperature Adaptation to Growth. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 86(4), 313–322. doi:10.1016/S0044-328X(78)80268-2
- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R.** (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, 72(3), 313–27. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x
- Wic, S.** (2009). Charakterisierung vakuolärer Transportproteine aus Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung abiotischer Stressbedingungen.
- Eisenhut, M., Bauwe, H., & Hagemann, M.** (2007). Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 232–7. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00960.x
- Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M. A., Traub, M., Martinoia, E., & Neuhaus, H. E.** (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
- Ezaki, B., Katsuhara, M., Kawamura, M., & Matsumoto, H.** (2001). Different Mechanisms of Four Aluminum (Al)-Resistant Transgenes for Al Toxicity in *Arabidopsis* 1, 127(November), 918–927. doi:10.1104/pp.010399.918
- Fernie, A. R., & Martinoia, E.** (2009). Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry*, 70(7), 828–32. doi:10.1016/j.phytochem.2009.04.023
- Frei, B.** (2010). Molekulare und physiologische Analysen zur Funktion des vakuolären Malattransporters (AttDT) für die Regulation der Stomataapertur von *Arabidopsis*.
- Gardner, W. K., Barber, D. A., Parbery, D. G., Lupins, C. I., & Polymers, L. P.** (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L . III . The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil / root interface is enhanced, 124, 107–124.
- Gusta, L. V, Wisniewski, M., Nesbitt, N. T., Gusta, M. L., & W, W. V. M.** (2004). The Effect of Water, Sugars, and Proteins on the Pattern of Ice Nucleation and Propagation in Acclimated and Nonacclimated *Canola* Leaves 1, 135(July), 1642–1653. doi:10.1104/pp.103.028308.blocks
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>

- Hare, P. D., Cress, W. a., & Van Staden, J.** (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6), 535–553. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x
- Haruta, M., Burch, H. L., Nelson, R. B., Barrett-Wilt, G., Kline, K. G., Mohsin, S. B., ... Sussman, M. R.** (2010). Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17918–29. doi:10.1074/jbc.M110.101733
- Horton.** (2009). Biochemie 2009 - 4.Auflage
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., ... Muller, B.** (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, 154(1), 357–72. doi:10.1104/pp.110.157008
- Hurth, M. A.** (2005). Charakterisierung eines vakuolären Dikarboxylat- transporters aus *Arabidopsis thaliana* (L .) Heynh. (November).
- Hurth, M. A., Suh, S. J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., ... Germany, M. A. H.** (2005). Impaired pH Homeostasis in *Arabidopsis* Lacking the Vacuolar Dicarboxylate Transporter and Analysis of Carboxylic Acid Transport across the Tonoplast 1, 137(March), 901–910. doi:10.1104/pp.104.058453.1
- Iba, K.** (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 225–45. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhul, J.** (1997). Genetic Analysis of Osmotic and Cold Stress Signal Transduction in *Arabidopsis*: Interactions and Convergence of Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways, 9(November), 1935–1949.
- Iwasaki, I., Arata, H., Kijima, H., & Nishimura, M.** (1992). Two Types of Channels Involved in the Malate Ion Transport across the Tonoplast of a Crassulacean Acid Metabolism Plant1, 1494–1497.
- Janská, a, Marsík, P., Zelenková, S., & Ovesná, J.** (2010). Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 12(3), 395–405. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x
- Klemens, P. A. W., Patzke, K., Trentmann, O., Poschet, G., Michael, B., Schulz, A., ... Neuhaus, H. E.** (2013). Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. *New Phytologist* (2014) 202: 188–197

- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollack, D., & Dietz, K.** (2003). New Insight Into the Structure and Regulation of the Plant Vacuolar H⁺-ATPase, 35(4).
- Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaff, J. E., Ohta, H., Kochian, L. V., ... Koyama, H.** (2013). Molecular and physiological analysis of Al³⁺ and H⁺ rhizotoxicities at moderately acidic conditions. *Plant Physiology*, 163(1), 180–92. doi:10.1104/pp.113.222893
- Kobayashi, Y., Ohyama, Y., Kobayashi, Y., Ito, H., Iuchi, S., Fujita, M., ... Koyama, H.** (2014). STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(2), 311–22. doi:10.1093/mp/sst116
- Kovermann, P., Meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., ... Martinoia, E.** (2007). The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 52(6), 1169–80. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03367.x
- Levitt, J.** (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses Chilling, Freezing and High Temperature Stresses *Gebundene Ausgabe – Juni 1972*.
- Liu, J., Luo, X., Shaff, J., Liang, C., Jia, X., Li, Z., ... Kochian, L. V.** (2012). A promoter-swap strategy between the AtALMT and AtMATE genes increased Arabidopsis aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 71(2), 327–37. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04994.x
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., & Kochian, L. V.** (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 57(3), 389–99. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03696.x
- Livingston, D. P., Premakumar, R., & Tallury, S. P.** (2006). Carbohydrate partitioning between upper and lower regions of the crown in oat and rye during cold acclimation and freezing. *Cryobiology*, 52(2), 200–8. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.11.001
- Lüttge, U., & Ball, E.** (1979). Electrochemical Investigation of Active Malic Acid Transport at the Tonoplast into the Vacuoles of the CAM Plant *Kalancho daigremontiana*, 422, 401–422.
- Lüttge, Kluge, Bauer** (2005). Botanik. 5. Auflage
- Lyons, J.** (1973). Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.24.060173.002305>

- Ma, J. F., Ryan, P. R., & Delhaize, E.** (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273–278. doi:10.1016/S1360-1385(01)01961-6
- Mahmood, T., & Yang, P. C.** (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Mandel, M., & Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159–162.
- Marin, B., Smith, J. A. C., & Lüttge, U.** (1981). The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of *Hevea brasiliensis*. *Planta* 9, 486–493.
- Marschner, H., Romheld, V., Horst, W. J., & Martin, P.** (1986). Root-induced changes in the rhizosphere : Importance for the mineral nutrition of plants, 456, 441–456.
- Marty, F., De, L., Cellulaire, B., Es, U. P. R., Bourgogne, U. De, & Cedex, D.** (1999). Plant Vacuoles, 11(April), 587–599.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A. R., & Martinoia, E.** (2010). Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends in Plant Science*, 15(1), 40–7. doi:10.1016/j.tplants.2009.10.002
- Michal** (1999). Biochemical Pathways: Biochemie-Atlas Gebundene Ausgabe. Spektrum Akademischer Verlag
- Murashige, T.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, 15.
- Narang, R. A., Bruene, A., & Altmann, T.** (2015). Analysis of Phosphate Acquisition Efficiency in Different *Arabidopsis* Accessions.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K.** (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461(3), 205–210. doi:10.1016/S0014-5793(99)01451-9
- Oleski, N., Mahdavi, P., & Bennett, A. B.** (1987). Transport Properties of the Tomato Fruit Tonoplast1, 997–1000.
- Pajor, A. M.** (1996). Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human.
- Pajor, A. M.** (2007). Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters, 451(5), 597–605.

- Picault, N., Hodges, M., Palmieri, L., & Palmieri, F.** (2004). The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 9(3), 138–46. doi:10.1016/j.tplants.2004.01.007
- Rentsch, D., & Martinoia, E.** (1991). Citrate transport into barley mesophyll vacuoles - comparison with malate-uptake activity. *Planta*, 184(4), 532–7. doi:10.1007/BF00197903
- Russell, D. W., & Sambrook, J.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour. Cold Spring Harbour, New York. Retrieved from www.molecularcloning.com
- Ryan, P. R., & Delhaize, E.** (2001). Function and Mechanism of organic anion Exudation from Plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. 52:527–60
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491.
- Sakano, K.** (1998). Revision of Biochemical pH-Stat: Involvement of Alternative Pathway Metabolisms. *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 467–473. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029393
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York (pp. 931–957).
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., ... Koyama, H.** (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiology*, 150(1), 281–94. doi:10.1104/pp.108.134700
- Schulze, W. X., Schneider, T., Starck, S., Martinoia, E., & Trentmann, O.** (2012). Cold acclimation induces changes in *Arabidopsis* tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 69(3), 529–41. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04812.x
- Sharp R. E., Davies D. J.** (1979). Solute Regulation and Growth by Roots and Shoots of Water-Stressed Maize Plants, 4349, 43–49.
- Shimada, T., Nakano, R., Shulaev, V., Sadka, A., & Blumwald, E.** (2006). Vacuolar citrate/H⁺ symporter of *citrus* juice cells. *Planta*, 224(2), 472–80. doi:10.1007/s00425-006-0223-2
- Smith, F. A., & Raven, J. A.** (1979). Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol* 1979. 30:289-311
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*1. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–30. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2

- Szecowka, M., Heise, R., Tohge, T., Nunes-Nesi, A., Vosloh, D., Huege, J., ... Arrivault, S.** (2013). Metabolic fluxes in an illuminated *Arabidopsis* rosette. *The Plant Cell*, 25(2), 694–714. doi:10.1105/tpc.112.106989
- Thomashow, M. F.** (1994). *Arabidopsis thaliana* as a Model for Studying Mechanisms of Plant Cold Tolerance, 807–834.
- Venekamp, J. H.** (1989). Minireview Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought, 112–117.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A.** (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Wanner, L. A., & Junttila, O.** (1999). Cold-Induced Freezing Tolerance in *Arabidopsis* 1, 120(June), 391–399.
- Weigel, D., Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I. I., Heyer, A. G., Reinders, J., ... Neuhaus, H. E.** (2011). A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 68(5), 890–900. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04739.x
- Winter, H., Robinson, D. G., Heldt, H. W., Pflanze, B. Der, & Karspfile, U.** (1994). Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves, 49, 530–535.
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., ... Neuhaus, H. E.** (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell*, 18(12), 3476–90. doi:10.1105/tpc.106.047290
- Wormit, A.** (2006). Charakterisierung von vakuolären Monosaccharidtransportern aus *Arabidopsis thaliana*.
- Wu, B. H., Quilot, B., Génard, M., Kervella, J., & Li, S. H.** (2005). Changes in sugar and organic acid concentrations during fruit maturation in peaches, *P. davidiana* and hybrids as analyzed by principal component analysis. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 429–439. doi:10.1016/j.scienta.2004.08.003
- Yoshida, S., Hotsubo, K., Kawamura, Y., Murai, M., & Arakawa, K.** (1999). Alterations of Intracellular pH in Response to Low Temperature Stresses, (Lyons 1973), 225–236.
- Zell, M. B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E. V, Edwards, G. E., ... Maurino, V. G.** (2010). Analysis of *Arabidopsis* with highly reduced levels of malate

and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiology*, 152(3), 1251–62. doi:10.1104/pp.109.151795

Zoglowek, C., Kromer, S., & Heldt, H. W. (1988). Oxaloacetate and Malate Transport by Plant Mitochondrial Republic of Germany, 109–115.

7. Anhang

7.1 Klonierungsstrategie

Um den AtTDT heterolog in Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* zu exprimieren, wurde die cDNA des TDT über den AtTDT-HA-for Primer (Kap. 2.5) mittels PCR (Kap. 2.4.5) durch einen N-terminalen HA-Tag erweitert und in den Oozyten-spezifischen Expressionsvektor pGemHJ integriert. Hierfür wurde der Vektor pGemHJ mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* verdaut (Kap. 2.4.6) und mit dem PCR-Produkt ligiert (Kap. 2.4.7). Die Orientierung des HA::AtTDT wurde anschließend mittels Testverdau durch die Restriktionsendonuklease *PstI* kontrolliert.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Amp	Ampicilin
<i>A. thaliana</i> , <i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADP /ATP	Adenosindiphosphat / Adenosintriphosphat
ALMT	Aluminium activated malate transporter
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH ₃ COOH	Essigsäure
cm	Zentimeter
CT	cycle treshold
CuSO ₄	Kupfersulfat
DDM	n-Dodecyl β-D-Maltopyranoside
(g)DNA	(genomische) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
(d)NTP	(Desoxyribo)nukleosidtriphosphat

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fd	Ferredoxin
Fe-EDTA	Eisen- Ethylendiamintetraessigsäure
FW	Frischgewicht („freshweight“)
g	Erdbeschleunigung
Gen	Gentamycin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinol]-Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	„high pressure liquid chromatographie“
IC	Ionenchromatographie
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCH ₃ CO ₂	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KNO ₃	Kaliumnitrat
KOH	Kaliumhydroxid
λ	Lambda (Wellenlänge)
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro
m	Meter
m	milli
M	Molar
MATE	multidrug and toxic compound extrusion proteins
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl ₂	Manganchlorid
MnSO ₄	Mangansulfat
mol	Einheit für die Stoffmenge
MOPS	2-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MS-Medium	MURASHIGE & SKOOG Medium
n	Nano
N	Normal
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
Na(CH ₃ COO)	Natriumacetat
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NaDC	Sodium dependent dicarboxylate transporter
NaP _i	Natrium-Phosphat
NaCT	Sodium coupled citratetransporter
NaS	Sodium dependent sulphate transporter
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NO ₃ ⁻	Nitrat
OD	optische Dichte
ψ	Psi
p	Picco
p	p-Wert, Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus
P _i	anorganisches Phosphat
RFP	Rot fluoreszierendes Protein

Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
s	Sekunde(n)
SDS (PAGE)	Natriumdodecylsulfat (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SSC	Standard Salin Citrat
SLC13	Solute Carrier Family
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGA	Tricin-Gluconsäure-Liposomen Puffer
TGL	Tricin-Gluconsäure-Aufnahme Puffer
TDT	Tonoplast dicarboxylate transporter
Tet	Tetrazyklin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
V	Volt
Vol	Volumen
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

7.3 Vorträge und Poster auf wissenschaftlichen Tagungen

Vorträge:

„The Tonoplast Dicarboxylate Transporter and its role in malic and citric acid metabolism“, Gastvortrag, 17. Juni 2014, *University of Alberta*, Edmonton, Kanada

„Biochemical and physiological characterization of the tonoplast dicarboxylate transporter (TDT) in *Arabidopsis thaliana*“, Meeting der FOR 1061 “Dynamic storage functions of plant vacuoles”, 24. November 2014, TU Kaiserslautern

„Characterization of the tonoplast dicarboxylate transporter (TDT) in *Arabidopsis thaliana*“, Fachbereichs-Seminar Biologie, 04. Dezember 2014, Thallichtenberg

Poster:

„Tonoplast carboxylate Transporters“, Botanikertagung “Diversity makes the difference”, 18-23. September 2011, Berlin

7.4 Publikationen

Cohen S, Itkin M, Yeselson Y, Tsurii G, Portnoy V, Harel-Beja R, Lev S, Sa'ar U, Davidovitz-Rekanati R, Baranes N, Bar E, Wolf D, Petreikov M, Shen S, Ben-Dor S, Rogachev I, Aharoni A, Ast T, Schuldiner M, Belausov E, Eshed R, Ophir R, Sherman A, Frei B, Neuhaus HE, Xu Y, Fei Z, Giovannoni J, Lewinsohn E, Tadmor Y, Paris H, Katzir N, Burger Y, Schaffer A (2014) The PH gene determines fruit acidity and contributed to the evolution of sweet melons. *Nature Comm.* 5, Article number: 4026, doi:10.1038/ncomms5026

Curriculum Vitae

Name

Benedikt Frei

Schullaufbahn

08/91 - 06/95 Grundschule Moorbachtal, Steinwenden

08/95 - 03/04 Sickingen-Gymnasium, Landstuhl
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/04 - 05/10 Studium der Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern

09/09 - 05/10 Diplomarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Neuhaus

Titel: Molekulare und physiologische Analysen zur Funktion des vakuolären Malattransporters (AtTDT) für die Regulation der Stomataapertur von *Arabidopsis*

Promotion

06/10 - 05/15 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern unter Leitung von Prof. Dr. Neuhaus

Thema: Weiterführende biochemische und physiologische Analysen zum tonoplastidären Dicarboxylat Transporter TDT in *Arabidopsis thaliana*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei mehreren Personen bedanken, die zum Erlangen dieser Arbeit beigetragen haben oder mich auf diesem Weg unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus dafür bedanken, dass ich die letzten Jahre in seiner Arbeitsgruppe meine Diplomarbeit schreiben durfte, sowie dafür, dass ich von Ihm im Anschluss die Möglichkeit erhalten habe, an meinem Thema weiterzuarbeiten und in der Abteilung Pflanzenphysiologie promovieren durfte.

Bei Prof. Dr. Matthias Hahn möchte ich mich für das Übernehmen des Zweitgutachtens bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim Deitmer für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission bedanken.

Bei Prof. Dr. Xing-Zhen Chen, sowie bei den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe an der *University of Alberta* in Edmonton, Kanada, möchte ich mich für die Kooperation, sowie die sehr nette Atmosphäre und die herzliche Gastfreundschaft bedanken, die mir in der kurzen Zeit, die ich dort verbringen durfte, zuteilwurde.

Bei Dr. Oliver Trentmann möchte ich mich für die Betreuung während meiner Diplomarbeit, sowie die anfängliche Betreuung während meiner Dissertation ebenfalls bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Pflanzenphysiologie für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit, sowohl außerhalb, als auch im Labor bedanken. Insbesondere möchte ich hierbei einigen auch namentlich danken.

Den „Jungs“ im Hinteren Labor, Benjamin, Patrick, Sebastian N. und Sebastian H. möchte ich für die Freundschaft und die fachliche Hilfestellung bei Fragen rund ums Labor Danke sagen.

Bei Christopher möchte ich mich für die zahlreichen Kaffeepausen bei Hortons, sowie die Zeit, die er sich für mich in Kanada genommen hat herzlich bedanken, da Er mir somit meine Anwesenheit in Edmonton deutlich erleichtert hat.

Bei Kathrin Patzke möchte ich mich für unsere regelmäßigen „Kletterdates“ bedanken, bei denen man so manchen Frust hinter sich lassen konnte.

Ruth und Sabrina möchte ich jeweils für die Versorgung mit allem Rund ums Labor, mehr noch aber für Ihr offenes Ohr bei Fragen außerhalb des Labors Danke sagen.

Wolfgang möchte ich für alles danken, was er mir über die IC beigebracht hat.

Bei Ute möchte ich mich ebenfalls bedanken, dafür, dass Sie etwas Ordnung ins Chaos des Laboralltags gebracht hat und auch immer ein offenes Ohr für mich übrig hatte.

Christa möchte ich für alle organisatorischen Fragen und für Ihre Hilfe bei sonst allem, was mit Verwaltung zu tun hat, danken.

Bei Sandra, Dennis und Sebastian möchte ich mich ebenfalls für viele, herausfordernde Spieleabende bedanken, die einem oftmals den Laboralltag vergessen ließen.

Bei Anja, Jacky, Steffi, Patrick (und nochmal bei Sebastian) möchte ich mich dafür bedanken, dass sie die Fackel der Brettspiele-Herausforderungen weiter tragen.

Vielen Dank an meine Diplom- und Bachelorstudenten Lorian, Rafael und Felix, die mir während Ihrer Zeit im Labor tatkräftig unter die Arme gegriffen haben.

Letztlich möchte ich insbesondere meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors Danke dafür sagen, dass Sie mich aufgebaut haben, wenn es im Labor mal nicht so gut gelaufen ist und Sie mich auch immer auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt haben, wenn ich mal übermütig wurde.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere weiterhin, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, im Mai 2015

Benedikt Frei