



Regulation von Zucker- und Ionentransport in  
*Arabidopsis thaliana* mit besonderer  
Berücksichtigung von Transportern und  
regulatorischen Proteinen

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Kerstin Duscha**

Kaiserslautern, im September 2016

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 09.12.2016

D386

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus
2. Herr Prof. Dr. Joachim W. Deitmer

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Natriumaufnahme und seine Auswirkungen auf die Pflanze .....	2
1.2 Kationen-Protonen-Antiporter.....	5
1.2.1 Salt-Overly-Sensitive (SOS) Signalweg .....	6
1.2.2 <i>AtNHX</i> Transporter .....	11
1.3 14-3-3 regulatorische Proteine.....	11
1.4 Zuckertransporter und Zuckerhomöostase .....	14
1.5 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	18
2.2 Pflanzenspezifische Methoden .....	18
2.2.1 Pflanzenmaterial.....	18
2.2.2 Pflanzenanzucht .....	19
2.2.2.1 Anzucht auf Erde .....	19
2.2.2.2 Anzucht in Hydrokultur.....	19
2.2.2.3 Anzucht in Sterilkultur .....	20
2.2.3 Oberflächensterilisation der Samen .....	21
2.2.4 Selektion von homozygoten Überexpressionspflanzen.....	21
2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
2.2.6 Stressexperimente.....	22
2.2.7 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) .....	23
2.3 Physiologische Methoden.....	23
2.3.1 Extraktion von Zuckern, Aminosäuren und Ionen .....	23
2.3.2 Extraktion und Quantifizierung von Stärke .....	23
2.3.3 Quantifizierung von Zuckern und Ionen mittels Ionenchromatographie .....	24

---

2.3.4	Quantifizierung der freien Aminosäuren.....	24
2.3.5	Herstellung von Blatthextrakt .....	25
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.4.1	Herstellung transgener Organismen .....	25
2.4.2	Verwendete Oligonukleotide.....	26
2.4.3	Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte.....	29
2.4.4	Verwendete Bakterienstämme.....	30
2.4.5	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
2.4.6	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i> .....	33
2.4.7	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	34
2.4.8	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	34
2.4.8.1	Mini-Plasmid-Präparation .....	34
2.4.8.2	Plasmid-Präparation mittels QIAprep® Spin Methode.....	35
2.4.9	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	35
2.4.10	<i>In vitro</i> Manipulation und Ligation von DNA .....	36
2.4.11	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.4.12	DNA-Amplifikation mittel Polymerase-Ketten-Reaktion .....	37
2.4.13	DNA Sequenzanalyse.....	37
2.4.14	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i> : „RNeasy® Plant Mini Kit“ .....	38
2.4.15	cDNA Synthese .....	38
2.4.16	Quantitative Real-Time-PCR .....	38
2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	39
2.5.1	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> -Zellen .....	39
2.5.1.1	SOS1 C-terminus mit GST-tag.....	39
2.5.1.2	14-3-3 Proteine mit His-Tag.....	40
2.5.2	Reinigung von rekombinantem Protein mittels Affinitäts-Chromatographie ....	40
2.5.2.1	Reinigung SOS1 C-terminus mittels Glutathion-Agarose.....	40
2.5.2.2	Reinigung der Interaktionspartner für Peptid-Spot Binde-Assay.....	41

2.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
2.5.4	SDS-PAGE.....	42
2.5.5	Western Blot und Immunoprinting .....	43
2.5.6	Dotblot-Analyse zur Proteinbestimmung in Überexpressionspflanzen .....	43
2.5.7	Pulldown-Assay mittels Affi-Gel10.....	44
2.5.8	Peptid-Spot Binde-Assay in Kooperation mit AG Zimmermann .....	45
2.5.9	Transiente Transformation von Tabakblättern mittels <i>A. tumefaciens</i> .....	46
2.5.10	<i>In planta</i> Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	46
2.5.11	Elektronische Datenverarbeitung .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1	Analyse von Pflanzen mit erhöhtem <i>AtSOS1 C-terminus</i> Transkriptgehalt.....	49
3.1.1	Generierung und Identifizierung von <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Überexpressionspflanzen .....	49
3.1.2	Anzucht auf Erde und Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung .....	53
3.1.3	Bestimmung des Frischgewichts in steriler Flüssigkultur.....	55
3.1.4	Charakterisierung der <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Überexpressionspflanzen in hydroponischer Kultur.....	57
3.1.4.1	Natriumakkumulation unter Salzstress .....	57
3.1.4.2	Transkriptgehalt des Salz-induzierten Gens <i>wrky25</i> unter Salzstress .....	61
3.1.4.3	Zuckerakkumulation unter Salzstress .....	62
3.1.4.4	Prolinakkumulation unter Salzstress .....	64
3.2	Analyse von <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen.....	65
3.2.1	Identifizierung von <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen.....	66
3.2.2	Anzucht auf Erde und Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung .....	67
3.2.3	Charakterisierung der <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen in Hydrokultur .....	69
3.2.3.1	Natriumakkumulation unter Salzstress .....	70
3.2.3.2	Kaliumgehalt unter Salzstress .....	72
3.2.3.3	Transkriptgehalt des Salz-induzierten Gens <i>wrky25</i> .....	74

3.2.3.4	Zuckerakkumulation unter Salzstress .....	74
3.2.4	Wurzelwachstum auf 100 mM NaCl.....	76
3.3	Interaktionsstudien zum <i>AtSOS1</i> C-terminus.....	77
3.3.1	Rekombinante Aufreinigung von <i>SOS1</i> C-terminus in <i>E. coli</i> .....	78
3.3.2	Pulldown-Assay mittels Affi-Gel10 Säule.....	79
3.3.3	Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC).....	81
3.3.4	Peptid-Spot Binde-Assay von <i>AtSOS1</i> C-terminus .....	84
3.4	Interaktionsstudien zu <i>At14-3-3</i> $\kappa$ und $\lambda$ .....	86
3.4.1	BiFC-Studien zwischen <i>At14-3-3</i> $\kappa$ und $\lambda$ und <i>AtTST1</i> .....	86
3.4.2	Peptid-Spot Analyse der Bindung von <i>14-3-3</i> $\kappa$ , $\lambda$ mit dem <i>AtTST1</i> Loop .....	87
3.4.3	BiFC-Studien zwischen <i>At14-3-3</i> $\kappa$ und $\lambda$ und <i>AtVIK1</i> .....	88
3.5	Physiologische Analysen von <i>At14-3-3</i> $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen .....	89
3.5.1	Wachstum auf Hochsaccharosebedingungen .....	89
3.5.2	Wachstum auf Hochglukosebedingungen .....	92
3.5.3	Analyse von <i>CAB1</i> und <i>SUC2</i> unter Hochglukosebedingungen.....	94
4	<b>Diskussion</b> .....	96
4.1	Molekulare und physiologische Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhtem <i>AtSOS1</i> C-terminus Transkriptgehalt .....	97
4.1.1	Die Überexpression des <i>SOS1</i> C-terminus führt zur erhöhten Salztoleranz .....	98
4.1.1.1	Analyse und Bestätigung der erhöhten Salztoleranz in Hydrokultur .....	101
4.1.1.2	Molekulare und metabolische Indikatoren bestätigen erhöhte Salztoleranz der <i>SOS1</i> C-terminus Mutanten .....	103
4.2	Molekulare und physiologische Charakterisierung von <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen..	106
4.2.1	<i>sos1</i> Knockout-Pflanzen sind sehr sensitiv gegenüber Salzstress.....	106
4.2.1.1	Molekulare und metabolische Indikatoren bestätigen erhöhte Salzsensitivität der <i>sos1</i> Knockout-Mutanten.....	109
4.3	<i>AtSOS1</i> C-terminus interagiert mit den <i>At14-3-3</i> Proteinen $\nu$ , $\omega$ , $\lambda$ und $\kappa$ .....	110
4.4	<i>AtSOS1</i> C-terminus interagiert mit <i>CPK3</i> .....	112

---

4.5	Zusammenfassung und Hypothese der Regulation am SOS1 C-terminus .....	114
4.6	Physiologische Charakterisierung von <i>At14-3-3 λκ</i> Knockout-Pflanzen .....	119
4.6.1	<i>At14-3-3 λ</i> und <i>κ</i> interagieren mit <i>AtTST1</i> und <i>AtVIK1</i> .....	119
4.6.2	Wachstum von <i>14-3-3 λκ</i> Knockout-Pflanzen auf Zucker .....	120
4.7	Zusammenfassung und Hypothese der Regulation der Zuckerhomöostase .....	122
5	<b>Ausblick</b> .....	127
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	129
7	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	130
8	<b>Anhang</b> .....	148
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	148
8.2	Tabellenverzeichnis .....	150
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	151
8.4	Physiologische Untersuchung von <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Mutanten .....	154
8.5	Physiologische Untersuchung von <i>λκ</i> Knockout-Mutanten .....	156
8.6	Peptid-Spot Binde-Assays .....	157
8.7	Untersuchung der Eluatfraktionen aus den Pulldown-Assays .....	158
8.8	Beladungsmuster der Zellulosemembranen für Peptid-Spot Binde-Assays .....	168

## 1 Einleitung

Laut Definition bedeutet Versalzung die Akkumulation wasserlöslicher Salze im Boden, in einem Ausmaß, welches sich auf die landwirtschaftliche Produktion, die Umwelt und das ökologische Gemeinwohl auswirkt (Rengasamy, 2006). Durch ungeeignete Bewässerungs- und unangebrachte Anbaumaßnahmen sind weltweit bereits rund 800 Millionen Hektar Landfläche und fast die Hälfte aller bewässerten, landwirtschaftlich genutzten Flächen durch zu hohe Salzkonzentrationen belastet (Rengasamy, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Grund hierfür ist, dass die im Wasser gelösten Salze nach der Verdunstung des Wassers im Boden verbleiben und dort anreichern (Ward *et al.*, 2003). Besonders problematisch wird dies in ariden und semiariden Regionen, wie beispielweise in weiten Teilen Australiens oder Nordafrikas, wo die Verdunstung größer ist als der auftretende Niederschlag (Rengasamy, 2006; Wicke *et al.*, 2011). In diesen Regionen können NaCl-Konzentrationen von 50-100 mM im Boden auftreten, während in gemäßigten Zonen die NaCl-Konzentrationen mit lediglich 0,1-1 mM deutlich unter diesen Werten liegen (Marschner, 1995). Salzstress gehört damit zu den bedeutendsten abiotischen Stressfaktoren und limitiert nicht nur das Wachstum, sondern auch den Ertrag sowie die geographische Verteilung von Pflanzen (Zhang *et al.*, 2012).

Pflanzen sind autotrophe Organismen und benötigen Wasser, Kohlenstoffdioxid und Licht, um daraus energiereiche Photoassimilate, wie Zucker, Stärke und Proteine herzustellen. Ist einer dieser Faktoren nur begrenzt zugänglich, nehmen die Photosyntheserate und damit auch das Wachstum und schließlich die Produktivität der Pflanze ab (Hasegawa *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2000). Ursache für die geringere Verfügbarkeit von Wasser ist die übermäßige Anreicherung von gelösten Salzen im Boden. Dadurch wird das Wasserpotenzial des Bodens drastisch reduziert, bis es schließlich niedriger ist als das Wasserpotenzial in der Wurzel der Pflanzen. Da Wasser immer vom Ort des höheren zum Ort des niedrigeren Wasserpotenzials fließt, verliert die Pflanze auf diese Weise sogar noch Wasser (Hasegawa *et al.*, 2000). Der eingestellte Wassertransport führt schließlich zu einem verminderten Import von Nährstoffen, wie beispielsweise Kalium oder Phosphor (Brini & Masmoudi, 2012). Primär äußert sich Salzstress somit als hyperosmotischer Stress und einer damit einhergehenden Störung des Ionen-Gleichgewichts (Munns, 2002; Munns, 2005; Munns & Tester, 2008).

### 1.1 Natriumaufnahme und seine Auswirkungen auf die Pflanze

Als „Makronutrient“ ist Kalium nicht nur an einer Vielzahl von biochemischen und physiologischen Prozessen in der Zelle beteiligt, sondern fördert auch das Überleben der Pflanze während biotischen sowie abiotischen Stressbedingungen (Wang, Zheng *et al.*, 2013; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Mit einer intrazellulären Konzentration von 100 mM bis 200 mM ist Kalium der am häufigsten vorkommende Nährstoff in der pflanzlichen Zelle und spielt als wichtigstes Osmotikum u.a. eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellturnovers und der Schließung der Stomata-Öffnungen (Niu *et al.*, 1995; Wang, Zheng *et al.*, 2013). Weiterhin ist Kalium an der Aktivierung von Enzymen, der Proteinsynthese, dem Phloemtransport und dem Energie-Transfer beteiligt (Marschner, 1995; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Hohe Natriumkonzentrationen führen somit zu einem zusätzlichen Wasserverlust durch Transpiration und letztlich zu einer Einschränkung des Metabolismus und der Photosynthese. Natrium-Ionen, die vor allem unter Salzstressbedingungen meist das vorherrschende Ion im Boden darstellen, können aufgrund ihres zu Kalium-Ionen sehr ähnlichen hydratisierten Ionen-Radius die gleichen Kanäle nutzen, um in die Pflanze zu gelangen (Shabala & Cuin, 2008; Wang, Zheng *et al.*, 2013). Kanäle, wie der High-Affinity  $K^+$ -Transporter HKT1, besitzen neben einer Affinität für Kalium auch eine substantielle Affinität für Natrium und transportieren dieses ebenfalls in die Pflanzenzelle (Rubio *et al.*, 1995; Uozumi *et al.*, 2000; Rus *et al.*, 2001). Bei Salzstress liegt Natrium in so hoher Konzentration im Boden vor, dass es mit den Kalium-Ionen um die Bindestellen an den Transportern erfolgreich konkurriert und diese letztlich verdrängt. Des Weiteren kann Natrium, obwohl es kein essentieller Nährstoff ist, entlang seines elektrochemischen Gradienten über sogenannte Nicht-Selektive-Kationen-Kanäle (non-selective-cation-channels = NSCCs) in die Zelle gelangen (Shabala & Cuin, 2008; Ward *et al.*, 2003). Dadurch wird der elektrische Gradient für Kalium vermindert und dessen Einstrom weiter eingeschränkt (Shabala, 2003). Weiterhin führt diese Depolarisation der Membran zur Öffnung von Spannungs-aktivierten Kalium-Auswärtsgerichteten-Kanälen (KOR = Kalium outward-rectifying Channels; Shabala *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009; Wang, Zheng *et al.*, 2013).

Unter ambienten Bedingungen liegt Natrium in einer Konzentration von 1-10 mM im Zytosol vor (Schulze *et al.*, 2002). Um dieses hohe intrazelluläre  $K^+/Na^+$ -Verhältnis aufrechtzuerhalten, haben Pflanzen hochkomplexe Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe sie die Natrium-Konzentration im Zytosol möglichst niedrig halten (Maathius & Amtmann, 1999). Dabei handelt es sich um die Limitierung der Natriumaufnahme aus dem Boden, die Kompartimentierung toxischer Mengen von Natrium in der Vakuole und dem Export von



Natrium aus der Zelle über die Plasmamembran (Tester & Davenport, 2003; Cosentino *et al.*, 2010). Bei den beiden letzteren handelt es sich um aktive Prozesse, die von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern unter Verbrauch von ATP durchgeführt werden (Munns, 2005). Salzstress führt somit neben dem schnell eintretenden osmotischen Stress, ausgelöst durch hohe Salzkonzentrationen im Boden, sekundär auch zu einem toxischen Ionen-Stress durch übermäßige Akkumulation im Zytosol (Munns, 2002; Munns, 2005; Munns & Tester, 2008). Eine Konzentration von ungefähr 100 mM NaCl im Zytosol ist äußerst toxisch, da Natrium Kalium von den Bindestellen vieler Proteine verdrängt und somit nicht nur die Enzymaktivität hemmt, sondern auch die Proteinbiosynthese inhibiert (Mäser *et al.*, 2002; Blumwald *et al.*, 2000). Schließlich führt Salzstress auch zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) in der Zelle, wie beispielsweise  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  oder  $\cdot\text{OH}^-$  (Miller *et al.*, 2010; Bose *et al.*, 2014). Diese Substanzen stören die zelluläre Redox-Homöostase und führen zu oxidativen Schäden (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006).

Anhand ihrer Toleranz gegenüber Salzstress können Pflanzen in zwei Gruppen unterteilt werden: Glykophyten und Halophyten. Glykophyten sind äußerst sensitiv gegenüber höheren Salzkonzentrationen im Boden und weisen bereits ab einer NaCl-Konzentration von 25 mM erste Wachstumsstörungen auf (Munns, 2002; Golldack, 2003). Dieser Gruppe gehören die Meisten aller existierenden Kulturpflanzen an. Halophyten sind in der Lage auch unter extremen Salzbedingungen noch Wachstum aufzuweisen und tolerieren Konzentrationen bis 500 mM NaCl und teilweise auch mehr im Boden (Marschner, 1995). Darüber hinaus kann eine weitere Unterteilung in obligate und fakultative Halophyten vorgenommen werden. Obligate Halophyten wachsen ausschließlich an Salzstandorten und benötigen eine bestimmte Konzentration an Salz zum Überleben. Fakultative Halophyten können zwar auf salzbelasteten Böden wachsen, ihr Optimum liegt aber im moderaten Salzbereich (Flowers *et al.*, 1977; Yeo & Flowers, 1980). Halophyten haben besondere Mechanismen entwickelt, um an extrem salzhaltigen Standorten wachsen zu können, und werden anhand dieser Mechanismen weiterhin in zwei Untergruppen differenziert: die Salz-„Excluder“ und die Salz-„Includer“. Salz-„Excluder“ schränken den passiven Influx von NaCl in die Wurzel beispielsweise durch die Erweiterung des Caspary-Streifen oder durch das Vorhandensein einer zweiten Endodermis ein (Marschner, 1995; Stelzer & Läuchli, 1977b). Zusätzlich fördern sie gezielt die Aufnahme von Kalium durch hochaffine  $\text{K}^+$ -Transporter, welche eine hohe Selektivität für Kalium über Natrium besitzen (Aléman *et al.*, 2009).

Demgegenüber stehen die sogenannten Salz-„Includer“, deren Anpassungsmechanismus in der spezifischen Verteilung von Salzionen auf bestimmte Gewebe bzw. bestimmte

Zellkompartimente liegt (Greenway & Munns, 1980). Ziel dieser Kompartimentierung von Salzionen ist es, die Natriumakkumulation im Spross möglichst gering zu halten, bzw. vor allem die jungen, grünen Blätter vor zu hohen Natriumkonzentrationen zu schützen, da hier vorwiegend Photosynthese betrieben wird (Jeschke, 1984; Marschner, 1995; Craig Plett & Moller, 2010).

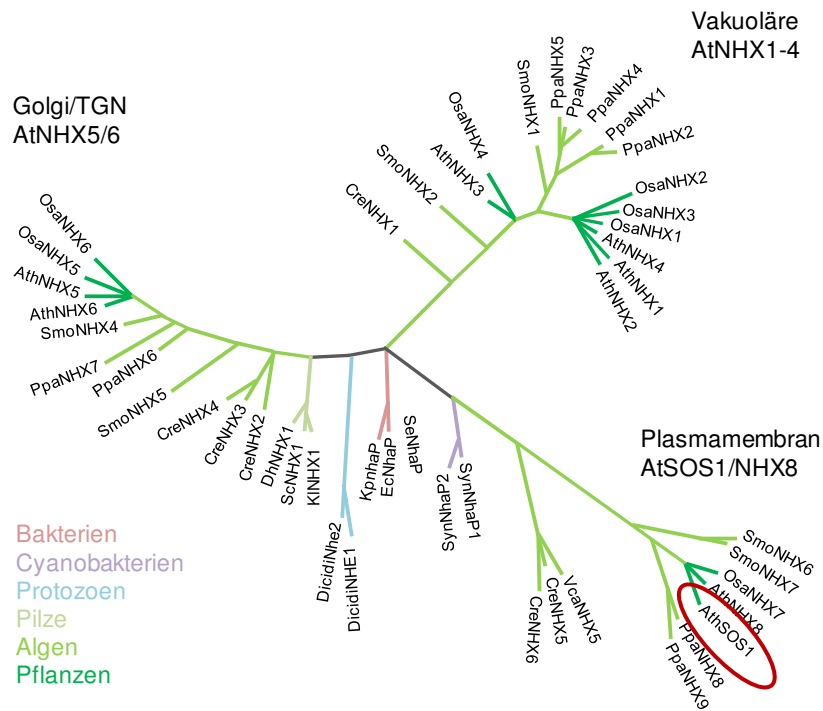
Natrium-Ionen, die bis zu einer gewissen Konzentration in die Wurzel einströmen, gelangen schließlich über die Xylem-Gefäße in den Spross (Tester & Davenport, 2003; Roy *et al.*, 2014). Verschiedene Signalwege, die die Rezirkulation von Salzionen via Phloem sowie den Rücktransport von Natrium-Ionen aus dem Xylem-Strom beinhalten, erhöhen die Salztoleranz durch gezielte Lokalisierung von Natrium in Organen und Geweben innerhalb der Pflanze, die im Notfall abgeworfen werden können, wie z.B. ältere Blätter (Cheeseman, 1988; Wolf *et al.*, 1991; Olías *et al.*, 2009; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Craig Plett & Moller, 2010). Mangrovenarten, wie beispielsweise *Avicennia marina* können einzelne Blätter abwerfen, nachdem diese bis zum Erreichen der Toxizitätsgrenze mit Salzionen angereichert wurden (Waisel *et al.*, 1986). Andere Pflanzen, wie beispielsweise das Strand-Milchkraut *Glaux maritima* besitzen spezialisierte Drüsenzellen zur Exkretion überschüssigen Salzes (Rozema & Riphagen, 1977; Zhang & Shi, 2013). Um die zytosolischen Enzyme vor einer Beeinträchtigung durch zu hohe Salzkonzentrationen zu schützen, transportieren sowohl Halophyten als auch Glykophyten anorganische Ionen aktiv in die Vakuole (Greenway & Munns, 1980; Apse *et al.*, 1999; Flowers & Colmer, 2008). Dabei besitzen die Enzyme der Halophyten generell eine ähnliche Sensitivität gegenüber Salz wie die der Glykophyten (Yeo, 1981; Blumwald *et al.*, 2000). Halophyten sind allerdings in der Lage Salzionen deutlich effizienter in die Vakuole zu pumpen und können diese Ionen somit als Osmotika nutzen, um den Wassereinstrom aus dem Boden aufrechtzuerhalten (Flowers & Colmer, 2015). Weiterhin besitzen ihre Zellmembranen eine veränderte Zusammensetzung, die den Austritt von Salzionen aus der Vakuole vermindert, und sie weisen eine erhöhte Synthese von kompatiblen Soluten im Zytosol auf (Delauney & Verma, 1993; Verma, 1999; Tester & Davenport, 2003; Parida & Das, 2004; Hasegawa *et al.*, 2000). Kompatible Solute sind kleine, lösliche Moleküle wie beispielsweise Aminosäuren (v.a. Prolin; Verbruggen & Hermans, 2008), Zucker (Saccharose oder Fruktose), Zuckeralkohole (z.B. Mannitol) und weitere Substanzen, die die zellulären Funktionen auch in hohen Konzentrationen nicht beeinträchtigen (Hu *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2016). Sie werden hauptsächlich zum Einstellen des osmotischen Gleichgewichts zwischen Vakuole und Zytoplasma nach Akkumulation großer Mengen an Ionen und somit zur Aufrechterhaltung des Wassertransports aus dem Boden in die Wurzel

synthetisiert (Bohnert *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000). Weiterhin erhöhen sie die Salztoleranz der Pflanze durch die Stabilisierung von Membranen und Makromolekülen, durch den Schutz von Enzymen vor Denaturierung und durch den Schutz zellulärer Strukturen vor oxidativen Schäden (Mansour, 2000; Sakamoto & Murata, 2002; Chen & Murata, 2002; Ashraf & Foolad, 2007; Park *et al.*, 2016).

## 1.2 Kationen-Protonen-Antiporter

Da Pflanzen sessile Organismen sind, müssen sie auf Veränderungen in ihrer Umwelt schnell und effektiv reagieren können. Abiotische Umwelteinflüsse wie beispielsweise hohe Salzkonzentrationen oder Trockenheit wirken sich negativ auf das Wachstum von Pflanzen aus (Chinnusamy *et al.*, 2004). Vor allem die hohen Konzentrationen an NaCl im Boden üben einen toxischen Ionenstress auf die Pflanze aus (Zhang & Shi, 2013). Durch die Anreicherung von löslichen Salzen wie NaHCO<sub>3</sub> oder Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kann es in Salz-belasteten Böden zusätzlich zu einem erhöhten pH-Wert durch Alkalisierung kommen (Europäische Gemeinschaften, Factsheet 4, 2009). Diese abiotischen Stressfaktoren führen zu Veränderungen im Ionenhaushalt der Pflanze und verlangen eine Regulation der Ionen- und schließlich auch der pH-Homöostase (Schulze *et al.*, 2002; Mäser *et al.*, 2001).

Zu diesem Zweck besitzen Pflanzen bestimmte Transporter, die phylogenetisch und anhand ihrer Funktion in zwei Superfamilien eingeteilt werden können: die Kationen-Protonen-Antiporter Familie 1 und 2 (CPA1 und 2; Abbildung 1.1). Die CPA2 Superfamilie besteht aus Genen, die für Kalium-Efflux-Antiporter (KEA) und Kationen-Protonen-Antiporter (CHX) kodieren, und ist noch weitestgehend unerforscht (Chanroj *et al.*, 2012). Demgegenüber steht die CPA1 Superfamilie, zu deren Mitgliedern die drei phylogenetisch-konservierten Klassen von monovalenten Natrium-Protonen-Antiportern (NHX) zählen. Diese sind in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) i) die Plasmamembran-ständigen Antiporter *AtSOS1* und *AtNHX8*, die vom prokaryotischen NhaP-Transporter abstammen, ii) die endosomalen *AtNHX5* und *6*, die zu den eukaryotischen Intrazellulären NHEs (IC-NHE) gehören und iii) die vakuolären *AtNHX1-4*, die spezifisch nur in Pflanzen vorkommen (Chanroj *et al.*, 2012). Darüber hinaus existiert in Bakterien sowie in Pflanzen eine weitere Familie von Kationen-Protonen-Antiportern, die sogenannte IT/NhaD-Transporter-Familie (Cosentino *et al.*, 2010). Der pflanzliche *AtNHD1*-Transporter katalysiert den Austausch von Natrium mit einem Proton und weist eine plastidäre Lokalisierung in der *Envelope*-Membran der Chloroplasten auf (Müller *et al.*, 2014).



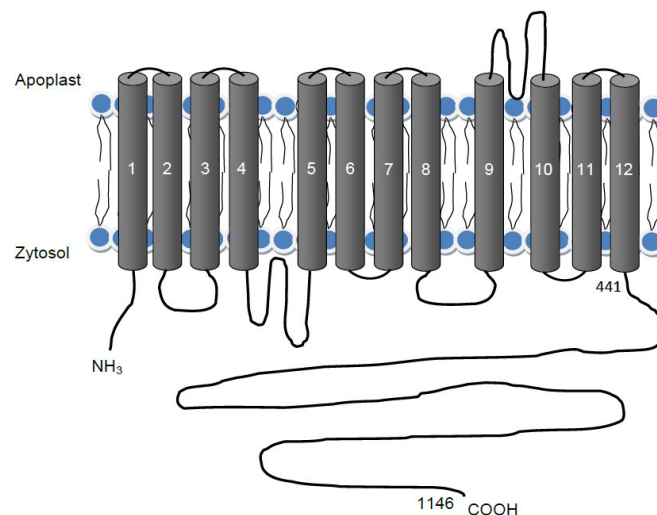
**Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen CPA1-Familie**

Auffächerung der Mitglieder der Kationen-Protonen-Antiporter 1-Familie in drei Klassen, NhaP/SOS1, endosomale AtNHX5/6 und vakuoläre AtNHX1-4. Modifiziert nach Chanroj *et al.*, 2012.

### 1.2.1 Salt-Overly-Sensitive (SOS) Signalweg

Die Arabidopsis *sos* Knockout-Mutanten konnten von Wu *et al.* (1996) im Anschluss an eine durch EMS (Ethylmethan Sulfonat) induzierte Mutagenese identifiziert werden. Die Keimlinge fielen durch ein extrem verkürztes Wurzelwachstum auf Schrägagarplatten auf, die eine erhöhte Konzentration an NaCl enthielten. Eines der gefundenen Gene kodiert für einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter, genannt Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1). Der SOS1-Antiporter gehört der Unterfamilie der NhaP-Transporter aus der Superfamilie der CPA1 Transporter an. Diese NhaP-Gruppe an Antiportern tritt sowohl in Bakterien, Protozoen als auch in Pflanzen auf (Brett *et al.*, 2005a; Pardo *et al.*, 2006). Das vorhergesagte topographische Modell der NhaP-ähnlichen Transporter ist in Abbildung 1.2 gezeigt und besteht aus 12-13 N-terminalen Transmembrandomänen, gefolgt von einer C-terminalen hydrophilen Region, die in eukaryotischen NhaP-Homologen mit einer Länge von über 600 Aminosäuren extrem verlängert ist (Shi *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum N-terminus, der hochkonserviert unter den Mitgliedern der CPA1-Superfamilie ist, ist die C-terminale Domäne des SOS1 mit knapp über 700 Aminosäuren nicht nur in Länge, sondern auch in Aminosäuresequenz einzigartig im Vergleich zu den anderen pflanzlichen NHX-Transportern

(Shi *et al.*, 2000). Weitere Homologe wurden bereits in Reis, Tomate und Weizen sowie in der halotoleranten Spezies *Thelungiella halophila* identifiziert (Vera-Estrella *et al.*, 2005; Martínez-Atienza *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Olías *et al.*, 2009; Nah *et al.*, 2009). Die höchste Sequenz-Ähnlichkeit in *A. thaliana* weist der SOS1-Antiporter mit dem AtNHX8-Transporter auf. Dieser ist ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert und katalysiert den Transport von Lithium aus der Zelle, im Austausch für ein Proton (An *et al.*, 2007). Núñez-Ramírez *et al.* (2012) konnten zudem nachweisen, dass das funktionelle SOS1-Protein als Homodimer vorliegt und, dass an der Stabilisierung intermolekulare Bindungen sowohl der N- als auch der C-terminalen Domänen beteiligt sind. Da für viele andere Transportproteine bereits bewiesen werden konnte, dass die C-terminalen Regionen mit einer Reihe von regulatorischen Proteinen interagieren, kann von einer komplexen Regulation der eukaryotischen NhaP-Antiporter ausgegangen werden (Putney *et al.*, 2002).



**Abbildung 1.2: Topographisches Modell des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters AtSOS1**

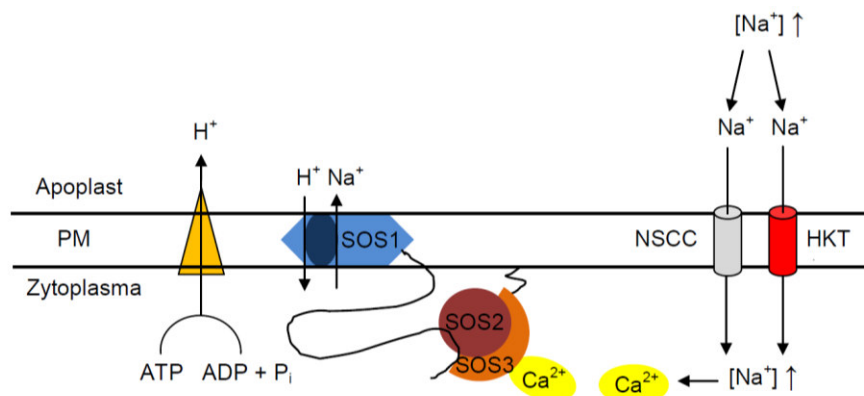
Dargestellt ist das topographische Modell von AtSOS1 basierend auf Aminosäuresequenz-Vergleichen. Phylogenetische Analysen der N-terminalen Domäne verschiedener Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter belegen, dass die Mitglieder der CPA1-Familie aus 12-13 Transmembran-Domänen bestehen. Der AtSOS1 verfügt darüber hinaus über einen extrem verlängerten zytosolischen, hydrophilen C-terminus. Modifiziert nach Shi *et al.*, 2000 und Orłowski & Grinstein, 2007.

Der pflanzliche Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter SOS1 ist in der Plasmamembran lokalisiert und katalysiert einen elektroneutralen Transport von Natrium aus der Zelle im Austausch mit einem Proton (Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003). Die Energie hierfür liefert der passive Transport von Protonen in die Zelle entlang ihres Konzentrationsgefälles. Dieser Protonengradient („proton motive force“) wird durch die ATP-abhängige Arbeit der

Plasmamembran-ständigen  $H^+$ -ATPase aufrechterhalten (Vitart *et al.*, 2001; Batelli *et al.*, 2007). Auf diese Weise entsteht ein pH-Gradient über der Plasmamembran von pH 5.5 im extrazellulären Bereich und pH 7.0 in der Zelle (Munns & Tester, 2008; Niu *et al.*, 1996). Mittels Northern-Blot-Analysen konnte die *SOS1* mRNA sowohl im Spross- als auch im Wurzelgewebe nachgewiesen werden (Shi *et al.*, 2000). Expressions-Analysen mittels grün-fluoreszierendem Protein (GFP) haben zudem gezeigt, dass der *sos1* vorwiegend in den Epidermiszellen der Wurzelspitze exprimiert wird, wo große, zentrale Vakuolen für die Kompartimentierung toxischer Substanzen fehlen. Die höchste Aktivität des *SOS1* Promotor-GUS Konstrukts konnte in Parenchym-Zellen detektiert werden, die die Xylem-Gefäße umgeben (Shi *et al.*, 2002). Aufgrund dieses Expressionsmusters wurden zwei Hauptfunktionen für den *SOS1*-Antiporter vorgeschlagen: Zum einen der Export von Natrium aus den Wurzelzellen ins umgebende Medium und zum zweiten eine Rolle bei der Kontrolle der Natrium-Xylembeladung und damit dem Langstreckentransport von Natrium in der gesamten Pflanze (Shi *et al.*, 2002).

Neben dem *SOS1*-Antiporter konnten noch zwei weitere, wichtige Komponenten identifiziert werden, die Teil des *SOS*-Signalwegs sind. Das *SOS3*-Protein, ein myrestyliertes Calcium-Sensor-Protein, und *SOS2*, eine Serin/Threonin-Proteinkinase (Ishitani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). Hohe externe Natrium-Konzentrationen lösen einen Anstieg im intrazellulären Calcium-Gehalt aus. Dieser Anstieg wird durch das Calcium-bindende Protein *SOS3* wahrgenommen und weitergeleitet (Mahajan *et al.*, 2008). Dazu bindet es an die FISL-Domäne innerhalb der regulatorischen Domäne der *SOS2*-Kinase und aktiviert diese durch Konformationsänderung und anschließendes Ablösen der auto-inhibitorischen Domäne (Halfter *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). Durch seine N-terminale Myrestyllisierungs-Domäne ist das *SOS3*-Protein teilweise Membran-assoziiert und rekrutiert die *SOS2*-Kinase zur Plasmamembran. Dadurch erleichtert es die Bindung des *SOS2/SOS3* Komplexes mit dem *SOS1*-Transporter und dessen Aktivierung durch Phosphorylierung durch die *SOS2*-Kinase (Quintero *et al.*, 2002). Die Phosphorylierungsstelle konnte von Quintero *et al.* (2011) identifiziert werden, es handelt sich hierbei um den Serinrest an Position 1138 am Ende des C-terminus, innerhalb der auto-inhibitorischen Domäne. Phosphorylierung von S1138 löst die intramolekulare Bindung zwischen der auto-inhibitorischen C-terminalen, regulatorischen Domäne des *SOS1* und der N-terminalen, katalytischen Domäne und führt somit zur Aktivierung des Proteins (Quintero *et al.*, 2011; Abbildung 1.3). Insgesamt kodiert das Genom von *A. thaliana* für neun *SOS3*-ähnliche Calcium-bindende Proteine (CBLs) und 24 *SOS2*-ähnliche Proteinkinasen (CIPKs; Du *et al.*, 2011). Spezifische Komplexe aus *SOS3*-

ähnlichen Calcium-Sensor Proteinen und ihren zugehörigen SOS2-ähnlichen Proteinkinasen regulieren eine Vielzahl von Prozessen in der Pflanze durch Weitergabe eines Calcium-Signals, ausgelöst beispielsweise durch Salz-, Trocken-, ABA- oder Kältestress (Gong *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009). So aktiviert SOS2 in SOS3-unabhängigen Prozessen den im Tonoplast lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter NHX1 sowie die tonoplastidäre  $\text{H}^+$ -ATPase, die Plasmamembran-ständige  $\text{H}^+$ -ATPase wird durch den CIPK5/CBL2 Komplex reguliert (Qiu *et al.*, 2004; Batelli *et al.*, 2007; Fuglsang *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des SOS-Signalwegs**

Hohe externe  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen lösen in der Zelle ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aus, welches zur Bildung eines SOS2/SOS3-Protein-Kinase-Komplexes führt. Dieser stimuliert durch Phosphorylierung die Aktivität des SOS1-Transporters. Energetisiert wird der Transport von Natrium über die Plasmamembran von der  $\text{H}^+$ -ATPase. Modifiziert nach Zhu, 2002.

Da selbst die Salz-sensitiven Glykophyten eine gewisse Menge an Natrium zum Überleben benötigen, ist eine straffe Regulierung des SOS1-Transporters von Nöten, die eine dynamische Aktivierung und Deaktivierung des Transporters möglich macht (Furumoto *et al.*, 2011). Diese Regulierung des SOS1 findet auf drei Ebenen statt. Neben der biochemischen Aktivierung des SOS1 auf Proteinebene durch Phosphorylierung am regulatorischen C-terminus, findet zusätzlich eine Regulierung der *sos1* Genexpression als Antwort auf NaCl-Stress statt (Park *et al.*, 2016). Diese Induktion der Genexpression ist SOS2/SOS3 abhängig und ist im Gegensatz zu anderen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern sehr spezifisch nur durch NaCl induziert, d.h. es findet keine ABA-, Kälte- oder Sorbitol-Induktion der *sos1* Genexpression statt (Shi *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2008). Die dritte Regulierung des SOS1 findet auf Ebene der mRNA statt. Diese ist sehr instabil und hat unter ambienten Bedingungen eine Halbwertszeit von nur ungefähr 10 Minuten (Chung *et al.*, 2008). Das Auftreten von NaCl-

Stress und die dadurch ausgelöste Produktion von ROS führen innerhalb weniger Minuten zu einer drastischen Zunahme der mRNA-Stabilität. Man geht davon aus, dass ROS an eine Domäne innerhalb der C-terminalen Region der mRNA binden und diese so vor Abbau schützen. Dabei nimmt die Akkumulation der mRNA proportional zur Konzentration des Salzstress zu (Chung *et al.*, 2008).

Obwohl die zytosolische, C-terminale Region des SOS1 mit knapp über 700 Aminosäuren enorm verlängert ist, wurden bisher nur drei Interaktionspartner, die diese regulatorische Domäne binden, identifiziert. Die SOS2-Kinase bindet den SOS1 C-terminus und aktiviert den Transporter durch Phosphorylierung an S1138 (Quintero *et al.*, 2011). Weiterhin wird der SOS1-Antiporter durch die NaCl-induzierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase 6 (MPK6) phosphoryliert. Die Bindestelle befindet sich innerhalb der letzten 100 Aminosäuren des regulatorischen C-terminus (AS 1044-1146; Yu *et al.*, 2010). Eine Verbindung zwischen der Salzstress-Antwort und oxidativem Stress wurde von Katiyar-Agarwal *et al.* (2006) hergestellt, die das regulatorische Protein Radical-induced cell death 1 (RCD1) als Interaktionspartner des SOS1-Antiporter identifizieren konnten. Hierbei handelt sich um einen transkriptionellen Regulator der oxidativen Stress-Antwort. Das Vorhandensein einer C-terminalen, regulatorischen Domäne wurde auch für den homologen, menschlichen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter *HsNHE1* beschrieben (Slepkov & Fliegel, 2002). Im Gegensatz zum SOS1 transportiert dieser ein Natrium in die Zelle im Austausch gegen ein Proton. Auf diese Weise ist der Plasmamembran-lokalisierte Transporter hauptsächlich an der pH-Regulation in tierischen Zellen beteiligt (Malo & Fliegel, 2006). Dysregulation des NHE1 führt durch eine gestörte pH-Homöostase zu unkontrollierten Differenzierungs- und Proliferationsprozessen der Zellen und resultiert schließlich in der Ausbildung von Tumoren (Amith & Fliegel, 2013). Die Aktivität des NHE1 wird einerseits durch Phosphorylierung konservierter Aminosäuren innerhalb der C-terminalen, zytosolischen Domäne reguliert und andererseits durch die Interaktion des C-terminus mit verschiedenen regulatorischen Proteinen (Malo & Fliegel, 2006). Obwohl die C-terminale Verlängerung des NHE1 mit knapp über 300 Aminosäuren nur etwa halb so lang ist wie der C-terminus des SOS1-Antiporters, wurden bereits knapp 20 Proteine identifiziert, die den menschlichen *HsNHE1* binden und regulieren. Darunter befinden sich u.a. die Proteinkinasen ERK1/2, NIK (Nck-interagierende Kinase) und p38MAPK, die Calcium-bindenden Proteine CaM (Calmodulin) und CHP (Calcineurin homologe Proteine), sowie die regulatorischen Proteine HSP70 (Hitzeschock Protein 70) und 14-3-3 (Amith & Fliegel, 2013).



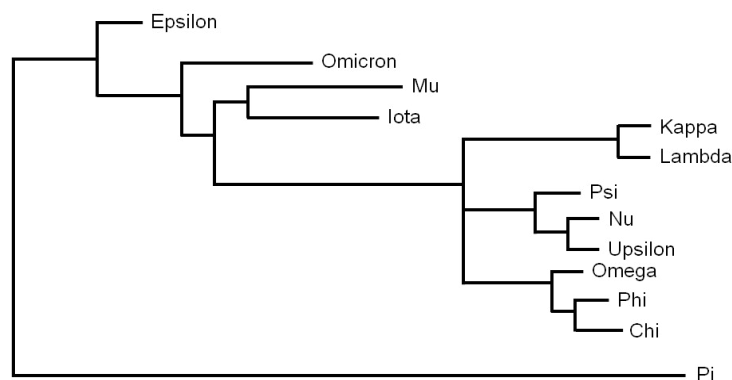
### 1.2.2 *At*NHX Transporter

Mit einem zellulären Volumen von über 80% ist die große, zentrale Vakuole das größte Zellorganell und kommt spezifisch nur in pflanzlichen Zellen vor (Wink, 1993). Umgeben ist die Vakuole von einer einfachen Membran, genannt Tonoplast, die sie von den restlichen zellulären Komponenten abtrennt (Wink, 1993; Marty, 1999). In dieser Membran sind die für Pflanzen spezifischen *At*NHX1-4-Transporter lokalisiert, welche eine hohe Sequenzidentität innerhalb der konservierten N-terminalen Domäne mit dem SOS1-Antiporter aufweisen, jedoch keinen verlängerten C-terminus besitzen (Pardo *et al.*, 2006; Bassil *et al.*, 2011a; Bassil *et al.*, 2011b). Die zweite Gruppe von intrazellulären NHX-Antiportern, die *At*NHX5/6-Transporter, sind im endosomalen Golgi- und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert (Bassil *et al.*, 2011a; Chanroj *et al.*, 2012). Die NHX-Transporter katalysieren genau wie der SOS1-Antiporter den elektroneutralen Transport von Natrium im Austausch mit einem Proton und spielen somit eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Kompartimentierung von Natrium in der Vakuole (Apse *et al.*, 1999; Venema *et al.*, 2002; Apsse *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum SOS1-Transporter, der hochspezifisch für Natrium ist, besitzen diese Proteine ebenfalls eine Affinität für Kalium und übernehmen auf diese Weise eine Rolle in der Regulation der Kalium- und pH-Homöostase, sowie in der Osmo- und der Turgorregulation (Venema *et al.*, 2002; Venema *et al.*, 2003; Apsse *et al.*, 2003; Bassil *et al.*, 2011b). Energetisiert wird der Ionentransport in die Vakuole durch den bestehenden Protonengradient, der durch die ATP-betriebenen, vakuolären Protonenpumpen V-ATPase und V-PPase aufrechterhalten wird (Blumwald, 1987; Gaxiola *et al.*, 2007). Die Speicherung und Lagerung toxischer Substanzen, die bei Akkumulation im Zytosol die Funktion wichtiger Enzyme stören würden, gehört zu den Hauptfunktionen der Vakuole. So enthält diese typischerweise eine Vielzahl löslicher Zucker, Poly-Alkohole, organischer Säuren, Aminosäuren, Enzyme, Farbstoffe und Ionen (Wagner *et al.*, 1983; Rausch, 1991; Carter *et al.*, 2004). Die hohen Konzentrationen an löslichen Stoffen liefert dann die osmotische Triebkraft für die Wasseraufnahme in die Vakuole und schließlich auch in die Zelle. Somit ist die Vakuole nicht nur an der Detoxifizierung der Zelle beteiligt, sondern auch hauptsächlich für den Aufbau und die Regulation des Turgordrucks sowie die Zellexpansion verantwortlich.

### 1.3 14-3-3 regulatorische Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die möglicherweise mit dem regulatorischen C-terminus des SOS1-Antiporters interagieren, darunter mehrere 14-3-3 Proteine. Bei diesen Proteinen handelt es sich um eine Familie hoch-konservierter,

regulatorischer Effektor-Proteine, die in allen Eukaryoten existieren und die die Aktivität und Funktion ihrer Bindepartner durch Phosphorylierungs-abhängige Vorgänge modulieren (Roberts, 2003). Arabidopsis exprimiert 13 verschiedene 14-3-3 Isoformen, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen in eine Epsilon- und eine Pflanzen-spezifische Nicht-Epsilon-Gruppe unterteilt werden können (Jaspert *et al.*, 2011; Abbildung 1.4). Die einzelnen Isoformen weisen dabei eine Sequenzidentität von ca. 50% auf, welche sich vorwiegend auf den zentralen Block im mittleren Bereich des Proteins beschränkt. C- und N-termini sind fast vollständig unkonserviert und einzigartig für die jeweilige Isoform (Ferl *et al.*, 1994; Ferl, 1996). Diese Tatsache könnte den Hinweis für eine Isoform-Spezifität der 14-3-3 Proteine liefern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Mitglieder der Familie gewebe- sowie zellspezifische Unterschiede in ihrem Expressionsmuster aufweisen. So konnten 14-3-3 Proteine bereits im Nukleus, in den Plastiden, in den Mitochondrien und vor allem im Zytosol nachgewiesen werden (Bihn *et al.*, 1997; Sehnke *et al.*, 2000; Sehnke *et al.*, 2001). Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen den verschiedenen Isoformen kommt es allerdings auch zur funktionellen Redundanz. Dies konnte anhand von T-DNA-Insertionsmutanten bestätigt werden (van Kleeff *et al.*, 2014). So zeigen verschiedene T-DNA-Insertionslinien, bei denen lediglich ein *14-3-3* Gen ausgeschaltet ist, keinen nachweisbaren Phänotyp. Dies deutet darauf hin, dass das Vorhandensein der anderen Isoformen die Funktion des fehlenden Proteins kompensieren kann (van Kleeff *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der *At14-3-3* Proteine**

Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen 14-3-3 Proteine. Die 14-3-3 Proteine können in die vier Mitglieder umfassende Epsilon-Gruppe (Epsilon, Omicron, Mu und Iota) und die neun Mitglieder umfassende Pflanzen-spezifische Nicht-Epsilon-Gruppe unterteilt werden. Modifiziert nach van Kleeff *et al.*, 2014.

Im Anschluss an eine Kinase-Aktivität interagieren 14-3-3 Proteine mit der phosphorylierten Peptid-Sequenz und beeinflussen, meist durch das Auslösen von Konformationsänderungen, nicht nur die Aktivität ihrer Bindepartner, sondern auch deren subzelluläre Lokalisierung, deren Stabilität oder deren Oligomerisierungszustand (Gökirmak *et al.*, 2010). Es sind drei konservierte, sequenz-spezifische Motive bekannt, an die 14-3-3 Proteine binden: RSxpSxP, RSxxpSxP und YpT (Muslin *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1997a; Ferl *et al.*, 2002). Jedoch binden 14-3-3 auch Interaktionspartner ohne diese konservierten Motive und sogar Phosphorylierungs-unabhängige Interaktionen wurden identifiziert (Wang *et al.*, 1999; Fuglsang *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2012). Ihre Funktion üben 14-3-3 Proteine als Homo- oder Heterodimere aus und sind durch die Regulation von Schlüsselenzymen und -transportern in wichtige physiologische Prozesse in der Pflanze involviert, wie z.B. den Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus, die biotische und abiotische Stressantwort und eine Reihe von hormongesteuerten Prozessen während der pflanzlichen Entwicklung (Jones *et al.*, 1995; Cotellet *et al.*, 2000; Jaspert *et al.*, 2011; de Boer *et al.*, 2013). Zu ihren zahlreichen Bindepartnern zählen u. a. Phosphatasen, Kinasen, Rezeptoren, Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine (Denison *et al.*, 2011). Gut charakterisierte Interaktionspartner in Pflanzen sind beispielsweise die Nitratreduktase oder die Plasmamembran-ständige H<sup>+</sup>-ATPase. Nach Phosphorylierung durch eine spezifische Proteinkinase führt die Bindung der 14-3-3 Proteine im Fall der Nitratreduktase zu einer Inhibierung der Enzymaktivität, die H<sup>+</sup>-ATPase wird durch Bindung aktiviert (MacKintosh & Meek, 2001; Kanczewska *et al.*, 2005). In tierischen Zellen interagieren 14-3-3 Proteine beispielsweise mit dem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NHE1. Die Bindung der konservierten Konsensus-Sequenz <sup>700</sup>RIGpSDP<sup>705</sup> durch 14-3-3 schützt vor Dephosphorylierung und steigert auf diese Weise die Aktivität des Transporters (Malo & Fliegel, 2006). Die funktionellen 14-3-3 Dimere bilden eine W-förmige, Klemmen-artige Struktur, bestehend aus zwei amphiphatischen Spalten, welche für die Bindung der Phospho-Proteine verantwortlich sind (Yaffe *et al.*, 1997; Petosa *et al.*, 1998). Auf diese Weise können 14-3-3 Proteine entweder als intermolekulare Brücke fungieren und zwei interagierende Proteine in räumliche Nähe bringen, oder aber zwei tandem-phosphorylierte Domänen eines Proteins binden (Ferl, 1996). Aber 14-3-3 Proteine binden nicht nur Phospho-Peptide und beeinflussen diese in ihrer Funktion, sie werden auch selbst durch Phosphorylierung reguliert (Swatek *et al.*, 2014). So führt die Phosphorylierung des 14-3-3 ζ Dimers durch die Calcium-abhängige Proteinkinase 3 (CPK3) zur Auflösung der dimeren Struktur (Lachaud *et al.*, 2013). Diese Monomerisierung resultiert in der Aufhebung der Interaktion zwischen 14-3-3 Protein und Bindepartner und

führt schließlich zur Proteolyse und/oder zur Dephosphorylierung des Interaktionspartners (Lachaud *et al.*, 2013).

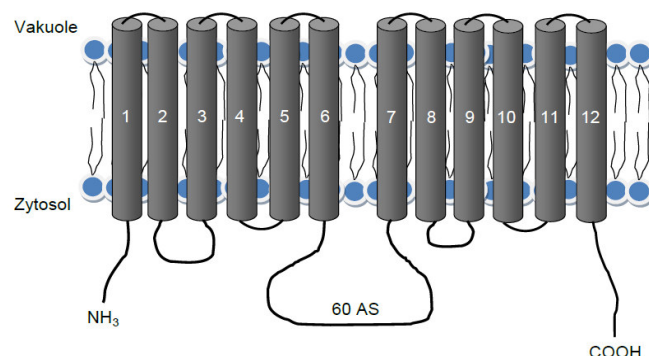
Reversible Phosphorylierung, ausgelöst durch die gegensätzliche Aktivität von Proteinkinasen und -phosphatasen, ist ein essentieller Prozess in der Signaltransduktion (Zhu & Li, 2013). Dabei arbeiten Phosphatasen und Kinasen in präzise koordinierter Weise zusammen und reagieren so gezielt und schnell auf physiologische Stimuli (Schweighofer & Meskiene, 2015). Indem 14-3-3 Proteine das durch Phosphorylierung ausgelöste Signal vollenden, spielen sie eine wichtige in der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen (Huber, 2007; Zhu & Li, 2013). Alternativ löst ein externer Stimulus die Induktion der Expression bestimmter Gene aus. Im Gegensatz zu der *de novo*-Synthese von Proteinen aufgrund von erhöhter Transkription stellt die reversible Phosphorylierung ein äußerst schnelles und energieeffizientes Verfahren zur Aktivitätssteigerung dar und spielt daher eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden (Schweighofer & Meskiene, 2015).

Hinweis auf eine Verbindung zwischen dem SOS Signalweg und den 14-3-3 Proteinen lieferten Zhou *et al.* (2014). Sie konnten zeigen, dass unter Kontrollbedingungen eine Bindung zwischen der SOS2-Kinase und den 14-3-3 Proteinen  $\kappa$  und  $\lambda$  herrscht, welche durch das Auftreten von Salzstress unterbrochen wird. Diese 14-3-3 Proteine sind somit negative Regulatoren der SOS2-Kinase und reprimieren die Kinase-Aktivität vermutlich durch das Blockieren aktiver Bindestellen oder durch das Induzieren von Konformationsänderungen. Salzstress führt dann zur Dissoziation des 14-3-3 Proteins und zur Aktivierung der SOS2-Kinase (Zhou *et al.*, 2014). Diese kann nun den SOS1-Antiporter durch Phosphorylierung aktivieren. Eine putative Bindestelle für 14-3-3 Proteine wurde ebenfalls am SOS1 vorgeschlagen. Die durch die SOS2-Kinase phosphorylierte Peptid-Sequenz  $^{1133}\text{RIDSPSKIV}^{1141}$  weist Ähnlichkeit mit den konservierten Bindemotiven der 14-3-3 Proteine auf (Quintero *et al.*, 2011).

#### **1.4 Zuckertransporter und Zuckerhomöostase**

Nachdem die hier erhobenen Daten verschiedene 14-3-3 Proteine als Bindepartner des SOS1 C-terminus identifizierten, lieferte die Arbeit von Shin *et al.* (2011) den Hinweis für eine mögliche Interaktion der 14-3-3 Proteine mit dem tonoplastidären Zuckertransporter *AtTST1*. Dieser Transporter wurde in der Arbeitsgruppe Neuhaus bereits eingehend untersucht. Er gehört der drei Mitglieder umfassenden Gruppe der tonoplastidären *AtTSTs* (*Arabidopsis thaliana* „Tonoplast Sugar Transporter“) an und wird ubiquitär in einer Vielzahl

von Geweben von *Arabidopsis* exprimiert (Wormit *et al.*, 2006). Weiterhin wird die Expression von *tst1* sowie auch von *tst2* durch biotische sowie abiotische Faktoren, wie Zucker, Salz, Kälte und Trockenheit induziert (Wormit *et al.*, 2006). Aufnahmeversuche an intakten Vakuolen konnten nachweisen, dass es sich bei *AtTST1/2* um protonenabhängige Antiporter handelt, die neben Glukose und Fruktose auch Saccharose als Substrat akzeptieren (Wormit *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2011). Da sich hohe zytosolische Zuckerkonzentrationen negativ auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen auswirken, spielen die TST-Proteine durch den Transport von Zuckern in die Vakuole eine wichtige Rolle in der Stressantwort (Wingenter *et al.*, 2010). Innerhalb der 53 Mitglieder umfassenden Monosaccharid-Transporter-Familie (MST) zeichnet sich die Untergruppe der *AtTSTs* durch das Vorhandensein einer verlängerten, hydrophilen Region zwischen Transmembrandomäne sechs und sieben aus, auch „Loop“ genannt. Mit bis zu 330 Aminosäuren ist dieser Loop vier bis fünf Mal länger als bei den anderen Mitgliedern der MST-Familie (Marger & Saier, 1993; Wormit *et al.*, 2006; Büttner, 2007; Neuhaus, 2007). Neben der Induktion der Genexpression durch verschiedene Stressstimuli, werden die beiden Zuckertransporter TST1/2 auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. So konnten mehrere Serin-Reste innerhalb des extrem verlängerten Loops der beiden Proteine als putative Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Whiteman *et al.*, 2008; Endler *et al.*, 2009; Schulze *et al.*, 2012). Einer dieser Serin-Reste (S370) befindet sich innerhalb eines stark negativ geladenen Aspartat-Clusters. Diese Aspartat-reiche Region ist erforderlich für die effektive und funktionelle Interaktion des TST1-Loops mit der Mitogen-aktivierten Tripelkinase (MPKKK) *AtVIK1* (*Arabidopsis thaliana* „vascular highway 1-interacting kinase 1“; Wingenter *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.5: Topographisches Modell von Zuckertransportern der Major-Facilitator-Superfamilie**

Dargestellt ist das topographische Modell eines Zuckertransporters aus der MF-Superfamilie. Diese bestehen aus 12 putativen, alpha-helikalen Transmembrandomänen. Zwischen Domäne sechs und sieben befindet sich eine hydrophile Region von ca. 60 Aminosäuren. Im Fall des *AtTST1* ist diese zytosolische Loop-Region extrem verlängert. (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>).

Die SUCs (Saccharose-Transporter) stellen eine weitere Familie von Transportproteinen dar, die eine Schlüsselfunktion in der inter- und intrazellulären Verteilung von Zuckern spielen (Eom *et al.*, 2015). Zusammen mit den MSTs gehören die SUCs zur Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) und zeichnen sich durch 12  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen aus, welche durch eine hydrophile Region zwischen Domäne sechs und sieben verbunden sind (Marger & Saier, 1993; Abbildung 1.5). Die SUCs regulieren den Import von Saccharose in die Geleit- und Siebzellen des Phloems entgegen dem Konzentrationsgradienten. Das Genom von *Arabidopsis* kodiert für neun Saccharose-Transporter, *AtSUC1-AtSUC9*, wobei SUC6 und SUC7 als Pseudogene identifiziert wurden (Sauer *et al.*, 2004). Bis auf SUC4 sind die SUC-Transporter Plasmamembran-lokalisiert und katalysieren den elektrogenen Symport von Saccharose und Protonen (Sauer, 2007).

Zucker liefern die für die Zelle notwendige Energie und dienen außerdem als Struktur- und Speicherkomponente in der Zelle, indem sie am Aufbau von Polymeren wie der Zellulose und der Stärke beteiligt sind (Rolland *et al.*, 2002). Weiterhin beeinflussen Zucker auch die Expression einer Vielzahl von Genen und nehmen als Signal-Moleküle eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion ein (Coruzzi & Zhou, 2001). So hemmen hohe Glukose- bzw. Saccharosekonzentrationen die Expression von photosynthetisch-aktiven Genen und aktivieren hingegen die Expression von Genen, die am Wachstum bzw. der Respiration beteiligt sind (Rolland & Sheen, 2005). Die Regulierung der Zuckerhomöostase ist somit ein essentieller Prozess, der durch die Synthese und den Verbrauch von Zuckern, ebenso wie durch die adäquate Verteilung und Speicherung von Zuckern erreicht wird (Sheen *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2006; Sheen, 2014).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die hydrophile, C-terminale Verlängerung des *HsNHE1* bindet ca. 20 verschiedene Proteine und wird von diesen in seiner Funktion reguliert. Darunter befinden sich unter anderem Kinasen, Phosphatasen oder Calcium-bindende Proteine (Amith & Fliegel, 2013). Mit knapp über 700 Aminosäuren ist der C-terminus des *AtSOS1* mehr als zweimal so lang wie die korrespondierende zytosolische Domäne des NHE1. Bisher wurden aber lediglich drei Bindepartner identifiziert, die den SOS1-Transporter binden und regulieren: die beiden Proteinkinasen SOS2 und MPK6 sowie das regulatorische Protein RCD1 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2011).

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über die Funktion und die Regulation des zytosolischen C-terminus des SOS1-Transporters zu erhalten. Dazu sollen Mutanten-Pflanzen generiert und identifiziert werden, die eine erhöhte Expression der löslichen C-terminalen Domäne (AS446-1146) aufweisen bzw. Mutanten, bei denen das *sos1* Gen durch T-DNA-Insertion ausgeschaltet ist. Diese Mutanten-Pflanzen sollen auf ihre Toleranz gegenüber moderaten bis hohen NaCl-Konzentrationen untersucht und phänotypische Unterschiede herausgearbeitet werden.

Weitere Interaktionspartner des SOS1 C-terminus sollen durch rekombinante Synthese und Reinigung des *AtSOS1* C-terminus (AS978-1146) sowie anschließendem Pulldown-Assay gefunden werden. Die Verifizierung dieser Interaktionen soll mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementation (BiFC) und Peptid-Spot Analyse durchgeführt werden. Die auf diese Weise identifizierten, regulatorischen *At14-3-3* Proteine stellen gegebenenfalls eine Verbindung zwischen der Ionen- und der Zuckerhomöostase von Pflanzen her. Diese Verbindung soll durch die Charakterisierung von *At14-3-3* Knockout-Pflanzen näher untersucht werden. Dazu sollen diese Pflanzen Hochzuckerbedingungen ausgesetzt werden und ihre Toleranz im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme von den Firmen Agilent (Böblingen), AppliChem (Darmstadt), Bayer (Leverkusen), Bioline (Luckenwalde), Bio-Rad (München/Mississauga, Ontario), Duchefa (Harlem, Niederlande), Dionex (Idstein, Taunus), GE Healthcare (München/Mississauga, Ontario), Hartmann Analytic (Braunschweig), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München/Oakville, Ontario), Thermo Scientific (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Pflanzenspezifische Methoden

#### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (L.) Heynh. der Varietät Columbia und an *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) vorgenommen. In Tab. 2.1 sind alle verwendeten Pflanzen aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Pflanzen**

Pflanze	Relevante Merkmale	AGI-Code	Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col0	Wildtyp	-	-
Salk_114744	T-DNA Insertionslinie	At2g01980	Diese Arbeit
Salk_149947	T-DNA Insertionslinie	At2g01980	Diese Arbeit
35S:AtSOS1-Cterminus	Überexpressionsmutanten	At2g01980	Diese Arbeit
Salk_075219	T-DNA Insertionslinie	At5g10450	Zhou <i>et al.</i> (2014)
Salk_071097	T-DNA Insertionslinie	At5g65430	Zhou <i>et al.</i> (2014)
Salk_075219;Salk_071097	DoppelKnockout	At5g10450,At5g65430	Zhou <i>et al.</i> (2014)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Wildtyp	-	-

Die T-DNA Insertionslinien Salk\_114744 und Salk\_149947 wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASCC) bezogen. Die Linien Salk\_075219 und Salk\_071097,



sowie die Doppelmutante aus den beiden Salk-Linien wurden freundlicherweise von Prof. Jörg Kudla von der Universität Münster (Münster, Germany) bereitgestellt. Die Herstellung der anderen gentechnisch veränderten Pflanzen ist in Kapitel 2.5.10 beschrieben.

### 2.2.2 Pflanzenanzucht

Alle Pflanzen wurden entweder auf Erde, in definierten Medien in Flüssigkultur oder auf Agarmedium angezogen. Um eine synchrone Keimung der Samen zu gewährleisten, erfolgte vor der Aussaat eine Kälteinkubation für 48 h bei 4°C. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 21°C unter Kurztagbedingungen (10 h Licht pro Tag) und einer Lichtintensität von 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Zur Auslösung der Blühinduktion wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (mind. 16 h Licht pro Tag) kultiviert. Die Samenreife erfolgte im Gewächshaus bei 21°C und 16 h Licht pro Tag.

#### 2.2.2.1 Anzucht auf Erde

Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen und Mutanten, ebenso wie Tabak Wildtyp-Pflanzen wurden auf ED-73 Einheitserde (DIN 11540-80T) mit folgender Zusammensetzung angezogen.

#### ED-73 Einheitserde

---

300 mg/L N  
300 mg/L P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
600 mg/L K<sub>2</sub>O  
3 g/L KCl

---

pH (CaCl<sub>2</sub>) 6,0

#### 2.2.2.2 Anzucht in Hydrokultur

Die Anzucht von Arabidopsis Pflanzen in Flüssigkultur erfolgte nach Conn *et al.* (2013). Dazu wurden die Samen in mit Löchern versehenen Reaktionsgefäß-Deckeln und einem Tropfen Festmedium ausgesät und stratifiziert. Anschließend wurden die Pflanzen zwei Wochen lang in „Germination Medium“ angezogen. Nach zwei Wochen wurde das „Germination Medium“ durch Nitrat-haltiges „Basal Medium“ ersetzt. Eine weitere Woche später, wurden die Pflanzen aus den kleineren Anzuchtboxen in größere, etwa 13 L fassende Boxen umgesetzt und hier weitere zwei bis drei Wochen kultiviert. Alle vier bis fünf Tage erfolgte ein Medienwechsel. 72 h vor der Ernte wurde das Medium durch ein definiertes Kontroll- bzw. Versuchsmedium ersetzt, das unterschiedliche Konzentrationen an NaCl enthielt.

**Tabelle 2.2: Medienzusammensetzung für die Hydrokultur**

Endkonzentration [mM]	„Germination Medium“	„Basal Medium“	„Low Salt Medium“	„High Salt Medium“
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0	2	2	2,25
KNO <sub>3</sub>	0	3	3	0,18
KCl	1	2	2	5,54
CaCl <sub>2</sub>	0,75	0,1	0,1	0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,25	2	2	3,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	2	2	3,45
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	0,6	0,6	0,765
MgCl <sub>2</sub>	0	0	0	0,08
NaCl	0	1,5	0	Je nach Konzentration
NaNO <sub>3</sub>	0	0	0	0,92
Fe(III)-Natrium- EDTA	0,05	0,05	0,05	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05	0,05	0,05	0,05
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,005	0,005	0,005	0,005
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01	0,01	0,01	0,01
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>3</sub>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
MES, pH 5,6 (KOH)	600 mg/L	600 mg/L	0	0

### 2.2.2.3 Anzucht in Sterilkultur

Die Anzucht von Arabidopsis in steriler Flüssigkultur erfolgte in 300 ml-Erlenmeyerkolben in MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962). Die Arabidopsis-Samen wurden nach der Oberflächensterilisation in sterile Erlenmeyerkolben mit 30 ml Medium überführt. Nach sieben Tagen Anzucht bei 80 rpm auf einem Schüttler in einer Klimakammer bei 21°C unter Kurztagbedingungen wurde das Medium gewechselt. Hierbei wurden dem Medium entweder 100 mM NaCl oder verschiedene Konzentrationen an Glukose, Fruktose oder Saccharose zugesetzt (2%, 5% Glukose; 3%, 4%, 5% Saccharose). Die Ernte der Pflanzen erfolgte nach weiteren 72 h (100 mM NaCl) bzw. nach weiteren sieben Tagen (Glukose). Die geernteten Proben wurden zur Analyse von Frischgewicht und Natrium/Zucker, bzw. zur Analyse unterschiedlicher Transkriptgehalte verwendet. Vorbereitend dazu wurden die Pflanzen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und bei -70°C gelagert.

Außerdem erfolgte die Anzucht von Arabidopsis auch auf festem MS8-Medium, dem vor dem Autoklavieren 0,8% Agar zugesetzt wurde. Die sterilisierten Samen werden hierbei einzeln, im Abstand von 1 cm auf einer Petrischale verteilt. Nach zwei Wochen in der Klimakammer wurden die Platten fotografiert und optisch ausgewertet.

### 2.2.3 Oberflächensterilisation der Samen

Die Oberflächensterilisation dient der Vermeidung mikrobieller Kontaminationen des Mediums. Hierzu wurden die Samen zuerst mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol für 2 min in einem Reaktionsgefäß unter Schütteln inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (30 s, 13000 rpm,; Zentrifuge 5417R, Eppendorf) ist der Überstand zu verwerfen und die Samen nach Zugabe von 1 ml 15%igem (v/v) Natriumhypochlorit für 10 min unter ständigem Schütteln zu inkubieren. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Samen anschließend dreimal mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und für mindestens 48 h bei 4°C stratifiziert.

### 2.2.4 Selektion von homozygoten Überexpressionspflanzen

Um homozygote *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen zu selektieren, wurden die Samen auf MS8-Platten mit entsprechendem Antibiotikum (Kanamycin) ausgesät und zum Wachsen in eine Lichtkammer gestellt. Nach drei Wochen konnten die homozygoten Pflanzen identifiziert werden.

#### ½ MS8-Medium (Murashige-Skoog)

0,5 M	MS-Medium
1% (w/v)	Saccharose
0,05% (w/v)	MES
0,8% (w/v)	Agar
pH (KOH) 5,8	

### 2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die verwendeten T-DNA-Insertionsmutanten wurden mittels PCR auf Homozygotie überprüft. Als Template diente dabei die genomische DNA aus den jeweiligen Pflanzen. Die Isolierung erfolgte nach der „Simple DNA prep“-Methode des University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC), USA.

Hierbei wurde ein Arabidopsis-Blatt in 500 µl „Shorty“-Puffermedium aufgenommen und mit einem Handpotter in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20000 g, 5 Minuten, 4°C) wurden 350 µl des Überstandes in ein mit 350 µl Isopropanol (p.a.) gefülltes Reaktionsgefäß überführt, um die DNA zu fällen. Die Suspension wurde mehrere Male invertiert und anschließend bei 20000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Das erhaltene Pellet wurde für 15 min getrocknet und anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

**„Shorty-Puffer“**

200 mM	Tris-HCl
400 mM	LiCl
25 mM	EDTA
1%	SDS
ad 1 l H <sub>2</sub> O	pH (HCl) 9,0

**2.2.6 Stressexperimente**

Um die Wirkung von Salzstress auf *A. thaliana* Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen zu untersuchen, wurden die Pflanzen fünf Wochen unter ambienten Bedingungen in Hydrokultur angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen 72 h vor der Ernte mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl gewässert. Das Konzentrationsspektrum reichte von 2,5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM bis 200 mM. Die Analyse der Auswirkungen von Salzstress auf die pflanzliche Entwicklung erfolgte durch Anzucht der Pflanzen auf Erde. Dazu wurden drei Wochen alte Pflanzen in eine Klimakammer mit 18 h Licht transferiert. Über einen Zeitraum von zwei Wochen bekamen die Pflanzen alle drei Tage 150 mM NaCl mit dem Gießwasser verabreicht bis die Pflanzen das Blühen begannen. Zur Bestimmung des Expressionsgehaltes blühspezifischer Gene wurden Blattproben der entsprechenden Pflanzen genommen und in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren, um später Gesamt-mRNA (Kapitel 2.4.14) zu isolieren. Diese RNA wurde in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.4.15) und stand für eine quantitative Real-Time-PCR-Analyse (Kapitel 2.4.16) zur Verfügung. Zur Samenreife wurden die Pflanzen ins Gewächshaus überführt.

Um den Einfluss von hohen Zuckerkonzentrationen (5% Glukose) auf die Genexpression zu untersuchen, wurden Blattscheibchentests durchgeführt. Dazu wurden aus fünf Wochen alten Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen Blattscheibchen mit einem Durchmesser von 0,7 cm ausgestochen und in MS8-Medium mit 5% Glukose über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben getrocknet und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Dieses Blattmaterial wurde zur Isolierung von Gesamt-mRNA und zur Herstellung von cDNA verwendet und anschließend mittels qRT-PCR auf Unterschiede im Expressionslevel untersucht.

Um die Wirkung von hohen Salzkonzentrationen (100 mM) auf das Wurzelwachstum der verschiedenen Pflanzenlinien zu untersuchen, wurden oberflächensterilisierte Samen von Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen auf quadratischen Platten ausgelegt. Die Samen wurden hierzu im oberen Drittel der Platten auf einer geraden Linie angeordnet und die Platten später senkrecht in eine Klimakammer bei 21°C unter Kurztagbedingungen gestellt.

### 2.2.7 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Zur genauen Untersuchung der Interaktion zweier Proteine *in vivo*, wurden YFP-Fusionskonstrukte der zu untersuchenden Gene hergestellt und transient in *N. benthamiana* exprimiert. Dabei wurde der N-terminale Teil des YFP (Yellow Fluorescent Protein) an das Target-Protein geheftet, der C-terminale Teil des YFP an den potentiellen Interaktionspartner, oder umgekehrt. Die Klonierung in die jeweiligen Vektoren (Tabelle 2.4) erfolgte mittels Gateway® Klonierung (Invitrogen, Karlsruhe). Treten die beiden zu untersuchenden Proteine aufgrund einer Interaktion in unmittelbare Nähe, so fügen sich die beiden Fragmente zu einem vollständigen, fluoreszierenden YFP-Protein zusammen. Die Fluoreszenz wurde mithilfe des Leica TCS SP5II konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop-Systems (Leica, Wetzlar) untersucht. Für die transiente Expression in *N. benthamiana* wurden Agrobakterien verwendet (Kapitel 2.5.9). Der Nachweis der Fluoreszenz erfolgte nach fünf Tagen an Epidermiszellen.

## 2.3 Physiologische Methoden

### 2.3.1 Extraktion von Zuckern, Aminosäuren und Ionen

Das angewandte Verfahren der wässrigen Extraktion diente der Bestimmung der im Blattmaterial von *A. thaliana* enthaltenen Zucker, Aminosäuren und Ionen. Dazu wurden 50 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial in 500 µl deionisiertem Wasser aufgenommen. Zur Überführung der Zucker und Ionen in Lösung erfolgte anschließend eine zehn-minütige Inkubation bei 95°C im Thermomixer unter stetigem Schütteln. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das zurückgebliebene Pellet konnte für eine nachfolgende Stärkeextraktion bei -20°C aufbewahrt werden.

### 2.3.2 Extraktion und Quantifizierung von Stärke

Zur Extraktion der Stärke wurde das nach der wässrigen Extraktion verbliebene Pellet (Kapitel 2.3.1) einmal mit 500 µl 80%igem Ethanol und einmal mit 500 µl Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 500 µl Natriumacetat (50 mM, pH 4,7) aufgenommen und 40 min autoklaviert, um die Bindungen der Stärkemoleküle zu lösen. Die enzymatische Spaltung der Stärke in Glukose erfolgte durch Zugabe von jeweils 5 Units  $\alpha$ -Amylase und 5 Units Amyloglukosidase. Die Proben wurden hierzu für 2 h bei 37°C und 600 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz 10 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend für 10 min bei 13000 rpm

abgedreht. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das verbleibende Pellet wurde erneut in 250 µl Natriumacetat aufgenommen und ein zweites Mal, wie beschrieben, verdaut.

Schließlich wurde die Glukose-Konzentration im Überstand als Quantifizierung des Stärkegehalts bestimmt. Dies erfolgte mithilfe eines Multiplatten Photometer Infinite M200 (Tecan, Crailsheim). In einer enzymatischen Reaktion wird die Glukose unter Bildung von NADH zu 6-Phosphoglukonolakton umgesetzt. Die Bildung von NADH ist hierbei direkt proportional zum Glukosegehalt in der Probe und kann photometrisch bei 340 nm erfasst und mithilfe des Programm iControl™ (Tecan, Mainz) gemessen und dargestellt werden.

### **2.3.3 Quantifizierung von Zuckern und Ionen mittels Ionenchromatographie**

Die in Kapitel 2.3.1 gewonnenen Proben wurden zur Bestimmung von Zuckern und Ionen mithilfe einer 761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Schweiz) auf einer Metrosep A Supp1-250 (Methrom Schweiz) mit einer Flussrate von 1 ml/min ionenchromatographisch getrennt. Die Ionenchromatographie ist eine Form der HPLC („high performance liquid chromatography“) und beruht auf der Eigenschaft von Metaboliten an polare, feste Adsorbenten zu binden. Die Stärke der Bindung ist abhängig von Art und Größe des Metaboliten. Als stationäre Phase dient ein Ionenaustauscher (meist auf Basis eines Polymermaterials). Die mobile Phase wird zur Elution der Metabolite eingesetzt und besteht, abhängig von der jeweiligen Trennung, aus verschiedenen Elektrolyten. Die unterschiedlichen Affinitäten der Metabolite zur Säule führen letztlich zu unterschiedlichen Retentionszeiten, mit der die Metabolite getrennt werden und ihre Leitfähigkeit detektiert wird. Die genauen Geräte-Einstellungen und Parameter richteten sich nach den zu untersuchenden Substanzen.

### **2.3.4 Quantifizierung der freien Aminosäuren**

Die Konzentrationsbestimmung proteinogener Aminosäuren erfolgte mittels einer HPCL-Anlage der Firma Dionex (Idstein, Taunus), die die Proben parallel durch Fluoreszenzdetektion (RF2000) und UV-Detektion (UVD 170U) misst. Dazu wurden die in Kapitel 2.3.1 gewonnenen Proben mit der fluoreszierenden Reagenz AQC (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat; Watrex, Prag) nach Angaben des Herstellers derivatisiert. Zur Auftrennung der Aminosäuren wurde eine RP-C18 (Reversed Phase) Säule (CC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 et; Machery & Nagel, Düren) verwendet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software „Chromleon V6.7“ (Dionex, Idstein, Taunus).

### 2.3.5 Herstellung von Blattrohextrakt

Zur Herstellung von Blattrohextrakt wurden 10 g Blattmaterial geerntet und in 30 ml Homogenisierungspuffer gemörsert. Anschließend wurde die Masse durch zwei Lagen Miracloth gefiltert und der erhaltene Extrakt wurde für 10 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Wenn nach der Zentrifugation kein Pellet mehr zu sehen war, wurde der erhaltene Rohextrakt zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Homogenisierungspuffer: 5 mM EDTA

(in PBS-Puffer)

0,2% BSA

Proteaseinhibitor (1 Tablette, erst direkt vor Gebrauch)

PBS-Puffer:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4, HCl

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

In diesem Kapitel sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, Konstrukte und Bakterienstämme aufgeführt. Außerdem werden die molekularbiologischen Methoden, die für das Arbeiten mit Plasmid- und genomischer DNA sowie RNA notwendig sind, kurz erläutert. Es werden außerdem alle Methoden zur Herstellung gentechnisch veränderter Organismen beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Methoden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.4.1 Herstellung transgener Organismen

Aus 100 mg gemörsertem Pflanzenmaterial wurde mithilfe des „NucleoSpin® RNA Plant Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad) in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben. Unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 2.3) wurde das gewünschte DNA-Fragment anschließend mittels einer *Taq*-(Invitrogen, Karlsruhe), bzw. einer *Pfu*-DNA-

Polymerase (Promega, Mannheim) amplifiziert (Saiki *et al.*, 1988) und mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001) konnte das gewünschte DNA-Fragment mithilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert werden. Nach Ligation in die entsprechenden Vektoren (Tabelle 2.4) konnte die DNA nun zur Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*), *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), *N. benthamiana* oder *A. thaliana* verwendet werden.

Für die Klonierung mittels Gateway® (Invitrogen, Karlsruhe), einem sequenzspezifischen Rekombinationssystem, muss das PCR-Produkt bereits spezifische „attachment sites“ besitzen. Über insgesamt zwei Reaktionsschritte wurde das Fragment zuerst in den „Entry-clone“ (BP-Reaktion) und anschließend in den Zielvektor (LR-Reaktion) kloniert. Die Kontrolle der generierten Plasmid-Konstrukte erfolgte sowohl durch spezifischen Verdau durch Endonukleasen als auch durch Sequenzierung, welche von der Seq IT GmbH & Co.KG in Kaiserslautern durchgeführt wurde.

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* und *A. tumefaciens* wurde in Anlehnung an die Rubidiumchlorid- (Hanahan, 1983) bzw. an die „freeze-thaw“-Methode (Höfgen & Willmitzer, 1988; Höfgen & Willmitzer, 1990) durchgeführt, Arabidopsis Pflanzen wurden nach der „Floral Dip“-Methode transformiert (Clough & Bent, 1998).

#### **2.4.2 Verwendete Oligonukleotide**

Oligonukleotide sind synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-Fragmente von einer Länge zwischen 18-45 bp. Als Primer finden sie Anwendung in der Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen mittels PCR und qRT-PCR, sowie in der DNA-Sequenzanalyse. Die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg). In nachfolgender Tabelle 2.3 sind alle zu Klonierungszwecken, Sequenzierungen und Expressionsanalysen verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.



Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	5' → 3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
LBb1	GCGTCGACCGCTTGCTGCAACT
SOS1_1_for	TCATGGCGATTTCTTTTTCTG
SOS1_1_rev	TCCCAGTAAGTTGCTTGCA
SOS1_2_for	GCTACATTTCTGCTGCGTTTC
SOS1_2_rev	ATCAAGTCGCACAGATATGGC
Ef1 $\alpha$ _s	GAGACCAAGTACTACTGCAC
Ef1 $\alpha$ _as	GTTGTTCCTTGTACCAGTCAAG
PP2a_s	TAACGTGGCCAAAATGATGC
PP2a_as	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
SOS1_for	ATGACGACTGTAATCGACGC
SOS1_rev	TCATAGATCGTTCCTGAAAACG
SOS1C_EcoRI-Strep_for	TTTGAATTCATGTGGAGCCACCCACAGTTCGAAA AGTTTGTCTACGC
SOS1_XbaI_rev	TTTTCTAGATCATAGATCGTTCCTGAAAACGATTTTACT
SOS1C_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTTGT CTACGCCTTCTTCG
SOS1_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATCGTTC CTGAAAACG
SOS1_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATAGATCGT TCCTGAAAACG
RTSOS1for	TTTGGAGCATTGGAGCTGATAG
RTSOS1rev	TTTCTTTCTGATTGGCTGAAACG
RTSOS1-N_for	TTTGGAAATTCATGGCGATTTCTTTTTTC
RTSOS1-N_rev	TTTGAAGGCGTAGAACAAATTGGG
CAB1_fwd RT	CTGAGTTGAAGGTGAAGGAG
CAB1_rev RT	CAAGCTCTCTTTCTCCTCTC
SUC2_fwd RT	CTTGGTTTCATGTCTCTTGGTG
SUC2_rev RT	CTAGATTCAGAACACCTAGGG
WRKY_fwd RT	GTGAAGATGAAGGGATGTC
WRKY_rev RT	CACAACCTTGGGAATGTGC
FT_fwd RT	CCCTGCTACAACCTGGAACAAC
FT_rev RT	CACCCTGGTGCATACACTG
14-3-3 $\omega$ _for	TTTATGGCGTCTGGGCGTGAAG
14-3-3 $\omega$ _rev	TTTTCACTGCTGTTCCCTCGGTTCG
14-3-3 $\nu$ _for	TTTATGTCTTCTGATTCGTCCCGG
14-3-3 $\nu$ _rev	TTTTCACTGCGAAGGTGGTGGTTG
14-3-3 $\kappa$ _for	TTTATGGCGACGACCTTAAGCAG
14-3-3 $\kappa$ _rev	TTTTCAGGCCTCATCCATCTGC

14-3-3λ_for	TTTATGGCGGCGACATTAGGCAG
14-3-3λ_rev	TTTTCAGGCCTCGTCCATCTGC
14-3-3ω_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGTCT GGGCGTGAAG
14-3-3ω_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCTGTTC CTCGGTC
14-3-3ω_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTGCT GTTCCCTCGGTC
14-3-3ν_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCTT CTGATTCGTCCCAGGAAG
14-3-3ν_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCGAAGGT GGTGGTTG
14-3-3ν_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTGC GAAGGTGGTGGTTG
14-3-3κ_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGACG ACCTTAAGCAGAGATC
14-3-3κ_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGCCTCA TCCATCTGC
14-3-3κ_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCCT CATCCATCTGC
14-3-3λ_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCG GCGACATTAGGCAGAGAC
14-3-3λ_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCC TCGTCCATCTGCTCCTG
14-3-3λ_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCC TCGTCCATCTGCTCCTG
14-3-3ω_for_pET16b (NdeI)	TTTCATATGGCGTCTGGGCGTGAAG
14-3-3ω_rev_pET16b (BamHI)	TTTGGATCCTCACTGCTGTTCCTCG
14-3-3κ_for_pET16b (NdeI)	TTTCATATGGCGACGACCTTAAGCAG
14-3-3κ_rev_pET16b (BamHI)	TTTGGATCCTCAGGCCTCATCCATC
14-3-3λ_for_pET16b (NdeI)	TTTCATATGGCGGCGACATTAGGCAG
14-3-3λ_rev_pET16b (BamHI)	TTTGGATCCTCAGGCCTCGTCCATCTGC
CPK3_for	TTTATGGGCCACAGACACAGCAAGTCC
CPK3_rev	TTTTACATTCTGCGTCGGTTTGGCACC
CPK3_for-gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG GCCACAGACACAGCAAG
CPK3_rev-gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATTCTG CGTCGGTTTGGC
CPK3_rev+gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACATTCTG CGTCGGTTTGGC
SOS978f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGATAGGACTCTA CATCGAAGACCATCTTCGTTA
SOS3'1146	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATCATAGATCG TTCCTGAAAACGATTTT

### 2.4.3 Verwendete Vektoren und hergestellte Konstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und hergestellten Konstrukte sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren**

Vektor	Verwendung	Resistenz	Referenz
pBSK	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , pUC19 Backbone, Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	Stratagene, Heidelberg
pET16b	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	Amp <sup>R</sup>	Novagen, Heidelberg
pHannibal	CaMV35S-Promotor, Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	Wesley <i>et al.</i> (2001)
pART27	$\beta$ -gal <sup>+</sup> , Pflanzentransformationsvektor (Kan <sup>R</sup> )	Kan <sup>R</sup> Spec <sup>R</sup>	Gleave (1992)
pDONR/Zeo	Entry Clone für BP-Klonierung im Gateway System	Spec <sup>R</sup>	Invitrogen
pUBC nYFP	Gateway kompatibler Pflanzentransformationsvektor mit UQB10-Promoter	Spec <sup>R</sup> Clm <sup>R</sup>	Grefen <i>et al.</i> (2010)
pUBC cYFP	Gateway kompatibler Pflanzentransformationsvektor mit UQB10-Promoter	Spec <sup>R</sup> Clm <sup>R</sup>	Grefen <i>et al.</i> (2010)
pUBN nYFP	Gateway kompatibler Pflanzentransformationsvektor mit UQB10-Promoter	Spec <sup>R</sup> Clm <sup>R</sup>	Grefen <i>et al.</i> (2010)
pUBN cYFP	Gateway kompatibler Pflanzentransformationsvektor mit UQB10-Promoter	Spec <sup>R</sup> Clm <sup>R</sup>	Grefen <i>et al.</i> (2010)
pGEX-3x	GST Expressionsvektor, Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	Amp <sup>R</sup>	GE Healthcare
pDEST <sup>TM</sup> 15	Gateway kompatibler GST Expressionsvektor, Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	Amp <sup>R</sup>	Thermo Scientific

**Tabelle 2.5: Hergestellte Konstrukte**

Konstrukt	Insert/Vektor	Resistenz	Referenz
pKD1	<i>SOS1</i> in pBSK	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD2	<i>35S:AtSOS1 C-terminus (AS446-1146)</i> in pHannibal	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

pKD3	<i>35S:AtSOS1 C-terminus (AS446-1146)</i> in pART27	Kan <sup>R</sup> Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD4	<i>AtSOS1 C-terminus (AS978-1146)</i> in pDEST <sup>TM</sup> 15	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit, vorbereitet von Dr. Xjuju Li (University of Alberta, Kanada)
pKD5	<i>AtSOS1 C-terminus-YFP<sup>N</sup></i> Fusion in pUBC nYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD6	<i>AtSOS1 C-terminus-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD7	<i>At14-3-3<math>\omega</math>-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD8	<i>At14-3-3<math>\nu</math>-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD9	<i>At14-3-3<math>\kappa</math>-YFP<sup>N</sup></i> Fusion in pUBC nYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD10	<i>At14-3-3<math>\kappa</math>-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD11	<i>At14-3-3<math>\lambda</math>-YFP<sup>N</sup></i> Fusion in pUBC nYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD12	<i>At14-3-3<math>\lambda</math>-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD13	<i>AtCPK3-YFP<sup>N</sup></i> Fusion in pUBC nYFP	Spec <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD14	<i>AtTST1-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBN cYFP	Spec <sup>R</sup>	Sebastian Nickolaus
pKD15	<i>AtTVIK1-YFP<sup>N</sup></i> Fusion in pUBN nYFP	Spec <sup>R</sup>	Sebastian Nickolaus
pKD16	<i>AtVIK1-YFP<sup>C</sup></i> Fusion in pUBC cYFP	Spec <sup>R</sup>	Sebastian Nickolaus
pKD17	<i>At14-3-3<math>\omega</math></i> in pET16b	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD19	<i>At14-3-3<math>\kappa</math></i> in pET16b	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD20	<i>At14-3-3<math>\lambda</math></i> in pET16b	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

#### 2.4.4 Verwendete Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit gramnegativen *E. coli*-Bakterien, als auch mit *A. tumefaciens* gearbeitet. Die Eigenschaften der verwendeten Stämme sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Verwendung	Resistenz	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	endA1, gyrA96(nalr), thi-1, recA1, relA1, lac, glnV44 F <sup>+</sup> [μTn10, proAB+, lacIq, (lacZ)M15], hsdR17(rK- mK+)	Klonierung	Tetrazyklin	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, φ80dlacZ_M15, Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+)	Klonierung, Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	/	Taylor <i>et al.</i> (1993)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal [dcm] [lon] λ(DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Heterologe Expression	Chloramphenicol	Novagen
<i>E. coli</i> BL21-SI	F <sup>-</sup> ompT lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal [dcm] endA1 proUp::T7 RNAP::malQ-lacZTet	Heterologe Expression	/	Invitrogen
<i>A. tumefaciens</i> GV3101::PM90	pMP90 Ti Plasmid (Genr)	Transformation in <i>A. thaliana</i>	Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin	Koncz & Schell (1986)

#### 2.4.5 Anzucht von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *E. coli*-Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in sterilem YT-, LB- oder TB-Medium (Sambrook & Russell, 2001), bzw. nach Transformation in ΨB-Medium (Hanahan, 1983). Zur Sterilisation wurden die Medien bei 121°C für 20 min autoklaviert.

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

LB-Medium: 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
 0,8% (w/v) Pepton  
 0,75% (w/v) NaCl, pH 7,0 (NaOH)

LBon-Medium: 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
 0,8% (w/v) Pepton, pH 7,0 (NaOH)

LBIs-Medium: 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
 0,8% (w/v) Pepton  
 0,05% (w/v) NaCl, pH 7,0 (NaOH)

TB-Medium: 2,4% (w/v) Hefe-Extrakt  
 1,2% (w/v) Pepton  
 0,4% (w/v) Glyzerin

Dem TB-Medium wurde nach dem Autoklavieren steriler 10x Kalium-Phosphat-Puffer im Verhältnis 9:1 (720 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 170 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) zugesetzt.

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

*A. tumefaciens* wurde unter sterilen, aeroben Bedingungen bei 30°C in YEB Medium angezogen.

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

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien zusätzlich 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika (Tabelle 2.7). Zur Aufbewahrung der Bakterienklone wurden die entsprechenden Kulturen mit Glyzerin (15% (v/v)) versetzt und bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration</b>
Ampicillin	200 µg ml <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	25 µg ml <sup>-1</sup>
Gentamycin	25 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	25 µg ml <sup>-1</sup>
Rifampicin	100 µg ml <sup>-1</sup>
Spectinomycin	50 µg ml <sup>-1</sup>
Tetrazyklin	10 µg ml <sup>-1</sup>

#### 2.4.6 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

Bakterienzellen werden als kompetent bezeichnet, wenn sie die Fähigkeit besitzen verstärkt fremde DNA aufzunehmen. Den Vorgang, bei dem DNA in eine lebende Zelle eingefügt wird, bezeichnet man als Transformation. Mandel & Higa (1970) stellten fest, dass *E. coli*-Zellen, die mit eiskalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung behandelt wurden, verstärkt in der Lage waren DNA aus wässrigen Lösungen aufzunehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten, kompetenten *E. coli*-Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Der Zusatz von Rubidiumchlorid steigert, basierend auf der Methode von Mandel & Higa (1970) die Transformationseffizienz.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 300 ml  $\Psi\text{B}$ -Medium mit Zellen aus einer *E. coli*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 beimpft und unter aeroben Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm, gemessen mittels eines Photometers, Eppendorf Bio-Photometer, Hamburg) von 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und bei 3000 rpm für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert. Das entstandene Pellet wurde in 40 ml TFB1-Puffer resuspendiert und nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis erneut zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde nun in 4 ml TFB2-Puffer aufgenommen. Nach dem Aliquotieren der kompetenten Zellen wurden diese sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

TFB1: 30 mM  $\text{KCH}_3\text{CO}_2$   
100 mM  $\text{RbCl}$   
10 mM  $\text{CaCl}_2$   
50 mM  $\text{MnCl}_2$   
15% (v/v) Glycerin  
sterilfiltriert, pH 5.8

TFB2: 10 mM MOPS  
10 mM  $\text{RbCl}$   
75 mM  $\text{CaCl}_2$   
15% (v/v) Glycerin  
sterilfiltriert, pH 6.5

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde nun jeweils ein Aliquot von 100  $\mu\text{l}$  für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1-3  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes von 20  $\mu\text{l}$  wurden die Zellen für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 90 s bei  $42^\circ\text{C}$ . Dieser Hitzeschock erleichtert die direkte Aufnahme von Fremd-DNA in die Bakterienzelle. Diese wurden nun

für 5 min auf Eis gelagert und nach der Zugabe von 1 ml ΨB-Medium für 1 h aerob bei 37°C regeneriert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 100 µl der transformierten Zellen auf YT-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Tab. 2.7) ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

#### **2.4.7 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *A. tumefaciens***

Die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (1988). Dazu wurden 300 ml YEB-Medium aus einer Agrobakterien-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 beimpft und aerob bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 g für 10 min bei 4°C abgedreht und das entstandene Pellet wurde mit 1/10 Volumen TE-Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 20 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika resuspendiert und in 500 µl Aliquots aufgeteilt. Nach dem Aliquotieren wurden die kompetenten Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Die Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens* wurde in Anlehnung an die „freeze-thaw“-Methode (Höfgen & Willmitzer, 1990) durchgeführt. Hierzu wurde je ein Aliquot kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen für 2 h auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden bis zu 50 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und die Zellen wurden für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Schockgefrieren von 5 min in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen für 5 min bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Zur Regeneration wurden die Zellen 4-6 h unter aeroben Bedingungen bei 30°C in 1 ml YEB-Medium angezogen. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 200 µl der transformierten Zellen auf YEB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Tabelle 2.7) ausplattiert und über Nacht bei 30°C angezogen.

#### **2.4.8 Plasmidisolierung aus *E. coli***

##### **2.4.8.1 Mini-Plasmid-Präparation**

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) durchgeführt. Dieses Prinzip beruht auf den unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA und Proteinen (Sambrook & Russell, 2001). Für die Plasmidisolierung wurden 4 ml Übernachtskultur durch Zentrifugieren (11000 g, 30 s, RT) geerntet. Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl P1-



Puffer mit 1 mg/ml DNase-freier RNase (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (Qiagen, Hilden), der Natriumdodecylsulfat enthält. Durch Zugabe von 200 µl P3-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde die Reaktion nach maximal 5 min durch Neutralisierung gestoppt. Nach mehrmaligem Invertieren und zehnmütiger Inkubation auf Eis fallen Proteine und chromosomale DNA durch das enthaltene Kaliumacetat als Salz-Detergens-Komplexe aus und können durch Zentrifugieren (13000 rpm, 15 min, 4°C) sedimentiert werden. Die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumen 100%igem Isopropanol (p.a.) bei RT gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 15 min, 4°C) entstand ein Plasmid-DNA-Niederschlag, der im Anschluss mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter der Sterilbank getrocknet und in 30 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O resuspendiert wurde.

Puffer P1: 25 mM Tris-HCl  
10 mM EDTA  
1 mg/ml RNase  
pH 8,0

Puffer P2: 0,2 N NaOH  
1% (w/v) SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat  
pH 5,5

#### **2.4.8.2 Plasmid-Präparation mittels QIAprep® Spin Methode**

Zur DNA-Sequenzierung sowie für andere molekularbiologischen Arbeiten wurde besonders reine Plasmid-DNA benötigt. Dazu wurde die DNA mithilfe des „NucleoSpin® Plasmid-Kits“ von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert. Diese Methode basiert auf dem Einsatz einer Silikatgel-Membran, an die die DNA unter „high-salt“ Bedingungen nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen adsorbiert. In einem letzten Schritt wird die DNA nach mehreren Waschschritten mit H<sub>2</sub>O wieder von der Membran eluiert.

#### **2.4.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Die Konzentration isolierter Plasmid-DNA, sowie deren Reinheit wurde mit dem Spektralphotometer „Nano-drop® ND-1000“ (Peqlab, USA) bestimmt. Mögliche Verunreinigungen durch Proteine konnten anhand hoher Extinktionswerte bei 239 nm (Absorption der Peptidbindung) und bei 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) nachgewiesen werden.

#### **2.4.10 *In vitro* Manipulation und Ligation von DNA**

*In vitro* Manipulation bezeichnet das gezielte Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme), sowie das kontrollierte Zusammenfügen von DNA-Fragmenten durch Ligasen. Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA innerhalb palindromischer Erkennungssequenzen. Palindrome sind Sequenzen, die in beiden Strängen symmetrisch und damit identisch sind. Anhand dieser Methode wurden DNA-Fragmente in Plasmide eingebracht. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot) bezogen und mit den dazugehörigen Puffermedien nach Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss an eine Restriktion von DNA bzw. zur Reinigung von PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.11) durchgeführt. Diese dient der Trennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe. Die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen erfolgte mithilfe des „Nucleo-Spin-Extract II-Kits™“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode basiert ebenfalls auf der Adsorption von DNA an eine Silikatgel-Membran unter hohen Salzkonzentrationen. Salze, Proteine und Agaroserückstände, welche bei nachfolgenden Reaktionen (Restriktion, Ligation) stören könnten, wurden durch Waschen der Membran entfernt. Durch einen leicht alkalischen Puffer wurde die DNA letztlich von der Silikatgel-Membran eluiert. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe der DNA.

#### **2.4.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen. Sie bewegen sich in einem elektrischen Feld daher von der Kathode zur Anode. Dabei können kleinere Fragmente die Gelmatrix (Agarose) schneller passieren als größere Fragmente. Die Geschwindigkeit der Moleküle ist abhängig von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers (Mülhardt, 2006). Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Gelkammern verwendet. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert und im UV-Licht ( $\lambda = 260$  nm) orange-rot fluoresziert, konnten die verschiedenen DNA-Banden anschließend nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%ige bis 2%ige Agarose-Gele (w/v) hergestellt. Für die Herstellung von Agarose-Gelen wurden entsprechende Mengen an

Agarose (Invitrogen, Eggenheim) eingewogen, mit den entsprechenden Volumina an TAE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt. Die zu trennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit zehnfach-konzentriertem TAE-Ladepuffer versetzt. Die Gelkammern waren mit einem einfach konzentrierten TAE-Laufpuffermedium gefüllt. Die Proben wurden bei einer konstanten Spannung von 120 mV aufgetrennt. Mithilfe *Pst*I-verdauter λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) konnten die jeweiligen Fragmentgrößen schließlich identifiziert werden.

TAE-Laufpuffer (50-fach):	242 g Tris-HCl 57,1 ml Eisessig 500 mM EDTA ad 1 l H <sub>2</sub> O pH 5,8
TAE-Ladepuffer (10-fach):	30 % (v/v) Glycerin 0,24 % (v/v) Bromphenolblau in 10-fach TAE-Puffer ansetzen

#### **2.4.12 DNA-Amplifikation mittel Polymerase-Ketten-Reaktion**

Zur *in vitro* Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) eingesetzt (Saiki *et al.*, 1988). Durch zwei kurze synthetische Oligonukleotid-Primer, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment begrenzen, wurde der gewünschte Sequenzabschnitt festgelegt. Im Verlauf der PCR-Reaktion wird die DNA-Doppelhelix bei 95°C thermisch denaturiert, mit den Primern bei ca. 50°C bis 70°C hybridisiert („Annealing“) und von einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei 72°C verlängert („Elongation“). Die zur DNA-Synthese notwendigen Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) wurden dem PCR-Ansatz in molarem Überschuss zugefügt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) unter Verwendung von *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerasen durchgeführt.

#### **2.4.13 DNA Sequenzanalyse**

Zur Überprüfung der klonierten DNA-Konstrukte auf ihre Richtigkeit wurden Sequenzanalysen durch die Seq IT GmbH und CoKG, Kaiserslautern durchgeführt.

#### 2.4.14 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*: „RNeasy® Plant Mini Kit“

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* diente der Herstellung von cDNA für den Einsatz in der quantitativen RT-PCR (Kapitel 2.4.16). Hierzu wurde Blatt- sowie Wurzelmaterial von Arabidopsis Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen in flüssigem Stickstoff gemörsert. Je 100 mg dieses Pflanzenmaterials wurde folglich für die Isolierung der RNA mit Hilfe des „RNeasy® Plant Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu verhindern, wurde ein Verdau mit RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde schließlich mit dem „NanoDrop® ND-1000“ (Peqlab, Erlangen) photometrisch bestimmt.

#### 2.4.15 cDNA Synthese

Im Anschluss an die RNA-Isolierung folgte die Synthese der *complementary* DNA (cDNA) mithilfe des cDNA-Kits von ThermoScientific (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Als Template für die cDNA-Synthese diente 1 µg der zuvor isolierten mRNA (Kapitel 2.4.14). Die erhaltene cDNA wurde 1:10 verdünnt und als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt.

#### 2.4.16 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der quantitativen RT-PCR handelt es sich um eine Echtzeit-Messung, die am „iCycler“ mit dem „MyiQ Detection System“ (Bio-Rad, München) durchgeführt wurde. Hierbei wurde das Expressionslevel verschiedener Gene in verschiedenen Pflanzenlinien miteinander verglichen. Die Transkript-Menge der untersuchten Gene wurde dabei auf die Transkript-Menge eines sogenannten *housekeeping* Gens normiert, dessen Transkriptionsrate unter verschiedenen Bedingungen annähernd konstant ist. Bei den in dieser Arbeit verwendeten *housekeeping* Genen handelt es sich um den Elongationsfaktor *EF1α* bzw. *PP2A*. Wenn man davon ausgeht, dass der Beginn der exponentiellen Vermehrung eines DNA-Fragments von seiner Ausgangskonzentration abhängt, so beginnt die Amplifikation eines höher konzentrierten Fragmentes früher. Die Amplifikation kann anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* gemessen werden. Dieser Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein und emittiert dann Licht der Wellenlänge 524 nm. Daraus ergibt sich eine exponentielle Darstellung der amplifizierten doppelsträngigen DNA. Als Schwellenwert der Fluoreszenz wurde der Wert festgelegt, bei dem alle Proben im Beginn der exponentiellen Amplifikation waren. Von diesem Schwellenwert kann auf die entsprechende

PCR-Zyklen-Anzahl hochgerechnet werden. Dieser Schwellenwert-Zyklen-Wert (Ct) gibt den Zyklus an, in dem sich die einzelnen Proben am Beginn ihrer exponentiellen Amplifikation befanden, und erlaubt somit eine relative Quantifizierung der Ausgangskonzentration an cDNA. Es wurden 4 µl cDNA mit 10 µl „iQ SYBR Green Supermix“ (Bio-Rad, München) und 2 µl Primermix (sense- und antisense-Primer, 10 µM) auf 20 µl Gesamtreaktionsvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Fluoreszenz wurde während der Elongation bei 72°C gemessen.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Heterologe Expression in *E. coli* -Zellen

#### 2.5.1.1 SOS1 C-terminus mit GST-tag

Zur Synthese rekombinanter Proteine wurde die Methode der heterologen Expression in *E. coli* verwendet. Dazu wurde der Expressionsvektor pDEST™15 benutzt, der es ermöglicht ein getagtes GST-Fusionskonstrukt herzustellen (Kapitel 2.4.3). Das generierte GST-SOS1 C-terminus (AS978-1146)-Plasmid-Konstrukt wurde im Anschluss zur Transformation von *E. coli* BL21 (SI) Zellen verwendet. Die heterologe Expression des GST-getagten Proteins erfolgte anhand des „*E. coli*-Expression-Systems mit Gateway-Technologie“-Protokolls nach Angaben des Herstellers (ThermoScientific). Durch Zugabe von 3 M NaCl in einer Endkonzentration von 0,3 M bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die T7-RNA Polymerase induziert. Dies führte zur Transkription der eingefügten Gensequenz hinter dem T7-Promotor des pDEST™15-Vektors. Nach der Induktion wurden die Zellen von 37°C auf 20°C transferiert. Die Ernte der Zellen erfolgte 16 h nach Induktion der Genexpression durch Zentrifugation (5000 g, 15 min, 4°C).

Aufschlusspuffer: 10 mM TRIS-HCl  
pH 7,4

Die Zellen wurden nach der Ernte in Aufschlusspuffer resuspendiert und mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) sowie einer Tablette cComplete Tablets, Mini (Roche) als Proteaseinhibitoren versetzt. Der Aufbruch der Zellen erfolgte mechanisch mithilfe eines Hoch-Druck-Homogenisators (EmulsiFlex-C3) auf Eis. Entstandene Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (12500 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert und der Überstand, der das lösliche Protein enthält, konnte für weitere Versuche verwendet werden.

### 2.5.1.2 14-3-3 Proteine mit His-Tag

Zur Synthese der Interaktionspartner für den Peptid-Spot Binde-Assay wurde der Expressionsvektor pET16b genutzt, der es ermöglicht ein getagtes (10x)Histidin-Fusionskonstrukt herzustellen (Kapitel 2.4.3). Die generierten Plasmid-Konstrukte wurden im Anschluss zur Transformation von *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Zellen verwendet. Diese Zellen weisen sich wie auch die *E. coli*-Stämme BL21 durch eine genetische Inaktivierung der OmpT- und Lon-Proteasen aus. Für den Einsatz eines pET-Expressionssystems eignen sich weiterhin Stämme, die den Bakteriophagen DE3 ( $\lambda$ -Derivat) in ihrem Genom integriert haben. Die cDNA dieses Phagen beinhaltet den *lacUV5*-Promotor und ein für die T7-RNA-Polymerase kodierendes Gen. Der *lacUV5*-Promotor kann mithilfe von IPTG (Isopropylthiogalaktosid) induziert werden. Die heterologe Expression der (10x)Histidin-getagten Proteine erfolgte anhand des „pET-Expression-System“-Protokolls nach Angaben des Herstellers (Novagen, Heidelberg). Durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die T7-RNA Polymerase induziert. Dies führte zur Transkription der eingefügten Gensequenz hinter dem T7-Promotor des pET16b-Vektors (Studier *et al.*, 1990). Die Ernte der Zellen erfolgte 4 h nach Induktion der Genexpression durch Zentrifugation (5000 g, 15 min, 4°C).

Bindepuffer: 300 mM NaCl  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
20 mM Imidazol  
pH 8,0

Die Zellen wurden nach der Ernte in Bindepuffer resuspendiert und mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Proteaseinhibitor versetzt. Der Aufbruch der Zellen erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (Ultraschallstab: Sonifier, Branson Ultrasonic S.A., Carouge-Genève, Schweiz) in Eiswasser. Entstandene Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (12.500 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert und der Überstand, der das lösliche Protein enthält, konnte für weitere Versuche verwendet werden.

## 2.5.2 Reinigung von rekombinantem Protein mittels Affinitäts-Chromatographie

### 2.5.2.1 Reinigung SOS1 C-terminus mittels Glutathion-Agarose

Zur Verwendung des SOS1 C-terminus (AS978-1146) Proteins für die Identifizierung von Interaktionspartnern mittels Pulldown-Assay wurde das heterolog im *E. coli*-System synthetisierte Protein mittels Glutathion Sepharose nach Angaben des Herstellers (GE

Healthcare) gereinigt. Dem in Kapitel 2.5.1.1 hergestellten Überstand wurde dazu eine entsprechende Menge an äquilibrierter Glutathion Sepharose zugegeben und für 4 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde die Glutathion Sepharose im „Batch“-Verfahren durch Waschen mit Waschpuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit und im Anschluss das gebundene Protein mit Elutionspuffer eluiert.

Waschpuffer: 10 mM PBS-T (1% Triton X-100)  
150 mM NaCl  
1 mM PMSF  
pH 7,4

Elutionspuffer: 50 mM TRIS-HCl  
7,5 mM reduziertes Glutathion  
1 mM PMSF  
pH 9,0

### 2.5.2.2 Reinigung der Interaktionspartner für Peptid-Spot Binde-Assay

Zur Verwendung der 14-3-3 Proteine für Peptid-Spot Binde-Assays wurden die heterolog im *E. coli*-System synthetisierten Proteine mittels IMAC gereinigt. Zur Anreicherung wurde Ni-Sepharose (GE-Healthcare, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Dem in Kapitel 2.5.1.2 hergestellten Überstand wurde eine entsprechende Menge an äquilibrierter Ni-Sepharose zugegeben und für 2 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde die Ni-Sepharose im „Batch“-Verfahren durch Waschen mit Bindepuffer, sowie mit Waschpuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit und im Anschluss das gebundene Protein mit Elutionspuffer eluiert.

Waschpuffer: 300 mM NaCl  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
60 mM Imidazol  
pH 8,0

Elutionspuffer: 300 mM NaCl  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
500 mM Imidazol  
pH 8,0

### 2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben erfolgte unter Verwendung von Roti®-Quant (Roth, Karlsruhe) nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Ein Aliquot der jeweiligen Probe wurde dazu auf 800 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Farbreagenz (Roth, Karlsruhe) versetzt und in Plastikküvetten (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Messung erfolgte dann mithilfe eines „BioPhotometer“ (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Abgleich diente eine Probe bestehend aus 800 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Farbreagenz.

### 2.5.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad, München) mittels diskontinuierlicher Sodiumdodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dabei wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 150 mV mit einem 12%igen Trenngel und einem 3%igen Sammelgel aufgetrennt. Als Größenmarker, der die Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine zulässt, wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, Karlsruhe) verwendet. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele anschließend in Entfärbelösung inkubiert.

Trenngel 12%: 12% (w/v) Acrylamid  
300 mM TRIS-HCl  
0,08% (w/v) SDS  
0,05% (w/v) TEMED  
0,05% (w/v) APS  
pH 8,8

Sammelgel 3%:3% (w/v) Acrylamid  
125 mM TRIS-HCl  
0,1% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) TEMED  
0,05% APS  
pH 6,8

SDS-Ladepuffer (6x):0,375 M TRIS-HCl  
60% (v/v) Glycerin  
0,3% (w/v) SDS  
1,5% (w/v) Bromphenolblau  
pH 6,8



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

### 2.5.5 Western Blot und Immunoprinting

Für das nachfolgende Immunoprinting wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektro-Blotting (Mini Tank Elektrobloetter, Bio-Rad, München) auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ , BioTrac® NT, VWR, Darmstadt) übertragen. Das SDS-Gel wurde dazu für mindestens 1 h bei 400 mA in Transferpuffer auf die Membran transferiert. Im Anschluss wurde die Membran durch Inkubation mit 3% BSA in TBS-Puffer für 1 h gesättigt, um ein Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Bindungen des Antikörpers zu verringern. Proteine, die mit einem (10x)Histidin-Tag versehen sind, wurden mithilfe eines monoklonalen Anti-Poly-Histidin-Antikörper (Sigma-Aldrich) nachgewiesen. Zur Detektion GST-getagter Proteine wurde ein polyklonaler Anti-GST-Antikörper (GE Healthcare) verwendet. Der Protein-Antikörper Nachweis erfolgte enzymatisch durch eine an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase. Überschüssiges BSA sowie ungebundener Antikörper wurden durch Waschen der Membran mit TBS-Puffer und TBST (TBS-Puffer mit 1% (v/v) Tween) entfernt.

Transferpuffer:	192 mM Glycin
	25 mM Tris-HCl, pH 8,3
	20% (v/v) Methanol
	1% (w/v) SDS
TBS-Puffer:	150 mM NaCl
	20 mM Tris-HCl, pH 7,5

### 2.5.6 Dotblot-Analyse zur Proteinbestimmung in Überexpressionspflanzen

Zum Nachweis des rekombinanten SOS1 C-terminus Proteins in den Überexpressionspflanzen wurde die Methode des Dotblot angewandt. Hierzu mussten zuerst die enthaltenen Proteine aus Blatt- sowie Wurzelmaterial von *A. thaliana* isoliert werden. Dazu wurden 300 mg Pflanzenmaterial von salzgestressten Wt- und Überexpressionspflanzen gemörsert und abgewogen. Im Anschluss wurden 300  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer dazugegeben und das Blattmaterial wurde mit einem Handpotter zerrieben. Nach einem Zentrifugationsschritt

bei 14000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration in den Proben wurde anschließend eine Acetonfällung über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit jeweils 4 Volumina eiskaltem Aceton versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Das entstandene Pellet wurde am nächsten Tag zweimal mit  $500\ \mu\text{l}$  kaltem Aceton gewaschen und letztlich in  $30\ \mu\text{l}$  farblosem 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und erneut die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Die Proben wurden im Anschluss auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße  $0,45\ \mu\text{M}$ , BioTrac® NT, VWR, Darmstadt) aufgetropft und mittels Ponceau-Färbung die Menge an vorhandenem Protein überprüft. Diese Färbung kann durch Waschen mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  und  $0,1\ \text{M}$  NaOH-Lösung wieder vollständig entfernt werden. Zur Detektion des Strep-getagten C-terminus wurde ein monoklonaler Anti-Strep-Tag® II-Antikörper (Novagen) verwendet. Die Entwicklung des Dotblots verläuft wie in Kapitel 2.5.5 ausführlich beschrieben.

Extraktionspuffer: 50 mM HEPES, pH 7,6 (KOH)  
1,5 mM PMSF

Ponceau S Stain: 0,1% (w/v) Ponceau-Rot in 1% (v/v) Essigsäure

### 2.5.7 Pulldown-Assay mittels Affi-Gel10

Das in Kapitel 2.5.2.1 gereinigte SOS1 C-terminus Protein (AS978-1146) wurde als Target-Protein für den Pulldown-Assay verwendet. Dazu wurden 10 mg des als GST-Fusionsprotein gereinigten Proteins an eine Affi-Gel10 Matrix (Bio-Rad) gekoppelt. Als Kontrolle wurde gereinigtes GST, welches durch Expression des Vektors pGEX-3X ohne exogenes Insert produziert wurde, an die Matrix gekoppelt. Bei Affi-Gel10 handelt es sich um ein aktiviertes Affinitätsmedium, das schnell, spontan und hocheffizient Liganden über eine primäre Aminogruppe bindet. An das Medium können dabei bis zu 35 mg Protein pro ml Gelmatrix gekoppelt werden. Zur Kopplung wurde die gewünschte Menge an Affi-Gel10 Matrix zu 4 ml Protein, gelöst in  $0,1\ \text{M}$  MOPS, pH 7,5 gegeben. Vorher wurde das Gel noch mit 3 Volumen eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die Mischung wurde über Nacht auf einem Schüttler bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einer Econo-Pac® Säule (Bio-Rad) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden  $100\ \text{mM}$  Ethanolamin, pH 8 zur Matrix gegeben, um freie, reaktive Stellen zu blockieren. Nach weiteren 2 h Inkubation ließ man die Lösung mittels Gravitationsfluss von der Säule ablaufen. Die Matrix wurde im Anschluss mit 20 ml  $0,1\ \text{M}$  MOPS, pH 7,5 nachgewaschen. Durch Waschen mit 5 Volumen PBS-Puffer, pH 7,4 wurde die Säule äquilibriert. Nun wurde der in

Kapitel 2.3.5 hergestellte Pflanzenextrakt auf die Säule gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Pflanzenextrakt von der Gelmatrix entfernt und mit PBS, pH 7.4 nachgewaschen, um ungekoppelte Proteine zu entfernen. Die nächsten Waschschriffe sowie die Elution der gebundenen Proteine fanden anschließend bei RT statt. Daher wurden alle verwendeten Puffer mit 1 mM PMSF versetzt, um einem Abbau der Proteine durch Proteasen vorzubeugen. Als nächstes wurde die Säule mit PBS-Puffer gewaschen, der zusätzlich 0,5% IGEPAL und 500 mM NaCl enthielt. Dieser Waschschriff diente der Entfernung unspezifisch an das Target-Protein gebundener Proteine. Ein anschließender Waschschriff mit PBS entfernte wiederum das Detergenz sowie das Salz von der Säule. Die abschließende Elution von stabil gebundenen Proteinen erfolgte mittels 1% SDS in PBS-Puffer. Hier ist es besonders wichtig, dass dieser Schriff bei RT abläuft, da das enthaltene SDS bei 4°C schnell ausfällt.

Bevor die eluierte Probe auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen wurde, wurde eine Protein-Präzipitation mittels Trichloressigsäure durchgeführt. Dazu wurde der Probe ¼ Volumen 20% Trichloressigsäure hinzugefügt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschriff (15 min, 14000 rpm, 4°C) wurden dem entstandenen Pellet 500 µl eiskaltes Aceton zugegeben. Die Probe wurde gevortext und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet, bevor anschließend 50 µl 4-fach SDS Ladepuffer hinzugefügt wurden. Die Proben wurden 10 min bei 95°C gekocht und zur Neutralisation wurden 0,5 µl 10 N NaOH zugegeben. 25 µl dieser Probe wurden nun auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und konnten zur Analyse der gebundenen Proteine zur Massenspektrometrischen Analyse geschickt werden. Die Analyse der Proben wurde von der Alberta Proteomics and Mass Spectrometry Facility (APM, Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Kanada) sowie vom Center of MS-analytics (TU Kaiserslautern, Fachgebiet Molekulare Biotechnologie und Systembiologie) durchgeführt.

### **2.5.8 Peptid-Spot Binde-Assay in Kooperation mit AG Zimmermann**

15-20 Aminosäuren lange synthetische Peptide wurden auf eine Zellulosemembran mit PEG als Linker nach der Solid-Phase-Methode gekoppelt (Hilpert *et al.*, 2007). Um die Interaktion von Proteinen mit den auf Zellulosemembran-immobilisierten Oligopeptiden zu detektieren, wurden die Zellulosemembranen zuerst 4 min in Methanol p.a. aktiviert und anschließend für 5 min in Bindungspuffer äquilibriert. Die Zellulosemembranen wurden nun über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten rekombinant-gereinigtem Protein inkubiert, mit dem eine Interaktion nachgewiesen werden soll. Am nächsten Tag wurden die Membranen 1 h mit 2%

Milchpulver in TBS blockiert. Die weitere Behandlung der Zellulosemembranen entspricht der Entwicklung eines Western Blots und verläuft wie in Kapitel 2.5.5 ausführlich beschrieben.

### 2.5.9 Transiente Transformation von Tabakblättern mittels *A. tumefaciens*

Die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation von *N. benthamiana* erfolgte nach dem Protokoll von (Wydro *et al.*, 2006). Dazu wurden je 12 ml einer *A. tumefaciens*-Übernachtskultur, die das gewünschte Konstrukt beherbergt, für 10 min bei 5000 g abgedreht und in Agrobakterien-Puffer resuspendiert.

Die Auswertung der transformierten Tabakblätter erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP5II).

#### Agrobakterien-Puffer

5 ml	0,1 M MES, pH 5,6
0,5 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
12,5 µl	600 mM Acetosyringon
ad 50 ml	bidest. H <sub>2</sub> O

### 2.5.10 *In planta* Transformation von *A. thaliana*

Die Herstellung genetisch veränderter Überexpressionspflanzen erfolgte mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation („floral Dip“-Methode; Clough & Bent, 1998). Dazu wurden zunächst 250 ml der transformierten Agrobakterien-ÜN-Kultur bei 3000 g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Agrobakterien-Zellpellet wurde anschließend in 500 ml 5% (w/v) Saccharoselösung mit 0,01% (v/v) Silwet L77 (BASF, Ludwigshafen) resuspendiert. Zur Transformation wurden die gesamten Blütenstände von etwa 8 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen in die *A. tumefaciens*-Suspension getaucht und im Anschluss für 48 h im Schwachlicht in einem „Minigewächshaus“ inkubiert. Die transformierten Pflanzen wurden danach unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife und Ernte gelagert werden.

### 2.5.11 Elektronische Datenverarbeitung

Die in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen von *AtSOS1* (At2g01980), *At14-3-3 λ* (At5g10450), *At14-3-3 κ* (At5g65430), *At14-3-3 υ* (At5g16050), *At14-3-3 ω* (At1g78300), *AtTST1* (At1g20840), *AtVIK1* (At1g14000) und *AtCPK3* (At4g23650) stammen aus der Datenbank „Aramemnon“ (Schwacke *et al.*, 2003).

Die Klonierungsplanung der Plasmid-Konstrukte erfolgte mit Hilfe der Software „Clone Manager Suite 7“ (Scientific Educational Software Cantral, USA).

Die abgebildeten Graphen, sowie die Ermittlung des Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism“ (GraphPad Software, Inc., USA) erstellt, bzw. errechnet.

### 3 Ergebnisse

Der Verlust landwirtschaftlich genutzter Böden durch Versalzung aufgrund von ungeeigneten Bewässerungs- und Bepflanzungsstrategien stellt ein immer größeres Problem dar. Um die stetig wachsende Weltbevölkerung mit Nahrung zu versorgen, sind die Landwirte verpflichtet immer mehr Ertrag auf begrenzter Anbaufläche zu produzieren (Munns, 2002; Rengasamy, 2006; Wicke *et al.*, 2011; Wang, Zheng *et al.*, 2013; Deinlein *et al.*, 2014). Um den Ertrag der vorwiegend salzsensitiven Kulturpflanzen zu steigern, wird viel Arbeit in die Erforschung und Generierung salztoleranter Pflanzen gesteckt (Apse & Blumwald, 2002; Munns *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2014). Einen Angriffspunkt dieser Forschung stellt der Salt-Overly-Sensitive (SOS) Signalweg dar. Bestehend aus dem Calcium-Sensor Protein SOS3, der Proteinkinase SOS2 und dem Plasmamembran-lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter SOS1 ist dieser Signalweg hauptsächlich am Export von Natrium aus der Zelle beteiligt (Wu *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Mahajan *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2013). Der SOS1-Transporter gehört zur Superfamilie der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter CPA1 und besteht aus 12-13 N-terminalen Transmembrandomänen gefolgt von einer extrem verlängerten C-terminalen, hydrophilen Region (Shi *et al.*, 2000; Chanroj *et al.*, 2012). Mit knapp über 700 Aminosäuren ist der C-terminus des *AtSOS1* mehr als zweimal so lang wie die korrespondierende zytosolische Domäne des menschlichen Homologs, *HsNHE1*. Dieser wird durch die Interaktion mit ca. 20 bisher bekannten Proteinen in seiner Funktion reguliert. Darunter befinden sich u. a. Proteinkinasen, Phosphatasen oder Calcium-bindende Proteine (Amith & Fliegel, 2013). Für den SOS1-Transporter wurden bislang lediglich drei Interaktionspartner identifiziert: die beiden Proteinkinasen SOS2 und MPK6 sowie das regulatorische Protein RCD1 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2011).

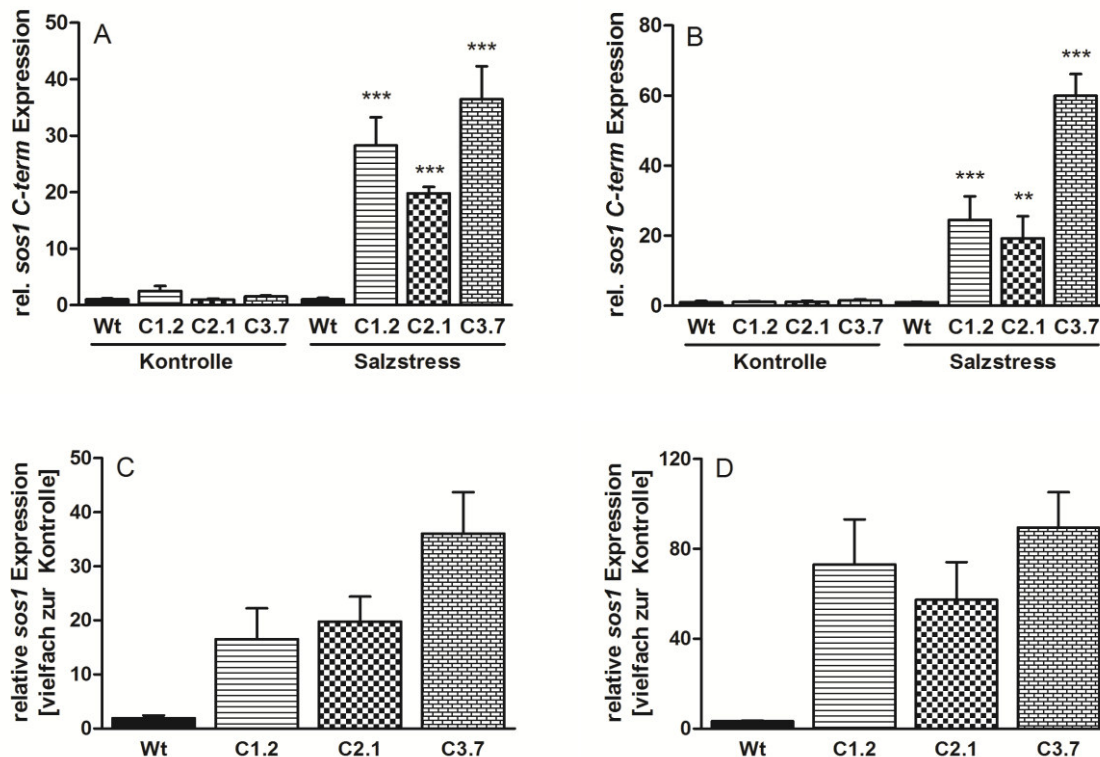
Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Mutanten-Pflanzen generiert, um weiterführende Erkenntnisse über die Funktion und die Regulation des zytosolischen C-terminus des SOS1-Transporters zu erhalten. Dazu wurde im Besonderen die physiologische Bedeutung von SOS1 unter Salzstress in diesen Mutanten analysiert. Zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner des SOS1 C-terminus wurde ein Pulldown-Assay mit gereinigtem *AtSOS1* C-terminus (AS978-1146) durchgeführt.

### 3.1 Analyse von Pflanzen mit erhöhtem *AtSOS1 C-terminus* Transkriptgehalt

Shi *et al.* (2003) konnten feststellen, dass *AtSOS1* Überexpressionspflanzen eine erhöhte Salztoleranz aufweisen. Diese Pflanzen zeigen unter Salzstressbedingungen u. a. ein gesteigertes Wurzellängenwachstum, ein erhöhtes Frischgewicht sowie eine geringere Natriumakkumulation (Shi *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der N-terminalen Membrandomäne des *Triticum durum* SOS1 diesen Effekt der Salztoleranz noch verstärkt. Es wird davon ausgegangen, dass das Entfernen der C-terminalen, regulatorischen Domäne das verbleibende SOS1 Protein konstitutiv aktiviert (Feki *et al.*, 2014). Um ein noch detaillierteres Verständnis der Regulation des SOS1 Antiporters in *A. thaliana* zu erlangen, wurden transgene Pflanzen generiert, die den *AtSOS1 C-terminus* (AS446-1146) überexprimieren. Der C-terminus stellt die regulatorische, zytosolische Domäne des Transporters dar und weist eine außergewöhnliche Länge von über 700 Aminosäuren auf. Als genetischer Hintergrund wurden Col0-Wildtyp-Pflanzen ausgewählt, die somit auch den endogenen SOS1-Transporter synthetisieren. Im Anschluss wurde die Salztoleranz dieser Pflanzen im Vergleich zum Wildtypen untersucht.

#### 3.1.1 Generierung und Identifizierung von 35S:*AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen

Zur Generierung von *AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen wurde die kodierende cDNA-Sequenz des *SOS1 C-terminus* (AS 446-1146) unter die Kontrolle des sehr starken, viralen Promotors des Cauliflower-Mosaic-Virus (CaMV-35S) gestellt. Durch diesen Promotor kommt es zu einer konstitutiven Expression des Gens in allen Geweben (Odell *et al.*, 1985). Das hergestellte 35S:*AtSOS1 C-terminus*-Konstrukt wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) vermittelte Transformation in das Genom von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Wildtyp-Pflanzen eingebracht (Clough & Bent, 1998). Der *AtSOS1*-Transkriptgehalt in den generierten Pflanzenlinien wurde anschließend mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) untersucht. Dazu wurde aus den entsprechenden Linien RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche als Template für die qRT-PCR diente. Die Bindestellen der verwendeten Primer befinden sich im C-terminalen Bereich der cDNA. In Abbildung 3.1 sind die Transkriptgehalte der drei stärksten Linien dargestellt.



**Abbildung 3.1: Relativer *AtSOS1 C-terminus* Transkriptgehalt in *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen**

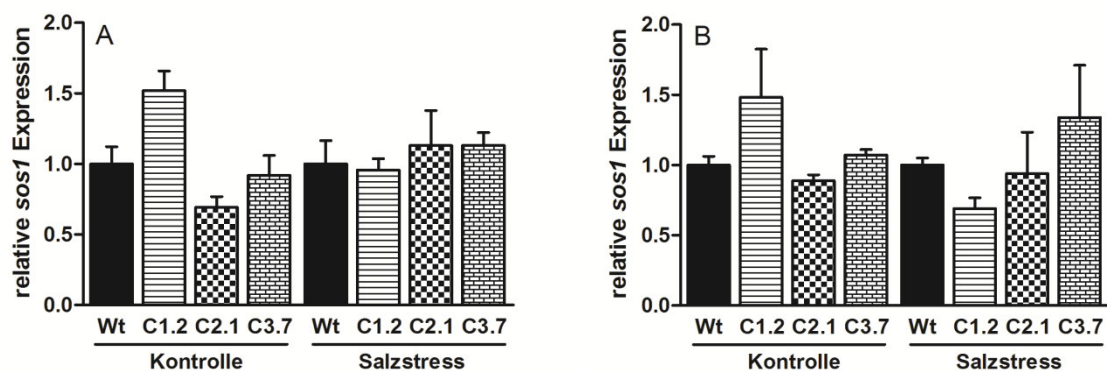
Dargestellt sind qRT-PCR-Analysen des *AtSOS1 C-terminus* Transkriptgehalts unter Kontroll- und Salzstressbedingungen (150 mM NaCl) von Wurzel (B,D) und Spross (A,C). Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* (At1g13320) normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs biologischen Replikaten  $\pm$  SE.

Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich ist, verändert sich die Expression des *AtSOS1 C-terminus* unter Kontrollbedingungen nicht erheblich. Setzt man die Pflanzen hingegen einem Salzstress aus, steigt die Expression des *AtSOS1 C-terminus* in den drei unabhängigen *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien deutlich, im Vergleich zum Wildtyp, an. Im Spross kommt es zu einer 28,3-fachen Erhöhung des Transkripts in der C1.2 Mutante, zu einer 19,8-fachen Erhöhung in der C2.1 Mutante und zu einer 36,5-fachen Erhöhung in der C3.7 Mutante (Abbildung 3.1A). In der Wurzel fällt die Zunahme des Transkriptlevels mit 24,5-fach (C1.2), 19,2-fach (C2.1) und 60-fach (C3.7) noch etwas höher aus (Abbildung 3.1B). Salzstress führt im Spross des Wildtypen zu einer 2-fachen Erhöhung des Transkriptgehaltes und in der Wurzel zu einer 3,4-fachen Erhöhung im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu steigt der Transkriptgehalt in der unabhängigen *35S:AtSOS1 C-terminus* Linie C1.2 um das 16,5-fache im Spross und sogar um das 73,1-fache in der Wurzel an. Die *35S:AtSOS1 C-terminus* Linie C2.1 verzeichnet eine Zunahme im Transkriptlevel um das 19,8-fache im Spross und um das 57,4-fache in der Wurzel. Die höchste Zunahme im



Transkriptgehalt nach Salzstressbedingungen mit 36,1-fach im Spross und 89,6-fach in der Wurzel zeigt sich in der *35S:AtSOS1 C-terminus* Linie C3.7 (Abbildung 3.1C,D).

Um sicher zu stellen, dass es aufgrund der Überexpression des *AtSOS1 C-terminus* in den drei unabhängigen Mutanten-Linien zu keiner Veränderung der Genexpression des endogenen *AtSOS1* kommt, wurde eine weitere qRT-PCR Analyse durchgeführt. Diesmal wurden Primer verwendet, die spezifisch an die cDNA des N-terminalen Transmembranbereichs des SOS1-Transporters binden. Da diese Domäne in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien nicht überexprimiert ist, sollte es hier zu keiner Veränderung im Transkriptgehalt kommen.



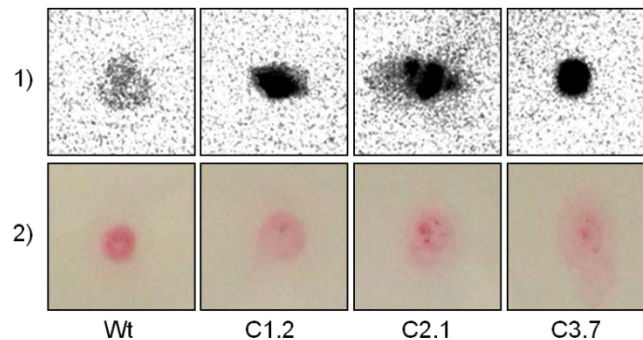
**Abbildung 3.2: Relativer *AtSOS1 N-terminus* Transkriptgehalt in *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen**

Dargestellt sind qRT-PCR-Analysen des *AtSOS1 N-terminus* Transkriptgehalts unter Kontroll- und Salzstressbedingungen (150 mM) von Wurzel (B) und Spross (A). Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs biologischen Replikaten  $\pm$  SE.

Abbildung 3.2 zeigt, dass es sowohl nach Kontroll- als auch nach Salzstressbedingungen nur zu geringen Schwankungen im *AtSOS1 N-terminus* Transkriptlevel kommt. In allen drei unabhängigen Mutanten-Linien bewegt sich der Wert um den auf 1 normierten Wert im Wildtyp.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Transkriptmenge in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien auch zu einem erhöhten *AtSOS1 C-terminus* Proteingehalt führt, wurde eine Dotblot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde zuerst aus allen vier Linien die Gesamtmenge an löslichen Proteinen aus Blatt- sowie Wurzelmaterial von *A. thaliana* isoliert. Nach einer Acetonfällung wurden die Proben in farblosem SDS-Ladepuffer aufgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Die Proben wurden im Anschluss auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetropft und mittels Immunoprinting auf das Vorhandensein des Proteins überprüft. Zur Detektion des überexprimierten *AtSOS1 C-terminus* diente ein Anti-Strep·Tag® II-Antikörper, der spezifisch an den am N-terminus angebrachten Strep·Tag® bindet (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Dotblot-Analyse zur Bestimmung des Proteingehalts in 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen**

Dargestellt sind die Dotblots, aufgetropft auf Nitrozellulose-Membran, aus Wurzelmaterial des Wt und den drei 35S:AtSOS1 C-terminus Linien.

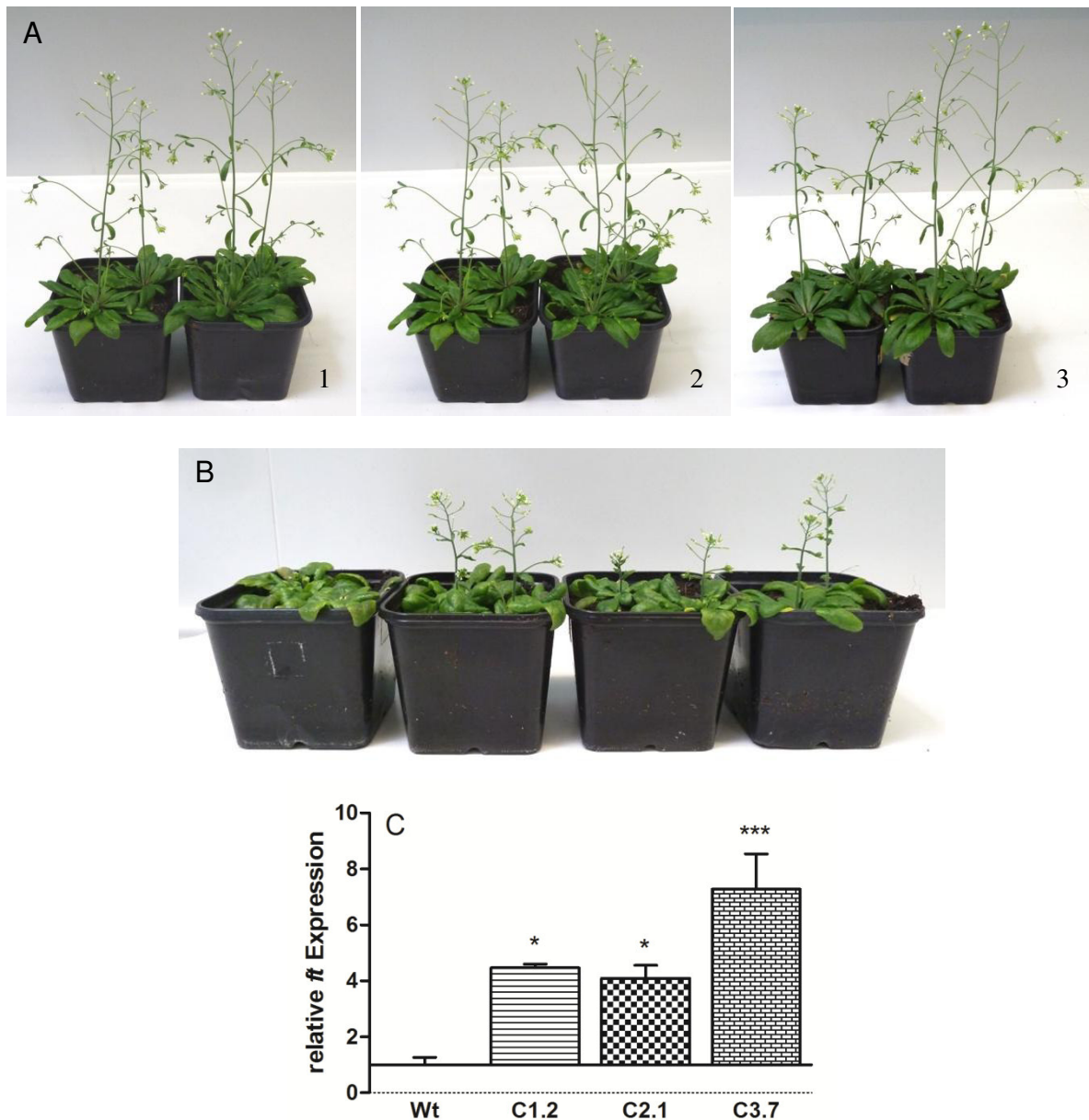
1) Dotblots entwickelt mit Anti-Strep·Tag® II-Antikörper und Anti-Maus-IgG (HRP-Konjugat)

2) Ponceau S Färbung

Das Strep·Tag® markierte SOS1 C-terminus-Protein kann im salzgestressten Wurzelgewebe aller drei 35S:AtSOS1 C-terminus Überexpressionslinien mittels Dotblot-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Im Spross ließ sich auf diese Weise kein Proteinnachweis durchführen. Die Expression des *sos1* Gens sowie die Synthese des SOS1-Proteins unterliegen komplexen und streng kontrollierten Regulationsmechanismen. Um keine Energie zu verschwenden, werden die Synthese und die Aktivität des SOS1 unter Kontrollbedingungen nur auf einem äußerst geringeren, basalen Niveau gehalten. Unter diesen Bedingungen ist kein Proteinnachweis möglich. Die Wildtyp-Probe zeigt kein positives Signal. Da diese Pflanzen nicht genetisch modifiziert wurden, kann hier auch kein getagtes Protein identifiziert werden.

Die Überexpression des *sos1 C-terminus* führt demnach neben einer Transkripterhöhung auch zur Synthese des gewünschten Proteins.

### 3.1.2 Anzucht auf Erde und Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung



**Abbildung 3.4: Wildtyp und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen unter Kontroll- und Salzstressbedingungen sowie Analyse des *FT* Transkripts unter Salzstressbedingungen**

Zu sehen sind Wildtyp- sowie die 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen unter Kontroll- (A) und Salzstressbedingungen (B). Die Pflanzen wurden nach dreiwöchiger Anzucht unter ambienten Bedingungen in eine Kammer mit Langtagbedingungen überführt (18 h Licht pro Tag). Anschließend wurden die Pflanzen alle drei Tage  $\pm 150$  mM NaCl über einen Zeitraum von zwei Wochen gewässert. Die Bilder wurden nach sieben Wochen aufgenommen. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt, die Bilder zeigen repräsentative Individuen.

(A) 1: Wt (links) und C1.2 Pflanzen; 2: Wt (links) und C2.1 Pflanzen; 3: Wt (links) und C3.7 Pflanzen.

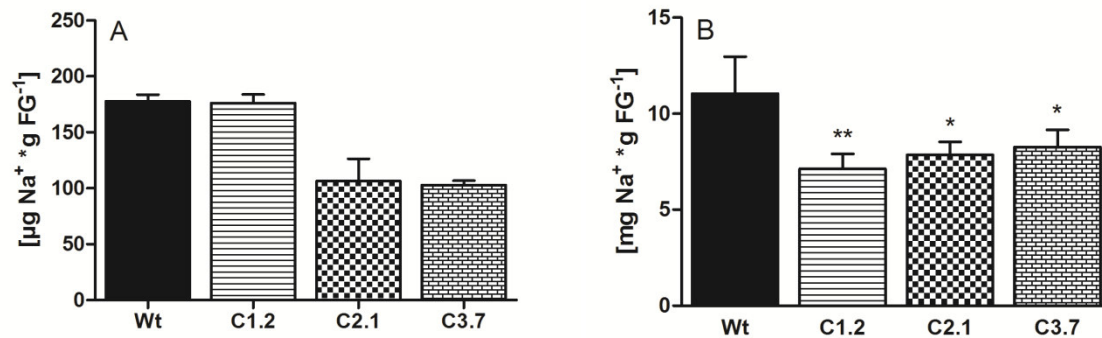
(B) von links nach rechts: Wt, C1.2, C2.1 und C3.7

(C) Relativer *FT* Transkriptgehalt unter Salzstressbedingungen. Dargestellt sind qRT-PCR-Analysen von Blattmaterial von Wt und 35S:AtSOS1 C-terminus Linien. Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* (At1g13320) normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Zur Untersuchung der pflanzlichen Entwicklung unter Kontroll- bzw. unter Langzeit-Salzstress wurden der Wildtyp sowie die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien auf Erde angezogen. Nach drei Wochen wurden die Pflanzen von Kurztag- auf Langtagbedingungen (18 h Licht pro Tag) umgesetzt und über einen Zeitraum von zwei Wochen mit oder ohne 150 mM NaCl gegossen. Abbildung 3.4 zeigt den Wildtyp sowie die drei unabhängigen *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien unter Kontroll- (A) und unter Salzstressbedingungen (B).

Unter Kontrollbedingungen weisen die vier Linien ein ähnliches Wachstum auf. Nach sieben Wochen befinden sich sowohl der Wildtyp als auch die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien mitten in der Blütenbildung (Abbildung 3.4A). Unter Salzstressbedingungen zeigt sich eine deutliche Verzögerung der Blütenbildung (Abbildung 3.4B). Bei den drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien zeigt sich nach zweiwöchigem Salzstress eine erste Blütenbildung, der Spross ist aber im Vergleich zu Kontrollbedingungen deutlich verkürzt. Der Wildtyp bildet unter den genannten Langzeit-Salzstressbedingungen noch keine Blüten aus. Der Übergang zum reproduktiven Wachstum hat hier noch nicht stattgefunden. Die Kontrolle des Blühzeitpunkts unterliegt einer Reihe komplexer genetischer Wechselwirkungen. Die beteiligten Signalwege passen den Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum dabei an verschiedene Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur oder Stress an (Li *et al.*, 2007; Lutts *et al.*, 1995). Die Unterschiede in der Blütenbildung können somit durch Analyse von Genen bestätigt werden, die an der Regulation dieses komplexen Vorgangs beteiligt sind. Die Untersuchung der Expression des Gens *flowering locus T (ft)* zeigt, dass die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien eine deutlich erhöhte Menge des *FT* Transkripts besitzen (Abbildung 3.4C). So weist die Linie C1.2 eine 4,5-fache, die Linie C2.1 eine 4,1-fache und die Linie C3.7 sogar eine 7,3-fache Erhöhung auf.

Um einen weiteren Hinweis auf die Verzögerung im Blühzeitpunkt zwischen Wildtyp und den drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien zu erhalten, wurde der Natriumgehalt in den Rosetten der spezifischen Linien bestimmt (Abbildung 3.5).



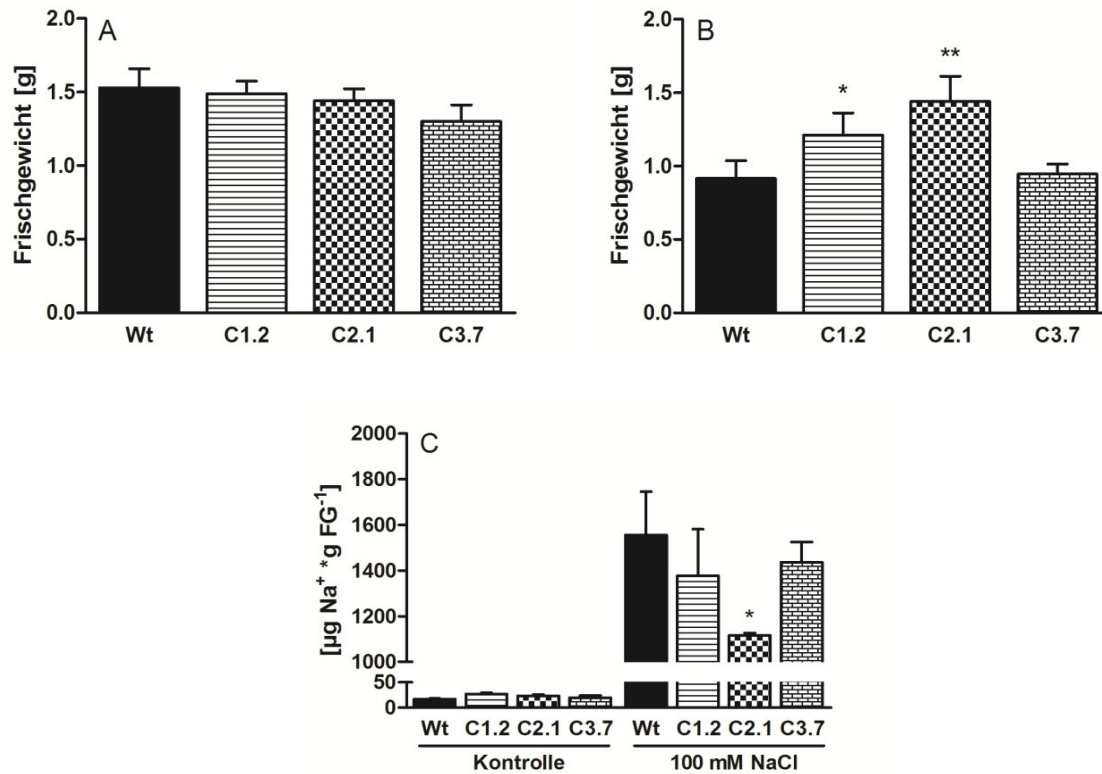
**Abbildung 3.5: Natriumakkumulation in Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen auf Erde**

Dargestellt ist die Natriumakkumulation in Wildtyp- und in den 35S:AtSOS1 C-terminus Linien unter Kontroll- (A) und Salzstressbedingungen (B). Die Pflanzen wurden nach dreiwöchiger Anzucht unter ambienten Bedingungen in eine Kammer mit Langtagbedingungen überführt (18 h Licht pro Tag). Nach weiteren zwei Wochen wurden die Pflanzen alle drei Tage entweder mit oder ohne 150 mM NaCl über einen Zeitraum von zwei Wochen gewässert. Die Proben wurden nach sieben Wochen entnommen. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt, dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experimentes mit 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*=  $p < 0,01$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Unter Kontrollbedingungen kommt es im Wildtyp sowie in der Linie C1.2 zu einer Natriumakkumulation von 177,7  $\mu\text{g}$  pro Gramm Frischgewicht und 176,1  $\mu\text{g/g}$  FG. Dieser Gehalt an Natrium in den Pflanzen lässt sich dadurch erklären, dass die im Labor genutzte Einheitserde nicht vollständig frei von Salzen ist. Die beiden Linien C2.1 und C3.7 weisen mit 106,3  $\mu\text{g/g}$  FG und 102,9  $\mu\text{g/g}$  FG einen leicht reduzierten Natriumgehalt auf. Unter Salzstressbedingungen nimmt der Gehalt an Natrium in den Pflanzen extrem zu (Abbildung 3.5B). Der Wildtyp häuft hier 11,04 mg Natrium/g FG an. Im Gegensatz dazu kommt es während Salzstress in den drei Überexpressionslinien zu einer signifikanten Abnahme in der Natriumakkumulation mit 7,1 mg/g FG (C1.2), 7,9 mg/g FG (C2.1) und 8,3 mg/g FG (C3.7).

### 3.1.3 Bestimmung des Frischgewichts in steriler Flüssigkultur

Um die Auswirkungen von Salzstress auf die Produktion von Biomasse zu untersuchen, wurden der Wildtyp sowie die drei 35S:AtSOS1 C-terminus Linien in steriler Flüssigkultur angezogen. Nach sieben Tagen erfolgte ein Medienwechsel und die Pflanzen wurden für weitere 72 h in Medium mit oder ohne 100 mM NaCl kultiviert. Das Frischgewicht sowie der Natriumgehalt der zehn Tage alten Keimlinge sind in Abbildung 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.6: Frischgewicht und Natriumgehalt von Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen**

Je 100 Keimlinge wurden für sieben Tage in Flüssigkultur angezogen. Die Pflanzen wurden anschließend für weitere 72 h  $\pm$  100 mM NaCl angezogen. Nach der Ernte wurde das Frischgewicht unter Kontroll- (A) und Salzstressbedingungen (B) sowie die Natriumakkumulation (C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*=  $p < 0,01$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Unter Kontrollbedingungen besitzt der Wildtyp ein Frischgewicht von 1,53 g. Die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen C1.2, C2.1 und C3.7 weisen mit 1,49 g, 1,44 g und 1,3 g keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.6A). Unter Salzstressbedingungen häuft der Wildtyp nur noch ein Frischgewicht von 0,92 g an. Die Mutanten-Linie C3.7 besitzt ein leicht erhöhtes Frischgewicht von 0,95 g. Die beiden *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien C1.2 und C2.1 können unter diesen Bedingungen ein deutlich höheres Frischgewicht von 1,21 g und 1,44 g anhäufen. Sie zeigen lediglich einen geringen bzw. in der Linie C2.1 gar keinen Verlust im Frischgewicht im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 3.6B).

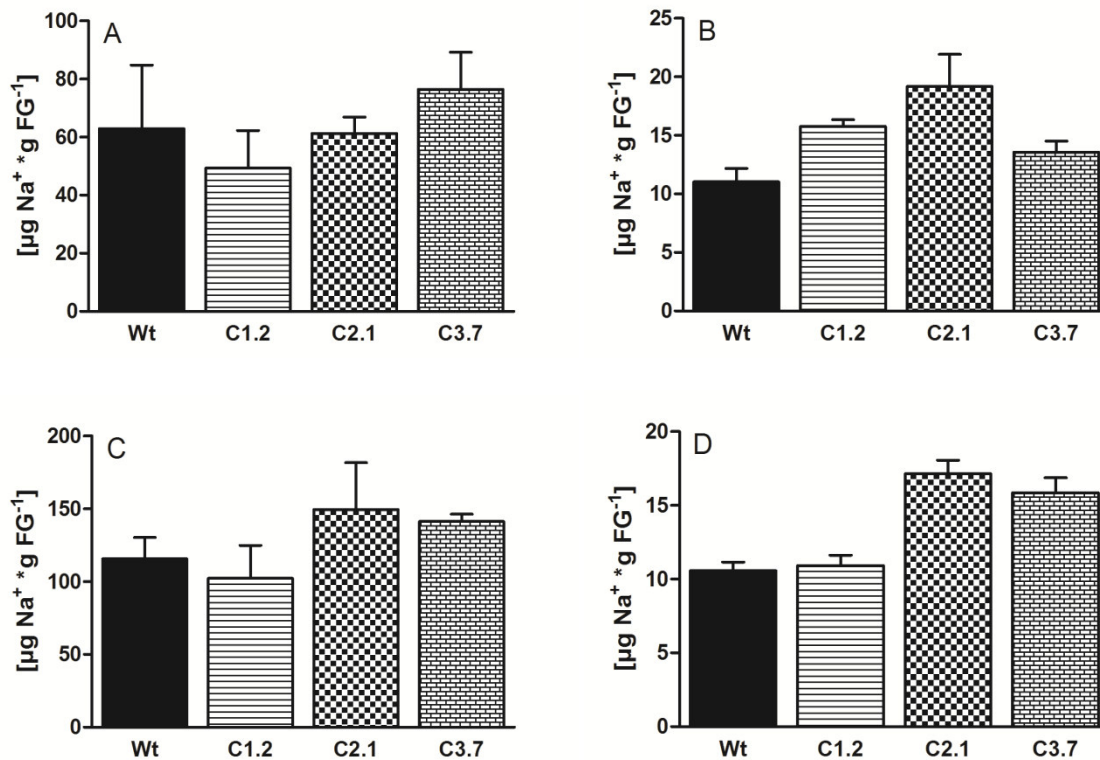
Auch für die Pflanzen, die in flüssiger Sterilkultur angezogen wurden, wurde die Natriumakkumulation bestimmt (Abbildung 3.6C). Unter Kontrollbedingungen besitzen die verschiedenen Linien mit 16,9  $\mu\text{g/g}$  FG (Wt), 26,6  $\mu\text{g/g}$  FG (C1.2), 23,6  $\mu\text{g/g}$  FG (C2.1) und

20,2 µg/g FG nur sehr wenig Natrium. Der geringe Gehalt an Natrium im Vergleich zur Anzucht auf Erde lässt sich dadurch erklären, dass flüssige Kontrollmedien präzise einzustellen sind und nur äußerst wenig Natrium in Form von Na<sub>2</sub>-EDTA enthalten. Nach einem 72-stündigen Salzstress von 100 mM NaCl akkumuliert der Wildtyp 1556,2 µg Natrium/g FG. Die Mutanten-Linien C1.2 und C3.7 weisen einen leicht reduzierten Gehalt an Natrium von 1376,5 µg/g FG und 1436,7 µg/g FG auf. Zu einer signifikanten Abnahme in der Natriumakkumulation kommt es in der Linie C2.1, diese zeigt einen Natriumgehalt von 1116 µg/g FG. Die geringste Natriumakkumulation in der Linie C2.1 stimmt hier überein mit dem niedrigsten Verlust an Biomasse auf 100 mM NaCl.

### **3.1.4 Charakterisierung der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen in hydroponischer Kultur**

#### **3.1.4.1 Natriumakkumulation unter Salzstress**

Bisher wurde gezeigt, dass die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien unter Salzstressbedingungen in der Lage sind mehr Biomasse anzuhäufen als der Wildtyp (Abbildung 3.6), dass ihr Blühzeitpunkt unter Salzstressbedingungen gegenüber dem Wildtyp früher eintritt (Abbildung 3.4) und dass sie unter Salzstress weniger Natrium in der Rosette akkumulieren als der Wildtyp (Abbildung 3.5). Um ein genaueres Verständnis von der Salztoleranz der Pflanzen und den an der Salzantwort beteiligten Vorgängen in der Pflanze zu erlangen, wurden die verwendeten Arabidopsis-Linien für drei Tage unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl ausgesetzt. Die Konzentrationen reichten von 0, 2,5 mM, 25 mM, 100 mM, 150 mM bis 200 mM NaCl. Weiterhin wurden die Pflanzen nun in hydroponischer Flüssigkultur angezogen, da es dieses System erlaubt neben der Rosette auch die Wurzel zu ernten und zu analysieren (Conn *et al.*, 2013). Da die Wurzel der Pflanze im Kontakt mit dem Boden steht und nahezu alle Nährstoffe in freier Natur zuerst über die Wurzel aufgenommen werden, um anschließend in der Pflanze verteilt zu werden, ist es von großem Interesse aufzuklären, welche Vorgänge in der Wurzel stattfinden.

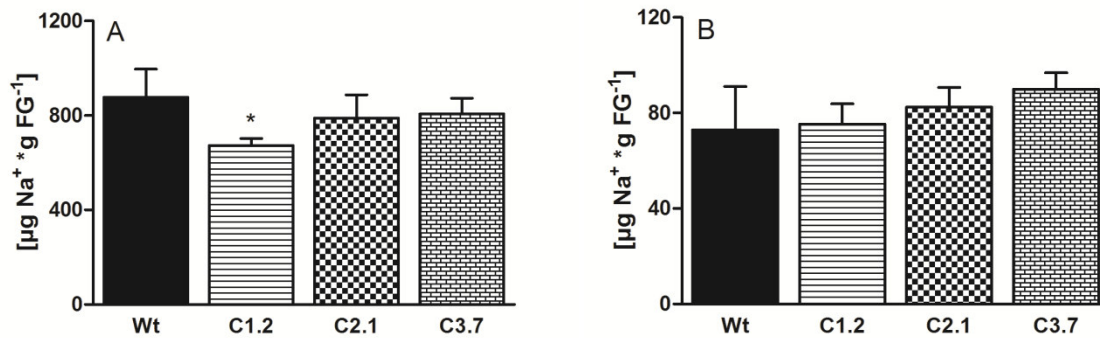


**Abbildung 3.7: Natriumgehalte von Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium und in 2,5 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden für 72 h mit einer Kontroll- (A,B) oder 2,5 mM NaCl-Lösung gewässert (C,D). Nach der Ernte wurde der Natriumgehalt in den Wurzeln (B,D) und im Spross (A,C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE.

Abbildung 3.7 zeigt die Aufnahme an Natrium nach Kontrollbedingungen bzw. nach einem Salzstress von 2,5 mM NaCl. Unter Kontrollbedingungen nimmt der Wildtyp 62,9  $\mu\text{g}$  Natrium/g FG auf. Mit einer Natriumaufnahme zwischen 49,3  $\mu\text{g/g}$  FG und 76,4  $\mu\text{g/g}$  FG weisen die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.7A). In der Wurzel ist die Natriumaufnahme mit Werten zwischen 11  $\mu\text{g/g}$  FG und 19,2  $\mu\text{g/g}$  FG deutlich geringer (Abbildung 3.7B). Diese Gehalte ändern sich auch nach einer Zugabe von 2,5 mM NaCl zum Wachstumsmedium nicht. Hier liegt der Natriumgehalt in den Wurzeln der Pflanzen zwischen 10,6  $\mu\text{g/g}$  FG und 17,1  $\mu\text{g/g}$  FG (Abbildung 3.7D). Im Gegensatz dazu bewirken die 2,5 mM NaCl im Spross eine Zunahme in der Natriumakkumulation. Der Wildtyp häuft hier 115,8  $\mu\text{g/g}$  FG an. Die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien weisen aber auch hier mit Werten zwischen 102,3  $\mu\text{g}$  und 149,6  $\mu\text{g/g}$  FG keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.7C).



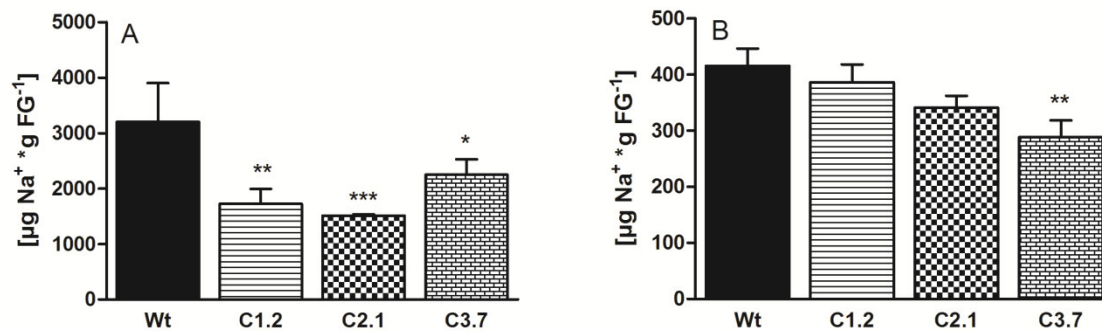


**Abbildung 3.8: Natriumgehalte von Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen bei Anzucht in 25 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 25 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Natriumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*= $p < 0,05$ ).

Setzt man den Wildtyp sowie die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien einem Salzstress von 25 mM über drei Tage aus, kommt es sowohl im Spross als auch in der Wurzel zu einer deutlichen Natriumakkumulation (Abbildung 3.8). Die Werte in der Wurzel schwanken zwischen 73  $\mu\text{g/g}$  FG im Wildtyp und 90  $\mu\text{g/g}$  FG in der Linie C3.7 und weisen keinen signifikanten Unterschied untereinander auf (Abbildung 3.8B). Im Spross häuft der Wildtyp 877,8  $\mu\text{g/g}$  FG Natrium an. Die Linien C2.1 und C3.7 zeigen mit 788  $\mu\text{g/g}$  FG und 806,7  $\mu\text{g/g}$  FG eine leichte Reduktion. Zu einer signifikant reduzierten Natriumaufnahme kommt es in der Linie C1.2 mit lediglich 673,4  $\mu\text{g/g}$  FG (Abbildung 3.8A).

Abbildung 3.9 zeigt die Natriumaufnahme in den unterschiedlichen Linien nach einem Salzstress von 100 mM für drei Tage. Auch hier ist eine deutliche Zunahme in der Natriumakkumulation im Vergleich zu 25 mM NaCl zu verzeichnen. Der Wildtyp hat im Spross einen Natriumgehalt von 3200,2  $\mu\text{g/g}$  FG. Im Gegensatz dazu häufen die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien mit 1721,8  $\mu\text{g/g}$  FG (C1.2), 1510,3  $\mu\text{g/g}$  FG (C2.1) und 2246,9  $\mu\text{g/g}$  FG (C3.7) signifikant weniger Natrium im Spross an (Abb. 3.9A). In der Wurzel kommt es zu einer Aufnahme von 415,5  $\mu\text{g}$  Natrium/g FG im Wildtyp. Die Linien C1.2 und C2.1 weisen einen leicht reduzierten Gehalt an Natrium von 386,6  $\mu\text{g/g}$  FG und 341  $\mu\text{g/g}$  FG auf. Zu einer signifikanten Reduktion im Natriumgehalt kommt es in der Linie C3.7 mit 288,3  $\mu\text{g/g}$  FG (Abbildung 3.9B).

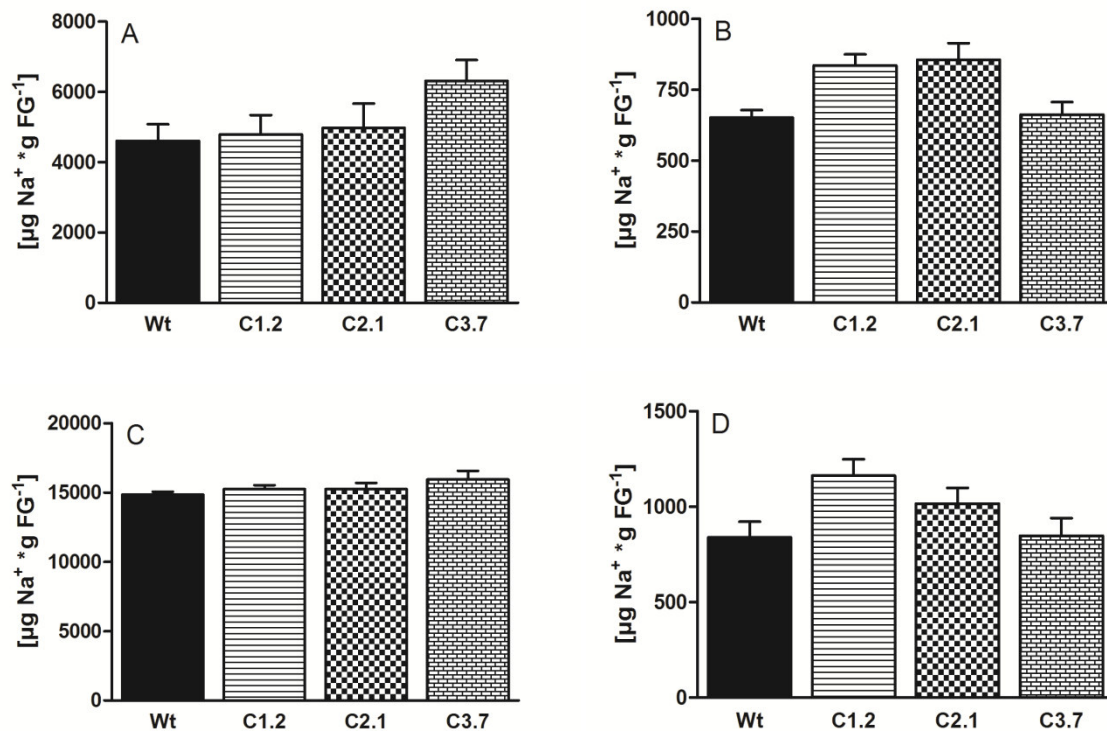


**Abbildung 3.9: Natriumgehalte von Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 100 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Natriumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*= $p < 0,01$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ ).

Setzt man den Wildtyp sowie die 35S:AtSOS1 C-terminus Überexpressionslinien einem noch höheren Salzstress von 150 mM und 200 mM in hydroponischer Flüssigkultur aus, geht der Effekt der geringeren Natriumakkumulation wieder verloren (Abbildung 3.10). Es ist festzustellen, dass 150 mM Salzstress nochmal zu einer generellen Zunahme im Natriumgehalt in Spross und Wurzel führen. Mit Werten zwischen 651,7  $\mu\text{g/g}$  FG und 856,3  $\mu\text{g/g}$  FG kommt es in der Wurzel lediglich zu geringfügigen Unterschieden im Natriumgehalt der verschiedenen Linien (Abbildung 3.10B). Im Spross häuft die Linie C3.7 mit 6317,3  $\mu\text{g/g}$  FG etwas mehr an als der Wildtyp (4612,4  $\mu\text{g/g}$  FG) und die beiden 35S:AtSOS1 C-terminus Überexpressionslinien C1.2 (4791,7  $\mu\text{g/g}$  FG) und C2.1 (4978,2  $\mu\text{g/g}$  FG; Abbildung 3.10A).

Nach einem Salzstress von 200 mM NaCl über drei Tage nehmen die unterschiedlichen Linien in der Wurzel mit Werten zwischen 839,3  $\mu\text{g/g}$  FG und 1163,4  $\mu\text{g/g}$  FG in etwa gleich viel Natrium auf (Abbildung 3.10D). Zu einer drastischen Akkumulation von Natrium kommt es im Spross. Sowohl der Wildtyp als auch die drei 35S:AtSOS1 C-terminus Überexpressionslinien nehmen mit ungefähr 15 mg/g FG ähnlich hohe Gehalte an Natrium auf (14849  $\mu\text{g/g}$  FG im Wildtyp, 15237  $\mu\text{g/g}$  FG in der Linie C1.2, 15247  $\mu\text{g/g}$  FG in der Linie C2.1 und 15940  $\mu\text{g/g}$  FG in der Linie C3.7; Abbildung 3.10C).

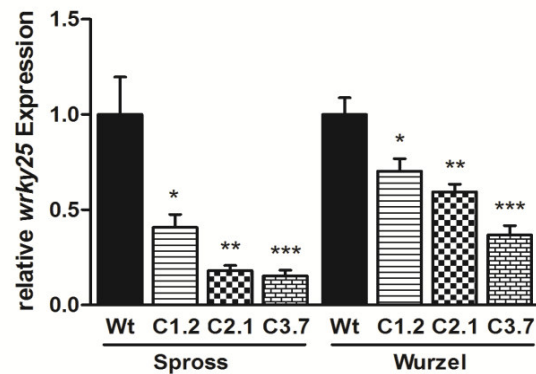


**Abbildung 3.10: Natriumgehalte von Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen bei Anzucht in 150 mM und 200 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 150 mM (A,B) bzw. einer 200 mM (C,D) NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Natriumgehalt in den Wurzeln (B,D) und im Spross (A,C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mindestens je 3 Replikaten  $\pm$  SE.

### 3.1.4.2 Transkriptgehalt des Salz-induzierten Gens *wrky25* unter Salzstress

Um das Stresslevel von Pflanzen während oder nach einer Stressexposition zu bestimmen, werden bestimmte Stress-induzierte Gene verwendet. Bei *wrky25* handelt es sich um ein Salzstress-induziertes Gen, d.h. seine Expression wird sehr spezifisch durch Salzstress erhöht (Nakashima *et al.*, 2000; Jiang & Deyholos, 2009). Das *wrky25*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor. WRKY25 ist ein Protein, welches durch Bindung an spezifische DNA-Elemente, wie z.B. Promotor-Elemente, die Transkription bestimmter Gene initiiert und aktiviert. Das relative Expressionslevel von Genen kann mithilfe einer qRT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, wobei gilt: ist die Pflanze gestresst, steigt der WRKY25-Transkriptgehalt an und zwar umso höher, umso mehr Stress die Pflanze erfährt.



**Abbildung 3.11: Relative Expression des Salz-induzierten Gens *wrky25***

Dargestellt sind Transkriptgehalte des Salz-induzierten Gens *wrky25* unter 100 mM Salzstressbedingungen in Wurzel und Spross. Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* normiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,001$ , \*=  $p < 0,05$ ).

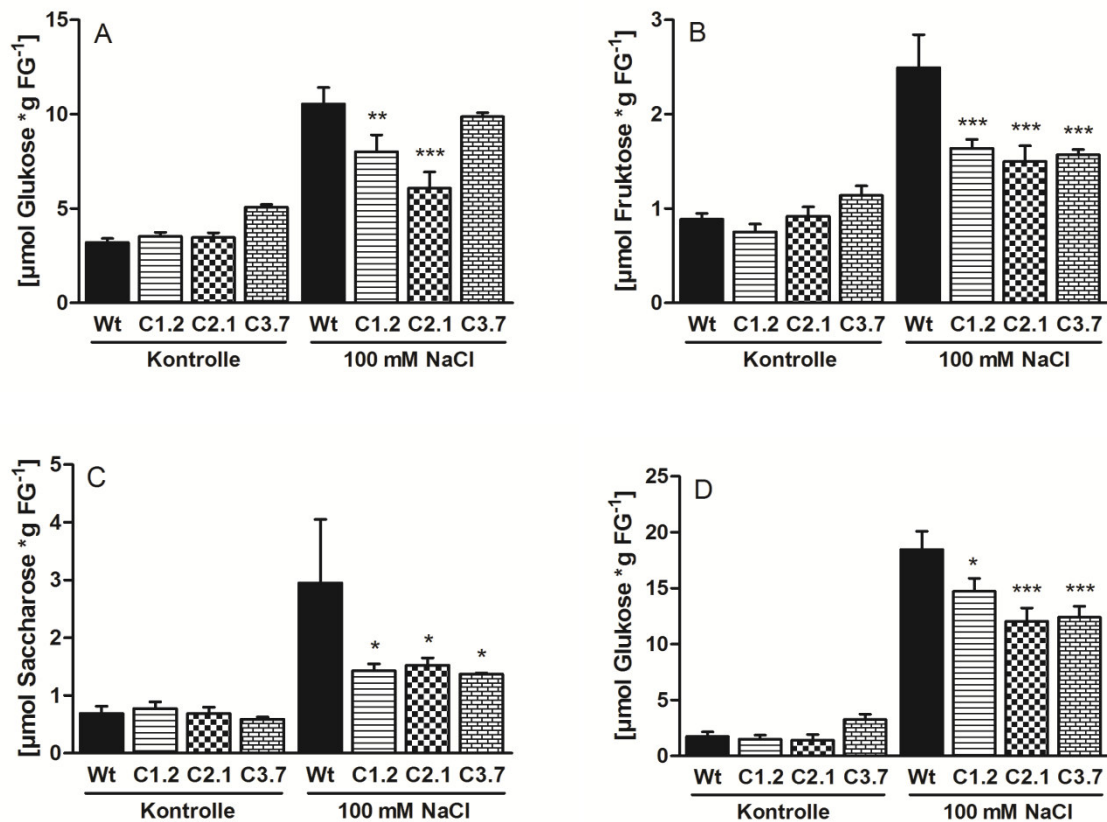
Aus Abbildung 3.11 geht deutlich hervor, dass die Transkriptgehalte des Salzstress-induzierten Gens *wrky25* in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien deutlich niedriger sind als im Wildtyp. Dies gilt sowohl für die Wurzel als auch für den Spross. Der Transkriptgehalt im Wildtyp ist jeweils auf den Wert 1 normiert. Im Vergleich dazu kommt es unter Salzstressbedingungen zu einer Reduktion der *WRKY25*-mRNA um bis zu 84,7% (C3.7) im Spross (59,2% in der Linie C1.2 und 81,9% in der Linie C2.1; Abbildung 3.11). In der Wurzel lassen sich unter Salzstressbedingungen bis zu 63,2% (C3.7) weniger *WRKY25*-mRNA nachweisen (29,7% weniger in der Linie C1.2 und 40,6% weniger in der Linie C2.1).

Es lässt sich erkennen, dass die Expression des Salzstress-Indikators *WRKY25* in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien deutlich niedriger ist als im Wildtyp. Dies deutet auf niedrigere intrazelluläre NaCl-Konzentrationen und ein geringeres Stressniveau der drei Überexpressionslinien unter Salzstressbedingungen hin.

### 3.1.4.3 Zuckerakkumulation unter Salzstress

Salzstress wirkt sich nicht nur negativ auf die Ionen-Homöostase der Pflanze aus, sondern hat auch Auswirkungen auf den Gehalt vieler weiterer Metabolite, wie z.B. auf eine Reihe von Mono-, Di- und Polysacchariden (Wang, Chang *et al.*, 2013; Chen & Hoehenwarter, 2015; Park *et al.*, 2016). Aus Abbildung 3.12 ist eine Salzstress-bedingte Akkumulierung von Glukose, Fruktose und Saccharose im Wildtyp sowie auch in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien ersichtlich. Der Glukosegehalt nimmt im Wildtyp um das 3,3-fache zu,

die Fruktose um das 2,8-fache und die Saccharose sogar um das 4,3-fache. In den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien kommt es im Gegensatz dazu zu einer deutlich geringeren Akkumulierung der löslichen Zucker. In der Linie C1.2 steigt der Glukosegehalt um das 2,3-fache an, der Fruktosegehalt um das 2,2-fache und der Saccharosegehalt um das 1,8-fache an. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die Linie C2.1. Hier kommt es zu einer 1,8-fachen Erhöhung im Glukosegehalt, einer 1,6-fachen Erhöhung im Fruktosegehalt und einer 2,21-fachen Erhöhung im Saccharosegehalt. Bis auf eine Ausnahme im Glukosegehalt weist auch die Linie C3.7 eine reduzierte Zuckerakkumulierung auf. Da der Glukosegehalt hier bereits in der Kontrolle höher ist als im Wildtyp nimmt der Glukosegehalt insgesamt nur um das 2-fache zu, der Fruktosegehalt um das 1,4-fache und der Saccharosegehalt um das 2,3-fache (Abbildung 3.12A-C).



**Abbildung 3.12: Zucker- und Stärkeakkumulation in Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen**

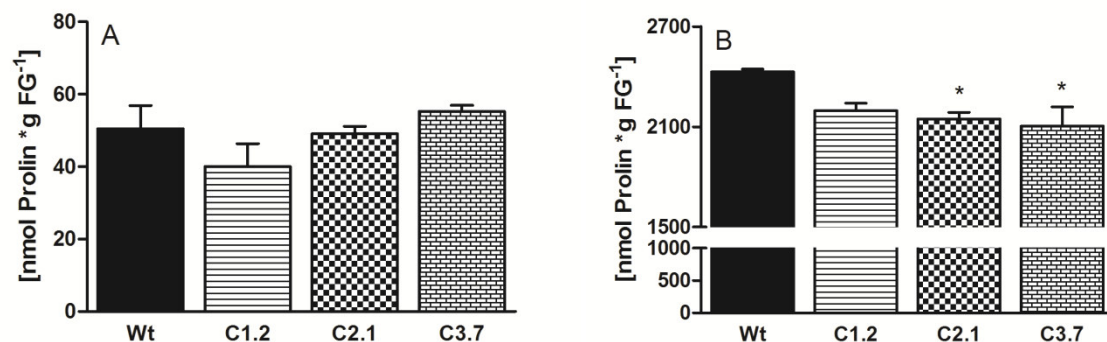
Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden für fünf Wochen in hydroponischer Kultur angezogen. 72 h vor der Ernte wurden die Pflanzen einer 100 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Gehalt an Glukose (A), Fruktose (B), Saccharose (C) und Stärke (D) im Spross bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,001$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Auch der Stärkegehalt nimmt in allen Linien nach Salzstress zu (Abbildung 3.12D). Beim Wildtyp kommt es zu einer 10,6-fachen Erhöhung der Stärkemenge. Eine Abnahme in der Stärkemenge im Vergleich zum Wildtyp tritt in allen drei Linien auf. Diese häufen lediglich das 9,8-fache (C1.2), das 8,6-fache (C2.1) bzw. das 3,8-fache (C3.7) an Stärke an.

Insgesamt betrachtet, kommt es in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien nach Salzstress zu einem geringeren Anstau löslicher Zucker und Stärke.

### 3.1.4.4 Prolinakkumulation unter Salzstress

Ein weiterer metabolischer Indikator von Stress ist die zelluläre Prolinkonzentration. Die Aminosäure Prolin ist ein wichtiger kompatibler „Solut“ und hilft als Osmolyt bei der Regulation und Neueinstellung der osmotischen Homöostase während Salz-, Trocken- oder osmotischem Stress (Munns & Tester, 2008; Ashraf & Foolad, 2007; Verbruggen & Hermans, 2008; Deinlein *et al.*, 2014).



**Abbildung 3.13: Prolinakkumulation in Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte mit (B) oder ohne (A) 100 mM NaCl gewässert. Nach der Ernte wurde die Prolinkonzentration im Spross bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*=  $p < 0,05$ ).

Unter Kontrollbedingungen lassen sich im Wildtyp und in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien ähnlich hohe Prolinkonzentrationen zwischen 40 nmol/g FG (C1.2) und 55,2 nmol/g FG (C3.7) im Spross nachweisen (50,5 nmol/g FG im Wt, 49,1 nmol/g FG in der Linie C2.1; Abbildung 3.13A). Salzstress führt nun zu einer extremen Zunahme der Prolinkonzentration im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 3.13B). Der Wildtyp häuft unter Salzstressbedingungen 2429,5 nmol Prolin/g FG im Spross an. In der Linie C1.2

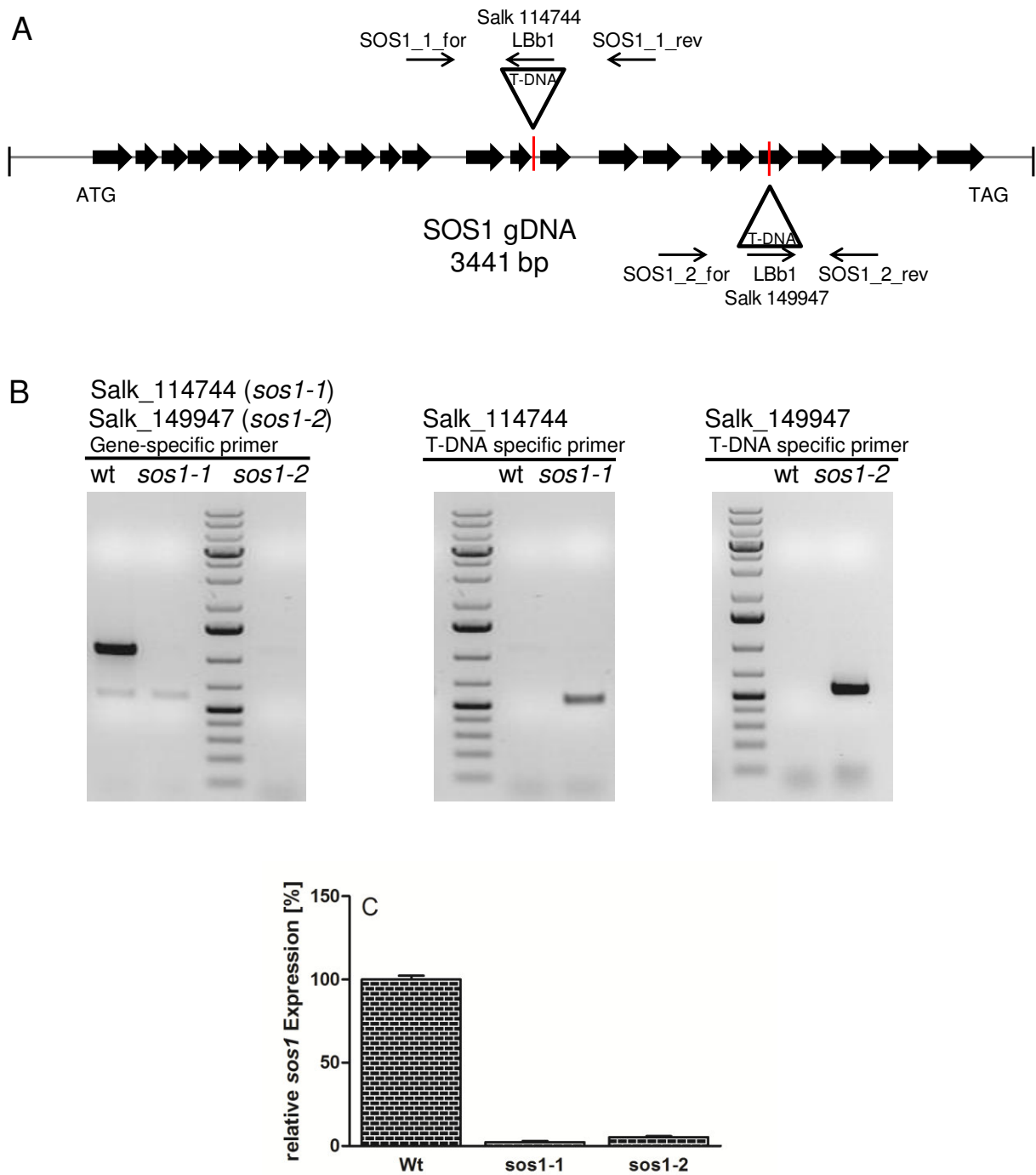
kommt es mit 2197 nmol/g FG zu einer geringfügigen Reduktion in der Prolinsynthese. Signifikant weniger Prolin synthetisieren die beiden Linien C2.1 und C3.7 mit 2146,3 nmol/g FG und 2103,9 nmol/g FG im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.13B).

### 3.2 Analyse von *sos1* Knockout-Pflanzen

Nachdem Pflanzen untersucht wurden, die einen erhöhten *AtSOS1 C-terminus* (AS446-1146) Transkriptgehalt aufweisen, wurden ebenfalls *sos1* Knockout-Pflanzen analysiert. Diese Pflanzen besitzen eine lange T-DNA-Insertion im Bereich des Gens von Interesse, welche die Expression des Ziel-Gens verhindert. Die Untersuchung dieser Knockout-Pflanzen stellt eine weitere wichtige Methode dar, um die physiologische Bedeutung eines Proteins für den Stoffwechsel zu analysieren. Mittels PCR-Analyse mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primern können die Mutanten auf die Integration der T-DNA untersucht werden. Als Template dient genomische DNA sowohl aus Wildtyp als auch aus den vermutlichen Knockout-Pflanzen. Der Einsatz von T-DNA-spezifischen Primern führt bei Wt gDNA zu keinem Produkt, jedoch bei gDNA aus Knockout-Pflanzen. Ergeben beide Primer-Kombinationen ein PCR-Produkt handelt es sich um gDNA von einer heterozygoten Pflanze.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unabhängige *sos1* Knockout-Linien vom Nottingham Stock Center (NASC) bezogen und auf das Vorhandensein einer T-DNA-Insertion untersucht. Es handelt sich hierbei um die Linien Salk\_114744, im Weiteren als *sos1-1* bezeichnet, und Salk\_149947, im Weiteren als *sos1-2* bezeichnet. Die Lokalisierung der T-DNA-Insertionen im Gen ist in Abbildung 3.14A schematisch dargestellt.

### 3.2.1 Identifizierung von *sos1* Knockout-Pflanzen



**Abbildung 3.14: Identifizierung von *sos1* Knockout-Mutanten**

(A) Schematische Übersicht der T-DNA-Insertionsstellen und der zum Screening verwendeten Primer.

(B) PCR-Analyse zur Identifizierung der T-DNA-Insertionen im *sos1*-Gen der Linien SALK\_114744 (*sos1-1*) und SALK\_149947 (*sos1-2*). Als Template diente genomische DNA. Als Größenstandard wurde GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) verwendet.

(C) Relativer *sos1* Transkriptgehalt der *sos1-1* und *sos1-2* Mutanten. Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *ef1a* normiert und sind Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten  $\pm$  SE.



Nachdem die gDNA aus den verschiedenen Pflanzenlinien isoliert wurde, wurde diese als Template für die PCR-Analyse verwendet. Dazu wurden entweder gen- oder T-DNA-spezifische Primer-Kombinationen verwendet. Die Bindestellen der generierten Primer sind in Abbildung 3.14A schematisch dargestellt. Die Verwendung genspezifischer Primer führt nur in Wildtyp gDNA zu einem PCR-Produkt, nicht aber in den *sos1* Knockout-Linien (Abbildung 3.14B). Die PCR mit T-DNA-spezifischen Primern liefert auf Wt gDNA kein Produkt. Auf gDNA der beiden *sos1* Knockout-Linien führt die Verwendung T-DNA-spezifischer Primer zu einem PCR-Produkt. Die Insertion einer T-DNA ist somit nachgewiesen. Es handelt sich bei den beiden Linien *sos1-1* und *sos1-2* um homozygote Knockout-Pflanzenlinien (Abbildung 3.14B).

Anschließend wurde überprüft, ob das Vorhandensein der T-DNA-Insertion zum Verlust der korrespondierenden mRNA führt. Dazu wurde aus den entsprechenden Pflanzen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde der *SOS1*-Transkriptgehalt ermittelt (Abbildung 3.14C). In beiden homozygoten Knockout-Linien ist der *SOS1*-Transkriptgehalt extrem verringert, sodass man hier davon ausgehen kann, dass kein *SOS1*-Transkript mehr vorhanden ist. Die Insertion der T-DNA in das Gen hat zum Verlust der korrespondierenden mRNA geführt. Das Gen wird somit nicht mehr in mRNA umgeschrieben.

### 3.2.2 Anzucht auf Erde und Untersuchungen zur pflanzlichen Entwicklung

Um zu untersuchen, inwieweit sich der Verlust der *sos1* mRNA auf die pflanzliche Entwicklung auswirkt, wurden der Wildtyp sowie die beiden *sos1* Knockout-Linien unter Kontroll- bzw. unter Langzeit-Salzstressbedingungen auf Erde angezogen. Dazu wurden die Pflanzen nach drei Wochen von Kurztag- auf Langtagbedingungen (18 h Licht pro Tag) umgesetzt und über einen Zeitraum von zwei Wochen mit oder ohne 150 mM NaCl gegossen. Abbildung 3.15 zeigt den Wildtyp sowie die zwei unabhängigen *sos1* Knockout-Linien unter Kontroll- (A) und unter Salzstressbedingungen (B).



**Abbildung 3.15: Wildtyp und *sos1* Knockout-Pflanzen unter Kontroll- und Salzstressbedingungen sowie Analyse des *FT* Transkripts unter Salzstressbedingungen**

Zu sehen sind Wildtyp- sowie die *sos1* Knockout-Pflanzen unter Kontroll- (A) und Salzstressbedingungen (B). Die Pflanzen wurden nach dreiwöchiger Anzucht unter ambienten Bedingungen in eine Kammer mit Langtagbedingungen überführt (18 h Licht pro Tag). Nach weiteren zwei Wochen wurden die Pflanzen alle drei Tage entweder mit oder ohne 150 mM NaCl über einen Zeitraum von zwei Wochen gewässert. Die Bilder wurden nach sieben Wochen aufgenommen. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt, die Bilder zeigen repräsentative Individuen.

(A) von links nach rechts: Wt, *sos1-2* und *sos1-1*; Kontrollbedingungen

(B) von links nach rechts: Wt, *sos1-2* und *sos1-1*; Salzstressbedingungen

(C) Relativer *FT* Transkriptgehalt unter Salzstressbedingungen. Dargestellt sind qRT-PCR-Analysen von Blattmaterial von Wt und *sos1* Knockout-Linien. Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* (At1g13320) normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*= $p < 0,05$ ).

Unter Kontrollbedingungen zeigt sich kein Unterschied im Wachstum der drei Linien. Zum Zeitpunkt der Aufnahme befinden sich sowohl der Wildtyp als auch die zwei *sos1* Knockout-Linien mitten in der Blütenbildung (Abbildung 3.15A). Vorausgehende Studien an anderen, unabhängigen *sos1* Knockout-Linien bestätigen, dass der Verlust des *SOS1*-Transkripts unter Kontrollbedingungen zu keinem sichtbaren Phänotyp führt (Wu *et al.*, 1996). Unter Salzstressbedingungen zeigt sich dagegen ein deutlicher Unterschied im Wachstum (Abbildung 3.15B). Der Wildtyp weist im Gegensatz zur Kontrolle ein deutlich reduziertes Wachstum auf, die Blätter sind deutlich kleiner und insgesamt wirken die Blätter chlorotisch. Das Sprosswachstum ist deutlich verkürzt, Blütenbildung hat jedoch stattgefunden. Bei den zwei *sos1* Knockout-Linien zeigt sich nach zweiwöchigem Salzstress kaum bis gar kein Sprosswachstum. Vor allem die Linie *sos1-2* weist weder Sprosswachstum noch Blütenbildung auf. Die Blätter sind komplett violett angefärbt, was auf eine extrem hohe Produktion von Anthocyanen hinweist. Die Akkumulation von Anthocyanen ist ein Indiz von Stress und ihre Synthese wird als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren wie osmotischen Stress, hohe Temperaturen, Starklicht oder Salz ausgelöst (Dixon & Paiva, 1995; Lotkowska *et al.*, 2015). Reproduktives Wachstum ist hier nicht mehr zu erwarten. Auch das vegetative Wachstum ist extrem eingeschränkt, die Rosettenblätter sind deutlich kleiner im Vergleich zum Wildtyp. Die Blätter der Linie *sos1-1* sind nicht so stark violett gefärbt wie die der Linie *sos1-2*, was auf eine geringere Anthocyanbildung hindeutet. Sprosswachstum ist vorhanden, aber im Vergleich zum Wildtyp deutlich eingeschränkt. Eine Blütenbildung hat stattgefunden. Insgesamt ist das Blattwachstum unter Salzstressbedingungen in den beiden *sos1* Knockout-Linien im Vergleich zum Wildtyp extrem verringert.

Die auftretenden Unterschiede in der Blütenbildung können auch durch Analyse von Genen bestätigt werden, die an der Regulation dieses komplexen Vorgangs beteiligt sind. Die Untersuchung der Expression des Gens *flowering locus T (ft)* zeigt, dass die zwei *sos1* Knockout-Linien eine deutlich reduzierte Menge des *FT* Transkripts besitzen (Abbildung 3.15C). So weist die Linie *sos1-1* eine Abnahme um 82,3% und die Linie *sos1-2* um 90,3% im Vergleich zum Wildtyp auf.

### **3.2.3 Charakterisierung der *sos1* Knockout-Pflanzen in hydroponischer Flüssigkultur**

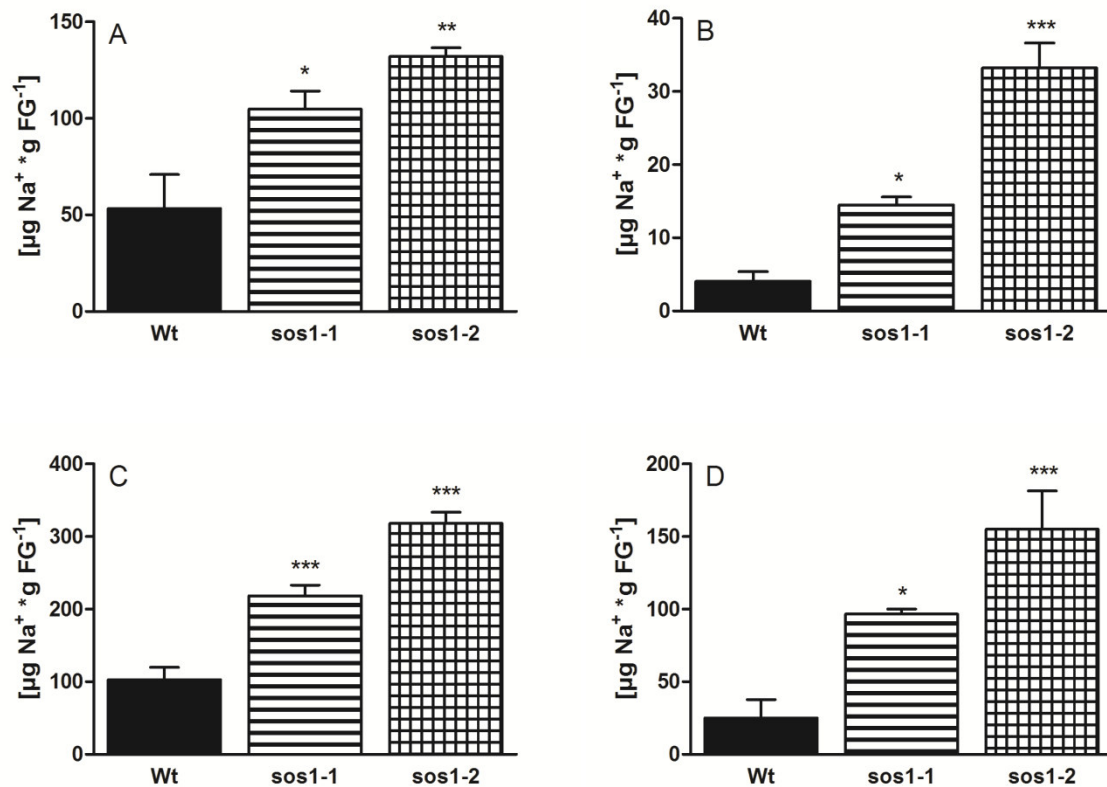
Nachdem gezeigt wurde, dass die *sos1* Knockout-Linien unter Salzstressbedingungen kaum noch in der Lage sind Biomasse anzuhäufen bzw. reproduktives Wachstum aufzuweisen, wurde die Natriumakkumulation der Knockout-Linien im Vergleich zum Wildtyp in

hydroponischer Flüssigkultur analysiert. Dazu wurden die verschiedenen Arabidopsis-Linien einer Konzentrationsreihe an NaCl für drei Tage ausgesetzt. Die Konzentrationen reichten von 0, 2,5 mM, 25 mM bis 100 mM NaCl. Die Anzucht in hydroponischer Flüssigkultur erlaubt es neben der Rosette auch die Wurzel zu ernten und zu analysieren (Conn *et al.*, 2013).

### 3.2.3.1 Natriumakkumulation unter Salzstress

Abbildung 3.16 zeigt die Aufnahme an Natrium unter Kontrollbedingungen bzw. nach einem Salzstress von 2,5 mM NaCl in Spross und Wurzel. Im Wildtyp beträgt die Natriumkonzentration im Spross unter Kontrollbedingungen 53,3 µg/g FG. Mit einer Natriumaufnahme zwischen 104,8 µg/g FG und 132 µg/g FG weisen die *sos1* Knockout-Linien bereits unter Kontrollbedingungen einen signifikanten Anstieg in der Natriumakkumulation im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.16A). In der Wurzel ist die Natriumaufnahme mit 4 µg/g FG im Wt deutlich geringer als im Spross (Abbildung 3.16B). Auch hier akkumulieren die *sos1* Knockout-Linien mit 14,5 µg/g FG und 33,2 µg/g FG mehr Natrium als der Wildtyp.

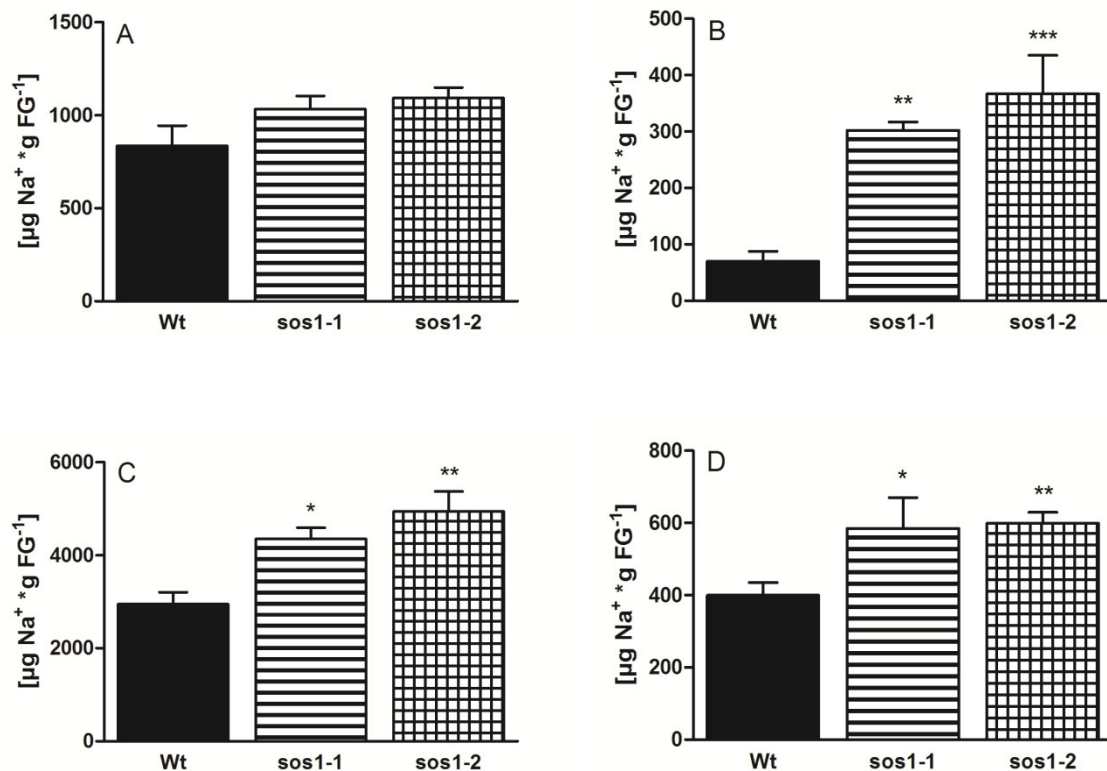
Generell weisen alle drei Linien unter Salzstressbedingungen mehr Natrium im Spross und in der Wurzel auf als unter Kontrollbedingungen. Nach einer Zugabe von 2,5 mM NaCl zum Wachstumsmedium akkumuliert der Wildtyp in den Wurzeln der Pflanzen mit 25,1 µg/g FG deutlich weniger Natrium als die beiden *sos1* Knockout-Linien, die unter diesen Bedingungen bereits 96,5 µg/g FG und 155 µg/g FG anhäufen (Abbildung 3.16D). Im Spross bewirken die 2,5 mM NaCl eine Verdopplung des Natriumgehalts im Wildtyp auf 103 µg/g FG im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 3.16C). Die *sos1* Knockout-Linien weisen auch hier mit Werten von 218,6 µg/g FG und 318,1 µg/g FG einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf.



**Abbildung 3.16: Natriumgehalte von Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium und in 2,5 mM NaCl-Medium**

Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen wurden für fünf Wochen in hydroponischer Kultur angezogen. 72 h vor der Ernte wurden sie mit (C,D) oder ohne (A,B) 2,5 mM NaCl gewässert. Nach der Ernte wurden die Natriumgehalte von Wurzel (B,D) und Spross (A,C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mindestens je 5 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Setzt man den Wildtyp sowie die *sos1* Knockout-Linien einem Salzstress von 25 mM über drei Tage aus, kommt es sowohl im Spross als auch in der Wurzel zu einer deutlichen Natriumakkumulation (Abbildung 3.17A,B). Die Wildtyp-Pflanzen weisen in der Wurzel einen Natriumgehalt von 69,7  $\mu\text{g/g}$  FG auf, im Spross 835,8  $\mu\text{g/g}$  FG. Die Knockout-Linien *sos1-1* und *sos1-2* weisen mit 1033,5  $\mu\text{g/g}$  FG und 1092,7  $\mu\text{g/g}$  FG Natrium im Spross keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.17A). In der Wurzel häufen sie mit Natriumgehalten von 302,3  $\mu\text{g/g}$  FG und 367  $\mu\text{g/g}$  FG allerdings mehr als das Drei- bzw. Vierfache an Natrium an als der Wildtyp (Abbildung 3.17B).



**Abbildung 3.17: Natriumgehalte von Wildtyp- und *sosI* Knockout-Pflanzen bei Anzucht in 25 mM und 100 mM NaCl-Medium**

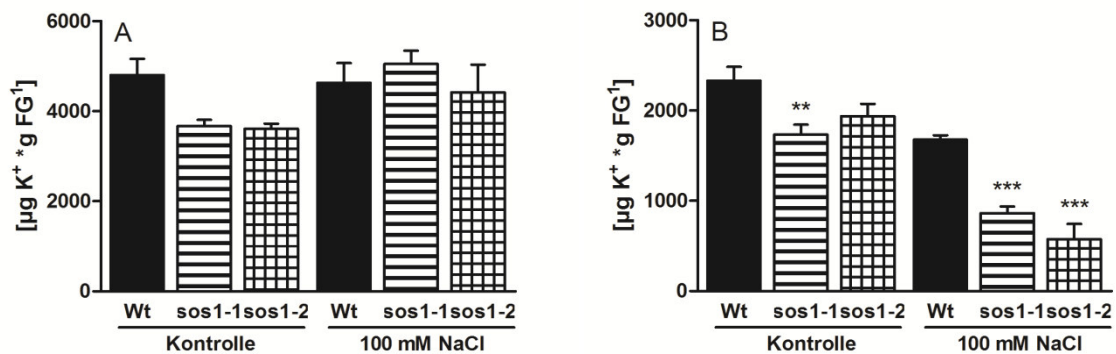
Fünf Wochen alte Wildtyp- und *sosI* Knockout-Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 25 mM (A,B) bzw. einer 100 mM NaCl-Lösung (C,D) ausgesetzt. Nach der Ernte wurden die Natriumgehalte von Wurzel (B,D) und Spross (A,C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mindestens je 5 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Eine deutliche Zunahme in der Natriumaufnahme zeigt sich auch nach einem Salzstress von 100 mM NaCl. Der Wildtyp akkumuliert unter diesen Bedingungen 2947,2  $\mu\text{g}$  Natrium/g FG im Spross (Abbildung 3.17C) Im Gegensatz dazu weisen die *sosI* Knockout-Linien mit 4353,1  $\mu\text{g/g}$  FG und 4943,3  $\mu\text{g/g}$  FG einen signifikant höheren Natriumgehalt im Spross auf als der Wildtyp. Auch in der Wurzel nehmen die beiden Linien *sos1-1* und *sos1-2* mit 585,1  $\mu\text{g/g}$  FG und 599,3  $\mu\text{g/g}$  FG signifikant mehr Natrium auf als der Wildtyp mit 399,4  $\mu\text{g/g}$  FG (Abbildung 3.17D).

### 3.2.3.2 Kaliumgehalt unter Salzstress

Im Gegensatz zu Natrium ist Kalium ein essentieller Makronutrient (Niu *et al.*, 1995; Wang, Zheng *et al.*, 2013). Aufgrund ihrer ähnlichen physikalisch-chemischen Merkmale kann Natrium in gewissen Aspekten die Funktion von Kalium übernehmen, z.B. als Osmolyt bei

der Einstellung des osmotischen Gleichgewichts zwischen Zelle und Extrazellulärraum oder zwischen Zytosol und Vakuole (Adams & Shin, 2014). Liegt Natrium im Überschuss vor, verdrängt es Kalium allerdings von den Bindestellen wichtiger Enzyme und schränkt den Kaliumeinstrom durch Konkurrenz um die Bindestellen der Transportproteine ein (Blumwald *et al.*, 2000).



**Abbildung 3.18: Kaliumgehalte von Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte mit oder ohne 100 mM NaCl gewässert. Nach der Ernte wurden die Kaliumgehalte von Wurzel (B) und Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mindestens je 5 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ ).

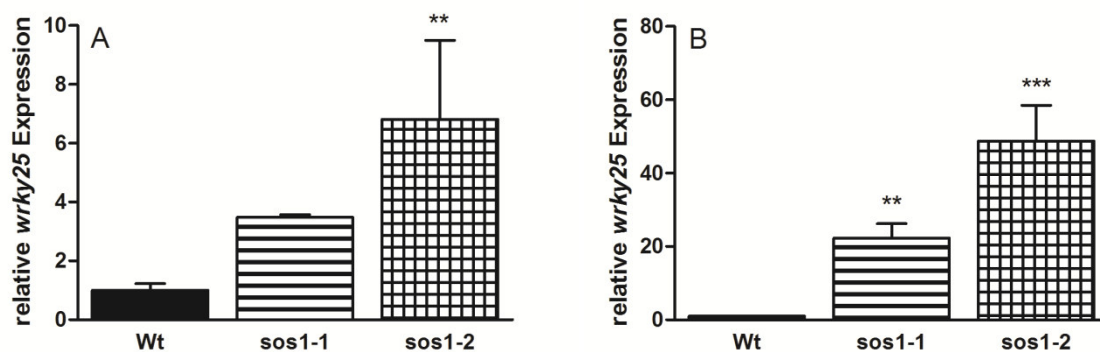
Abbildung 3.18 zeigt den Gehalt an Kalium unter Kontrollbedingungen bzw. nach einem Salzstress von 100 mM NaCl. Der Wildtyp besitzt unter Kontrollbedingungen 4804,7  $\mu\text{g}$  Kalium/g FG im Spross. Mit einem Kaliumgehalt von 3666,2  $\mu\text{g/g}$  FG und 3605,3  $\mu\text{g/g}$  FG weisen die *sos1* Knockout-Linien unter Kontrollbedingungen eine leichte Reduktion im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.18A). In der Wurzel ist die Kaliumkonzentration mit 2331  $\mu\text{g/g}$  FG (Wt) deutlich geringer als im Spross (Abbildung 3.18B). Auch hier zeigen die *sos1* Knockout-Linien mit 1734,1  $\mu\text{g/g}$  FG und 1936,8  $\mu\text{g/g}$  FG einen reduzierten Gehalt im Vergleich zum Wildtyp. In der *sos1-1* Linie ist diese Reduktion sogar signifikant.

Nach einer Zugabe von 100 mM NaCl zum Wachstumsmedium weist der Wildtyp im Spross mit 4633,3  $\mu\text{g/g}$  FG eine ähnlich hohe Kaliumkonzentration auf wie die beiden *sos1* Knockout-Linien, die unter diesen Bedingungen Kaliumgehalte von 5048,1  $\mu\text{g/g}$  FG und 4419,5  $\mu\text{g/g}$  FG besitzen (Abbildung 3.18A). In der Wurzel bewirken die 100 mM NaCl eine deutliche Abnahme des Kaliumgehalts. Der Wildtyp weist hier eine Kaliumkonzentration von 1676,5  $\mu\text{g/g}$  FG (Abb. 3.18B) auf. Die *sos1* Knockout-Linien zeigen mit Werten von

862,6  $\mu\text{g/g}$  FG und 576,9  $\mu\text{g/g}$  FG einen signifikant reduzierten Kaliumgehalt im Vergleich zum Wildtyp.

### 3.2.3.3 Transkriptgehalt des Salz-induzierten Gens *wrky25*

Aus Abbildung 3.19 geht deutlich hervor, dass der Transkriptgehalt des Salzstress-induzierten Gens *wrky25* unter Salzstressbedingungen in den *sos1* Knockout-Pflanzen höher ist als im Wildtyp. Dies gilt sowohl für die Wurzel als auch für den Spross. Der Transkriptgehalt im Wildtyp ist jeweils auf den Wert 1 normiert. Im Vergleich dazu ist die Konzentration der *WRKY25*-mRNA im Spross 3,5-fach (*sos1-1*) und 6,8-fach (*sos1-2*) höher als im Wildtyp (Abbildung 3.19A). In der Wurzel findet eine noch extremere Induktion der *wrky25* Expression statt. Hier kommt es zu einer 22,3-fachen Zunahme der *WRKY25*-mRNA in der Linie *sos1-1* und sogar zu einer 48,8-fachen Zunahme in der Linie *sos1-2* (Abbildung 3.19B).



**Abbildung 3.19: Relative Expression des Salz-induzierten Gens *wrky25***

Dargestellt ist der Transkriptgehalt des Salz-induzierten Gens *wrky25* unter Salzstressbedingungen in Wurzel (B) und Spross (A). Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*=  $p < 0,01$ , \*\*\*=  $p < 0,001$ ).

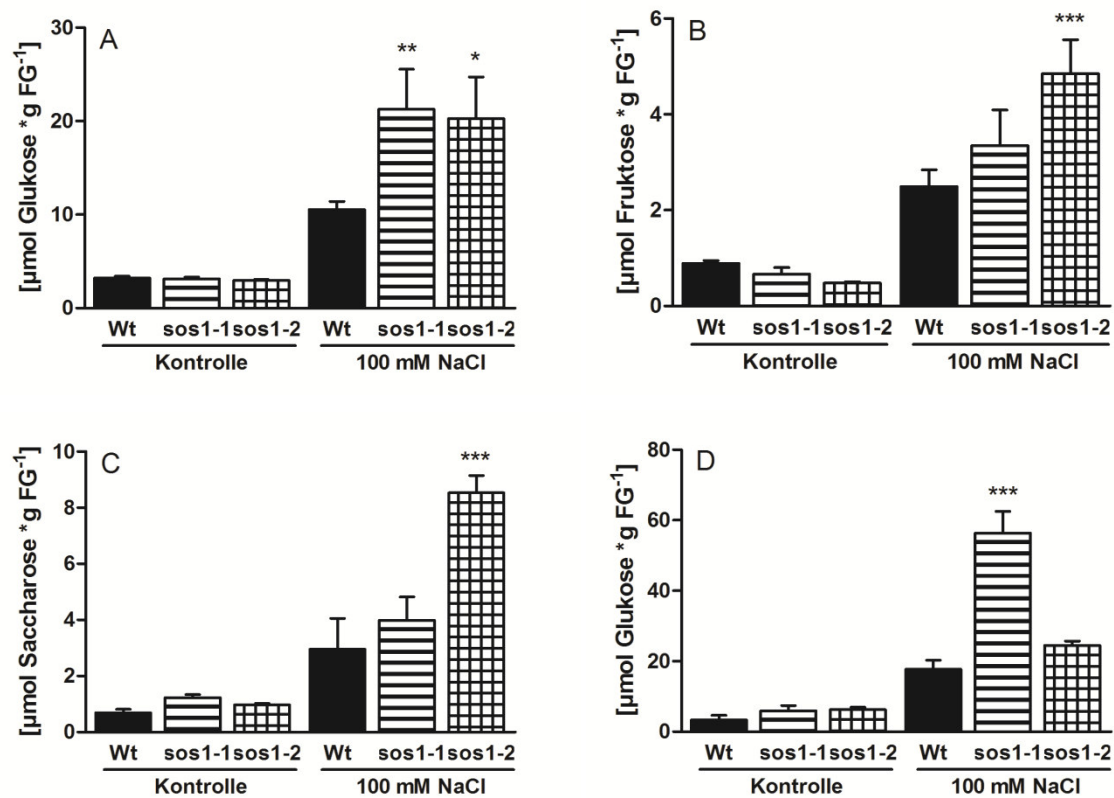
Diese enorme Akkumulation des *WRKY25*-Transkripts deutet daraufhin, dass die Zugabe von 100 mM NaCl in den *sos1* Mutanten zu einem erhöhten Stress führt, weil diese mehr zytosolisches Natrium akkumulieren.

### 3.2.3.4 Zuckerakkumulation unter Salzstress

Wie bereits im Abschnitt 3.1.4.3 erwähnt, wirkt sich Salzstress nicht nur schädigend auf die Ionen-Homöostase der Pflanze aus, sondern hat auch Auswirkungen auf den Gehalt weiterer



Metabolite, wie z.B. Mono-, Di- und Polysacchariden (Wang, Chang *et al.*, 2013; Chen & Hoehenwarter, 2015). So resultiert Salzstress generell in einem Anstau von löslichen Zuckern und Stärke in der Zelle (Hill *et al.*, 2012).



**Abbildung 3.20: Zucker- und Stärkeakkumulation in Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *sos1* Knockout-Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte mit oder ohne 100 mM NaCl gewässert. Nach der Ernte wurden die Gehalte an Glukose (A), Fruktose (B), Saccharose (C) und Stärke (D) im Spross bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mindestens je 5 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ , \*=  $p < 0,05$ ).

Aus Abbildung 3.20A-C ist eine stressbedingte Akkumulierung von Glukose, Fruktose und Saccharose im Wildtyp sowie auch in den *sos1* Knockout-Linien ersichtlich. Der Glukosegehalt nimmt im Wildtyp um das 3,3-fache zu, die Fruktose um das 2,8-fache und die Saccharose sogar um das 4,3-fache. In den *sos1* Knockout-Linien kommt es im Gegensatz dazu zu einer deutlich höheren Akkumulierung der löslichen Zucker. In der Linie *sos1-1* steigt der Glukosegehalt um das 6,8-fache an, der Fruktosegehalt um das 5,1-fache und der Saccharosegehalt um das 3,2-fache an (Abbildung 3.20). Die Linie *sos1-2* akkumuliert sogar noch mehr Zucker. Hier kommt es zu einer 6,9-fachen Erhöhung im Glukosegehalt, einer

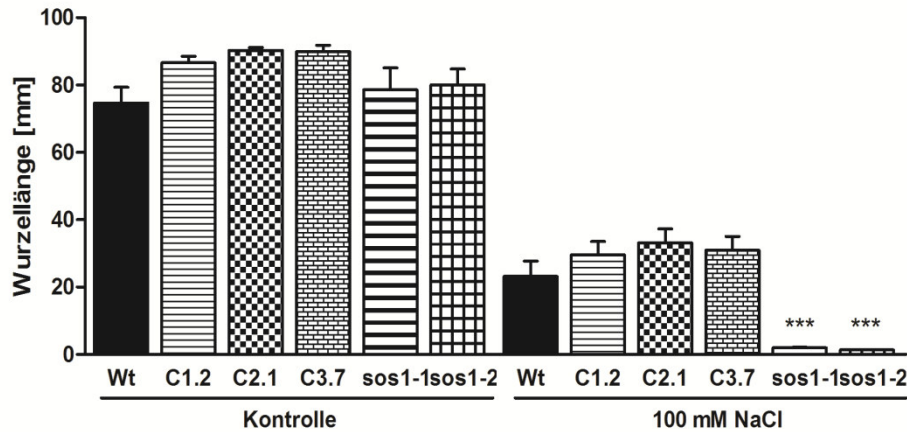
10,1-fachen Erhöhung im Fruktosegehalt und einer 8,8-fachen Erhöhung im Saccharosegehalt.

Auch der Stärkegehalt nimmt in allen Linien nach Salzstress zu (Abbildung 3.20D). Beim Wildtyp kommt es zu einer 5,3-fachen Erhöhung der Stärkekonzentration. In der Linie *sos1-2* steigt der Stärkegehalt um das 4-Fache an. Eine enorme Erhöhung des Stärkespeichers tritt in der Linie *sos1-1* auf. Diese häuft das 9,5-Fache an Stärke und somit das 3,2-Fache im Vergleich zum Wildtyp an.

Insgesamt betrachtet, kommt es in den *sos1* Knockout-Pflanzen nach Salzstress zu einem höheren Anstau löslicher Zucker und Stärke.

### **3.2.4 Wurzelwachstum auf 100 mM NaCl**

Die Analyse des Wachstumsverhaltens der *sos1* Knockout-Mutanten auf Salz hat gezeigt, dass diese sensitiver auf Salzstress reagieren als der Wildtyp. Vor allem im Wurzelgewebe zeigen diese Mutanten deutliche Anzeichen von Stress, was die erhöhte Expression des Salz-induzierten Transkriptionsfaktors *WRKY25* (Abbildung 3.19B), sowie die niedrige Konzentration an Kalium (Abbildung 3.18B) und die hohen Natriumkonzentrationen beweisen (Abbildung 3.16 und 3.17B,D). Um zu überprüfen inwieweit sich diese Stress-Faktoren auf das Wurzellängenwachstum auswirken, wurden Wildtyp-, sowie *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressions- und *sos1* Knockout-Pflanzen auf Schrägagarplatten angezogen. Nach fünftägigem Wachstum auf Kontrollmedium, wurden die Keimlinge auf Platten mit oder ohne 100 mM NaCl umgesetzt und für weitere zehn Tage kultiviert (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Wurzellänge von Wildtyp-, *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressions- und *sos1* Knockout-Pflanzen**

Dargestellt ist das Wurzellängenwachstum der verschiedenen Linien auf Schrägagarplatten. Die Samen wurden zunächst fünf Tage auf Kontrollmedium angezogen und danach auf Kontroll- bzw. 100 mM NaCl-Platten umgesetzt und für weitere zehn Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 8 biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

Unter Kontrollbedingungen liegt die Wurzellänge der verschiedenen Linien zwischen einem Wert von 74,7 mm (Wt) und 90,3 mm (C2.1; Abbildung 3.21). Die Zugabe von 100 mM NaCl ins Wachstumsmedium führt zu einer extremen Verkürzung des Wurzelwachstums. Der Wildtyp besitzt unter diesen Bedingungen lediglich noch eine Wurzellänge von 23,2 mm. Die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien bilden noch eine Wurzellänge zwischen 29,5 mm (C1.2) und 33,2 mm (C2.1) aus. Im Gegensatz dazu sind die *sos1* Knockout-Pflanzen nicht mehr in der Lage Wurzelwachstum aufzubauen. Sie zeigen ein stark reduziertes Wurzellängenwachstum im Vergleich zu den anderen Linien. Die Linie *sos1-1* besitzt eine Wurzel von gerade einmal 1,9 mm und die Linie *sos1-2* sogar nur 1,4 mm.

### 3.3 Interaktionsstudien zum *AtSOS1 C-terminus*

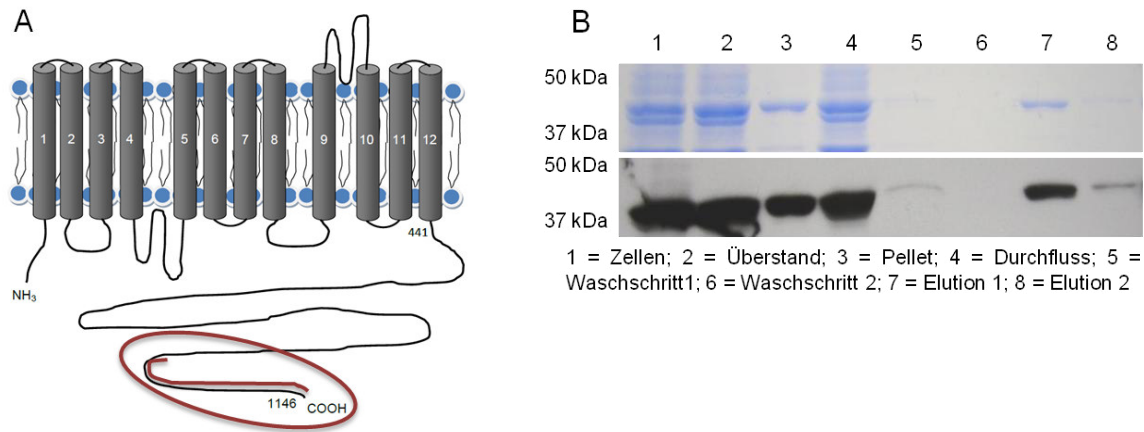
Studien belegen, dass zytosolische, C-terminale Regionen von Transportproteinen mit einer Reihe von regulatorischen Proteinen interagieren und somit für einen komplexen Regulationsmechanismus sorgen (Putney *et al.*, 2002). Die C-terminale Verlängerung des SOS1-Antiporters umfasst knapp über 700 Aminosäuren. Diese enorme Länge sollte Platz für eine Vielzahl von Bindestellen für diverse regulatorische Proteine bieten. Quintero *et al.* (2011) konnten die Bindestelle der SOS2-Kinase bestimmen. Diese befindet sich am Ende des

C-terminus an der Position S1138. Durch Wachstumstests mit komplementierten Hefen konnten sie weiterhin die Existenz einer auto-inhibitorischen Domäne innerhalb der letzten 130 Aminosäuren des C-terminus identifizieren. Katiyar-Agarwal *et al.* (2006) konnten zudem die Interaktion zwischen dem SOS1 C-terminus und dem regulatorischen Protein RCD1 bestätigen. Diese Interaktion stellt eine Verbindung zwischen der Salzstress-Antwort und oxidativem Stress her. Yu *et al.* (2010) konnten eine weitere Interaktion des SOS1 C-terminus mit der MAPK6 nachweisen. Weitere Interaktionspartner sind bisher nicht bekannt.

Gemäß den vorhergehenden Befunden führt die Überexpression des C-terminus des SOS1 zu einer veränderten Salztoleranz. Um zu ermitteln, ob gegebenenfalls Bindeproteine, die mit dem SOS1 C-terminus interagieren, zu einer veränderten Transportaktivität führen, sollten neue mögliche Bindepartner des SOS1-Transporters gefunden werden. Dazu wurde zuerst ein GST-SOS1 C-terminus-Fusionskonstrukt im pDEST15<sup>TM</sup>-Vektor hergestellt. Als Target-Protein wurde das Ende des SOS1 C-terminus gewählt (Abbildung 3.22A). Die letzten 168 Aminosäuren stellen die hydrophilste Region des C-terminus dar. Innerhalb dieser Region liegen die Phosphorylierungsstelle der SOS2-Kinase und der MPK6 sowie die auto-inhibitorische Domäne.

### **3.3.1 Rekombinante Aufreinigung von SOS1 C-terminus in *Escherichia coli* (*E. coli*)**

Um das C-terminale Ende des SOS1 C-terminus als Target-Protein für einen anschließenden Pulldown-Assay nutzen zu können, wurde das Protein heterolog in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Dazu wurden *E. coli*-Zellen des Stamms BL21-SI mit dem generierten *SOS1 C-terminus (AS978-1146)::pDEST15* Konstrukt transformiert. Dadurch trägt das Protein am N-terminalen Ende einen GST-tag, der eine Reinigung mittels immobilisierter Affinitätschromatographie erlaubt. Abbildung 3.22B zeigt das Coomassie-Blau gefärbte Gel sowie den dazugehörigen Western Blot der Reinigung. Das rekombinante Protein kann bei einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 44 kDa nachgewiesen werden. Dieses Molekulargewicht setzt sich zusammen aus dem SOS1 C-terminus (AS978-1146) plus GST-tag.



**Abbildung 3.22: Expression und Reinigung von *AtSOS1* C-terminus (AS978-1146) in *E. coli* (BL21) Zellen**

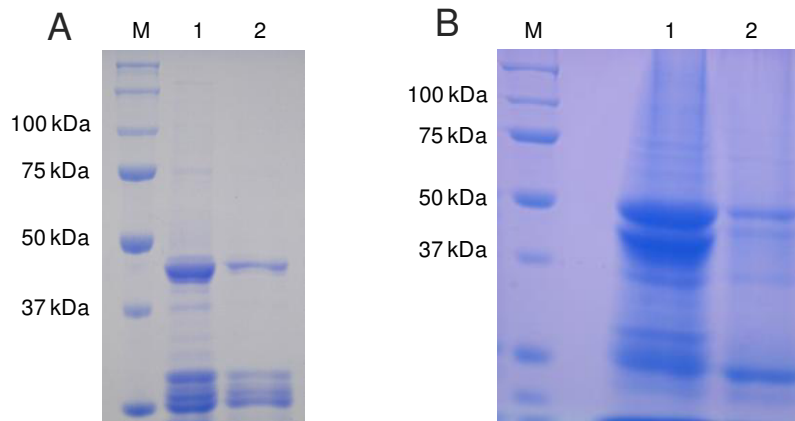
(A) Topographisches Modell vom SOS1-Transporter. Eingezeichnet ist die ungefähre Lage der rekombinant synthetisierten Region des C-terminus (AS978-1146).

(B) SDS-PAGE und Western-Blot aus dem Überstand von *AtSOS1* C-terminus synthetisierenden *E. coli* Zellen und gereinigtes Protein. Dargestellt ist das Coomassie-Blau gefärbte Acrylamid-Gel und der dazugehörige Western-Blot. Die Größen der Referenzproteine im Marker (M) wurden in Kilodalton (kDa) angegeben.

Für weitere Analysen wurde das gereinigte Protein nach Elution von der Glutathion Sepharose (GE Healthcare) verwendet und mittels Amicon® Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten auf eine Konzentration von 2 mg/ml aufkonzentriert (Abbildung 3.22B, 7 und 8).

### 3.3.2 Pulldown-Assay mittels Affi-Gel10 Säule

Das konzentrierte Protein wurde anschließend mit 1 ml Affi-Gel10 Matrix über Nacht inkubiert und die Kopplungseffizienz mittels SDS-PAGE ermittelt (Abbildung 3.23A). Als Kontrolle wurde auch gereinigtes GST ohne Fusionsprotein an eine Affi-Gel10 Säule gekoppelt (Daten nicht gezeigt).



### Abbildung 3.23: Kopplung von gereinigtem *AtSOS1* C-terminus an Affi-Gel10 Säule und Elution

(A) Dargestellt ist SDS-PAGE von gereinigtem *AtSOS1* C-terminus vor (1) und nach (2) der Kopplung an eine Affi-Gel10 Säule.

(B) Dargestellt ist SDS-PAGE der Elutionen der Affi-Gel10 Säulen nach Inkubation mit Pflanzenextrakt.

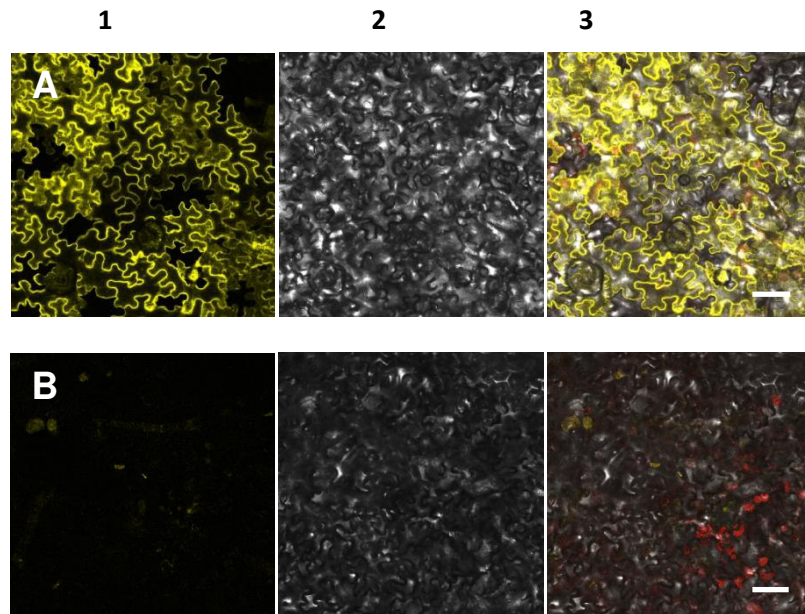
(1) zeigt die SDS-Elution von der *AtSOS1* C-terminus gekoppelten Säule, (2) die mit GST-gekoppelte Kontrollsäule. Gezeigt ist jeweils das Coomassie-Blau gefärbte Acrylamid-Gel. Die Größen der Referenzproteine im Marker (M) wurden in Kilodalton (kDa) angegeben.

Nach der Kopplung des *SOS1* C-terminus (AS978-1146) an die Affi-Gel10 Säule wurde diese über Nacht bei 4°C unter Rühren mit Pflanzenrohextrakt inkubiert, der durch Mörsern von *A. thaliana* Wildtyp-Blattmaterial hergestellt wurde. Dazu wurden die Pflanzen für fünf Wochen auf Erde angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen für fünf Tage entweder mit oder ohne 400 mM NaCl gewässert. Nach Elution mit 1% SDS wurden die Proben von der *SOS1* C-terminus gekoppelten Säule sowie auch von der Kontrollsäule ohne *SOS1* C-terminus auf SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 3.23B). Das Coomassie-Blau gefärbte Gel wurde anschließend mittels Skalpell in kleine Gelstücke geschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse der Proben wurde von der Alberta Proteomics and Mass Spectrometry Facility (APM, University of Alberta, Edmonton, Kanada) sowie vom Center of MS-analytics (TU Kaiserslautern) durchgeführt. Dabei konnten insgesamt 143 bzw. 79 putative Interaktionspartner identifiziert werden. Die Liste der gefundenen Proteine, welche spezifisch nur an die mit *AtSOS1* C-terminus gekoppelten Säulen gebunden haben, ist im Anhang zu finden (Tabelle 81 und 8.2). Unter Kontrollbedingungen befinden sich unter den 15 am häufigsten gefundenen Proteinen gleich fünf verschiedene 14-3-3 Isoformen, nämlich 14-3-3  $\omega$ ,  $\phi$ ,  $\kappa$ ,  $\nu$  und  $\nu$ . Weiterhin wurden u. a. metabolische Enzyme, wie die Enolase 2, die  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS) und die S-Adenosylmethionin Synthase 1 als putative Interaktionspartner identifiziert.

Unter Salzstressbedingungen wurden u. a. die drei Calcium-abhängigen Proteinkinasen CPK3, CPK4 und CPK11, sowie die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Oxidase 3 gefunden. Die 14-3-3 Proteine konnten unter diesen Bedingungen nicht als Bindepartner identifiziert werden (Tabelle 8.1 und 8.2).

### 3.3.3 Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC)

Zur Verifizierung der mittels Pull-down Assay gefundenen möglichen Interaktionspartner des SOS1 C-terminus wurden BiFC-Analysen durchgeführt (Hu *et al.*, 2002). Diese Methode dient dem Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen *in vivo* und erlaubt auch eine Aussage über deren Intensität. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proteine jeweils mit N- bzw. C-terminalen Fragmenten des gelb-fluoreszierenden Proteins YFP (yellow fluorescent protein) markiert und zusammen transient in Blätter von *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) infiltriert (Wydro *et al.*, 2006). Interagieren beide Proteine miteinander, so führt dies zu einer Rekonstitution der beiden YFP-Fragmente zu einem funktionellen fluoreszierenden YFP (Kerppola, 2006). Nach drei bis fünf Tagen Expressionszeit wurden die Blätter mithilfe des Laser-Scanning-Mikroskops ausgewertet. Abbildung 3.24A zeigt die Fluoreszenz-Bilder nach transienter Transformation des *AtTST1* und der korrespondierenden Proteinkinase *AtVIK1*. Diese Interaktion wurde bereits in der Arbeitsgruppe Neuhaus charakterisiert (Wingenter *et al.*, 2011) und diente als Positivkontrolle, da sie ein starkes Fluoreszenzsignal zeigt. In Abbildung 3.24B ist die Negativkontrolle aus *AtSOS1* C-terminus und der *AtVIK1* dargestellt. Da diese beiden Proteine offensichtlich nicht interagieren, ist hier kein Fluoreszenzsignal zu detektieren.

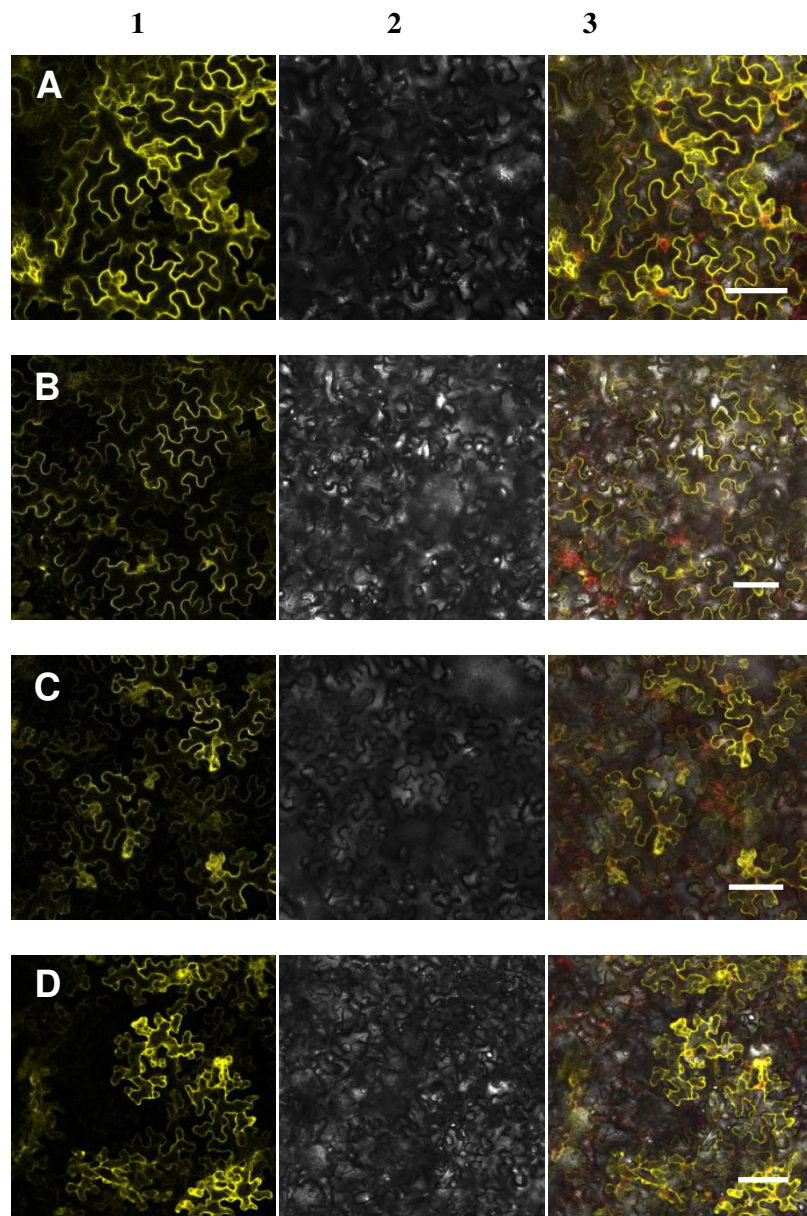


**Abbildung 3.24: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen *AtTS1*, *AtSOS1* C-terminus und *AtVIK1* in Tabak-Epidermiszellen**

Dargestellt sind jeweils die YFP-Fluoreszenz (1, gelb), das Durchlicht-Bild (2) und die Überlagerung von YFP- und Autofluoreszenz der Chloroplasten und Durchlicht (3). Gezeigt sind Tabak-Epidermiszellen, die *tst1::yfp<sup>CT</sup>* und *vik1::yfp<sup>NT</sup>* (A), sowie *sos1 C-terminus::yfp<sup>NT</sup>* und *vik1::yfp<sup>CT</sup>* (B) koexprimierten (Arsova *et al.*, 2010). Der Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

Da unter den 15 häufigsten Proteinen gleich fünf verschiedene Isoformen von 14-3-3 Proteinen gefunden wurden, wurden diese Proteine als äußerst vielversprechende Interaktions-Kandidaten ausgewählt. Außerdem ist bereits bekannt, dass 14-3-3 Proteine mit der Protein-Kinase SOS2 sowie mit dem menschlichen SOS1-Homolog NHE1 interagieren (Amith & Fliegel, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Abbildung 3.25 zeigt die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation des *AtSOS1* C-terminus und den *At14-3-3* Proteinen  $\nu$  (A),  $\omega$  (B),  $\kappa$  (C) und  $\lambda$  (D) nach transientser Transformation in Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Hierfür wurde der *AtSOS1* C-terminus mit dem N-terminalen Fragment und die vier *At14-3-3* Proteine jeweils mit dem C-terminalen Fragment des YFP fusioniert. Obwohl das 14-3-3  $\lambda$  Protein nicht mittels Massenspektrometrie gefunden wurde, wurde es aufgrund seiner hohen Homologie zum 14-3-3  $\kappa$  Protein und seiner Interaktion mit der SOS2-Kinase ebenfalls untersucht. Die Koexpression aller vier Kombinationen resultiert in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal, was auf eine Interaktion der jeweiligen Proteine *in vivo* zurückzuführen ist.



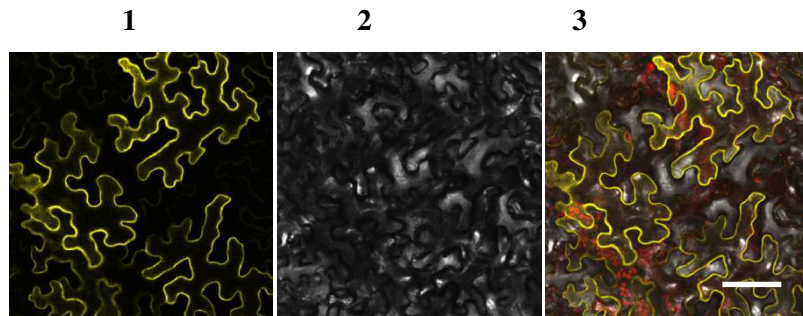


**Abbildung 3.25: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen *AtSOS1* C-terminus und *At14-3-3* v, ω, κ und λ in Tabak-Epidermiszellen**

Dargestellt sind jeweils die YFP-Fluoreszenz (1, gelb), das Durchlicht-Bild (2) und die Überlagerung von YFP- und Autofluoreszenz der Chloroplasten und Durchlicht (3). Gezeigt sind Tabak-Epidermiszellen, die *sos1* C-terminus::*yfp<sup>NT</sup>* und *14-3-3 v*::*yfp<sup>CT</sup>* (A), ω (B), κ (C) und λ (D) koexprimierten (Arsova *et al.*, 2010). Der Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

Abbildung 3.26 zeigt die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation des *AtSOS1* C-terminus und der *AtCPK3* Proteinkinase nach transients Transformation in Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Die CPK3 Proteinkinase wurde in dem unter Salzstressbedingungen durchgeführten Pulldown-Assay als möglicher Bindepartner des *AtSOS1* identifiziert. Zur Verifizierung der Interaktion wurde der *AtSOS1* C-terminus mit

dem C-terminalen Fragment und die Calcium-abhängige Proteinkinase CPK3 mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert. Die Koexpression resultiert auch hier in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal, was auf eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo* zurückzuführen ist.

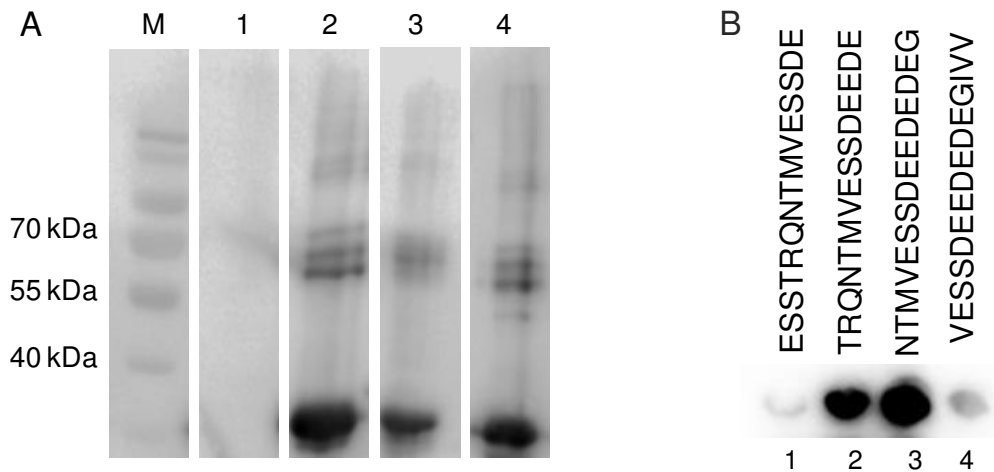


**Abbildung 3.26: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen *AtSOS1* C-terminus und *AtCPK3* in Tabak-Epidermiszellen**

Dargestellt sind jeweils die YFP-Fluoreszenz (1, gelb), das Durchlicht-Bild (2) und die Überlagerung von YFP- und Autofluoreszenz der Chloroplasten und Durchlicht (3). Gezeigt sind Tabak-Epidermiszellen, die *sos1 C-terminus::yfp<sup>CT</sup>* und *cpk3::yfp<sup>NT</sup>* koexprimierten (Arsova *et al.*, 2010). Der Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

### 3.3.4 Peptid-Spot Binde-Assay von *AtSOS1* C-terminus

Zur Bestimmung der genauen Bindestelle der *At14-3-3* Proteine am *SOS1* C-terminus wurde eine Peptid-Spot Analyse in Kooperation mit der AG Zimmermann von der Universität des Saarlandes durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinsequenz des *AtSOS1* C-terminus auf einer Zellulosemembran immobilisiert (Hilpert *et al.*, 2007). Ein Spot entspricht 15 Aminosäuren des Proteins und von Spot zu Spot besteht eine Aminosäure-Verschiebung von drei Aminosäuren. Das Protein, dessen Interaktion mit dem *SOS1* C-terminus untersucht werden soll, wurde heterolog in *E. coli* synthetisiert und gereinigt. Dazu wurden *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 Rosetta mit dem generierten *14-3-3 ω::pET16b* Konstrukt transformiert. Dadurch trägt das Protein am N-terminalen Ende einen Histidin-tag, bestehend aus 10 Histidinen. Dieser Tag lässt sich gut mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) reinigen. Abbildung 3.27A zeigt den Western Blot der Reinigung. Das rekombinante Protein kann bei einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 28,7 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.27A-2). Dieses Molekulargewicht setzt sich zusammen aus dem *At14-3-3 ω* plus (10x)His-tag.



**Abbildung 3.27: Reinigung von *At14-3-3*  $\omega$ ,  $\lambda$  und  $\kappa$  und Peptid-Spots von *AtSOS1* C-terminus**

(A) Western-Blot aus dem Überstand von (10xHis)-*At14-3-3* synthetisierenden *E. coli* Zellen. Der Blot wurde zunächst mit einem Anti-Polyhistidin-Antikörper und anschließend mit einem Anti-Maus-IgG (HRP-Konjugat) inkubiert. 1 = nicht induzierte Zellen, 2 = Elution von *At14-3-3*  $\omega$ , 3 = Elution von *At14-3-3*  $\lambda$ , 4 = Elution von *At14-3-3*  $\kappa$  nach IMAC Reinigung. Die Größen der Referenzproteine im Marker (M) wurden in Kilodalton (kDa) angegeben.

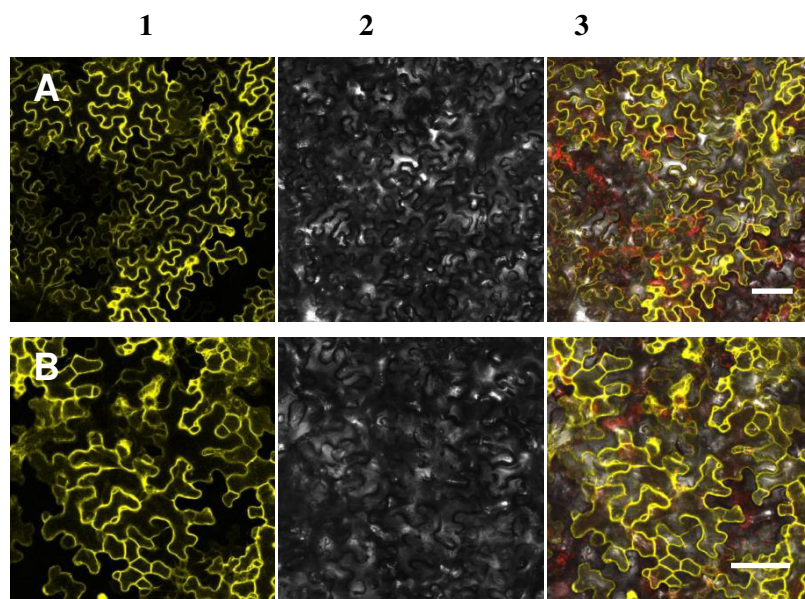
(B) Dargestellt sind Peptid-Spots gebunden von (10xHis)-gelabelten *At14-3-3*  $\omega$ . Die Spots korrespondieren mit den angegebenen Aminosäuresequenzen des *AtSOS1* C-terminus.

Abbildung 3.27B zeigt Peptid Spots gebunden mit (10xHis)-gelabeltem *At14-3-3*  $\omega$  und die korrespondierenden Aminosäuresequenzen des *AtSOS1* C-terminus. Das *At14-3-3*  $\omega$  Protein bindet die Spots mit den Sequenzen  $^{1112}$ TRQNTMVESSEDEE $^{1126}$  und  $^{1115}$ NTMVESSEDEEDEG $^{1129}$ . 14-3-3 Proteine sind regulatorische Proteine, die die Aktivität von Phospho-Proteinen beeinflussen. So modulieren sie andere Proteine durch Bindung an phosphorylierte Aminosäurereste in ihrer Funktion, Konformation oder auch Lokalisierung (Sehnke *et al.*, 2002b). Es wurde daher lange angenommen, dass diese Proteine nur an solche Aminosäurereste binden, die bereits durch eine Proteinkinase phosphoryliert wurden. Später konnte jedoch festgestellt werden, dass auch nicht-phosphorylierte Bindemotive existieren, die eine hohe Anzahl an Glutamat- und Aspartatresten aufweisen. Die negativen Ladungen dieser Aminosäurereste können die negative Ladung des Phosphatrestes ersetzen (Wang *et al.*, 1999; Fuglsang *et al.*, 2003). Auch in der gefundenen Aminosäuresequenz des *AtSOS1* C-terminus befinden sich eine Reihe von Glutamat- und Aspartatresten verteilt um zwei Serinreste (Abbildung 3.27B).

### 3.4 Interaktionsstudien zu *At14-3-3* $\kappa$ und $\lambda$

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels BiFC-Analysen bereits die Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen  $\nu$ ,  $\omega$ ,  $\lambda$  und  $\kappa$  und dem Membranprotein SOS1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.25A-D). Die Interaktion mit dem 14-3-3  $\omega$  wurde zusätzlich durch eine Peptid-Spot Analyse verifiziert (Abbildung 3.27B). Shin *et al.* (2011) haben mittels Pulldown-Assay den tonoplastidären *AtTST1* Transporter als weiteren möglichen Interaktionspartner des 14-3-3  $\kappa$  Proteins identifiziert. Um diese Interaktion zu verifizieren, wurden erneut BiFC-Analysen durchgeführt. Da 14-3-3  $\lambda$  das nächste Homolog zum 14-3-3  $\kappa$  darstellt (Abbildung 1.4), wurde anschließend untersucht, ob auch hier eine Interaktion mit dem *AtTST1*-Transporter vorliegt.

#### 3.4.1 BiFC-Studien zwischen *At14-3-3* $\kappa$ und $\lambda$ und *AtTST1*



**Abbildung 3.28: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen *AtTST1* und *At14-3-3*  $\kappa$  und  $\lambda$  in Tabak-Epidermiszellen**

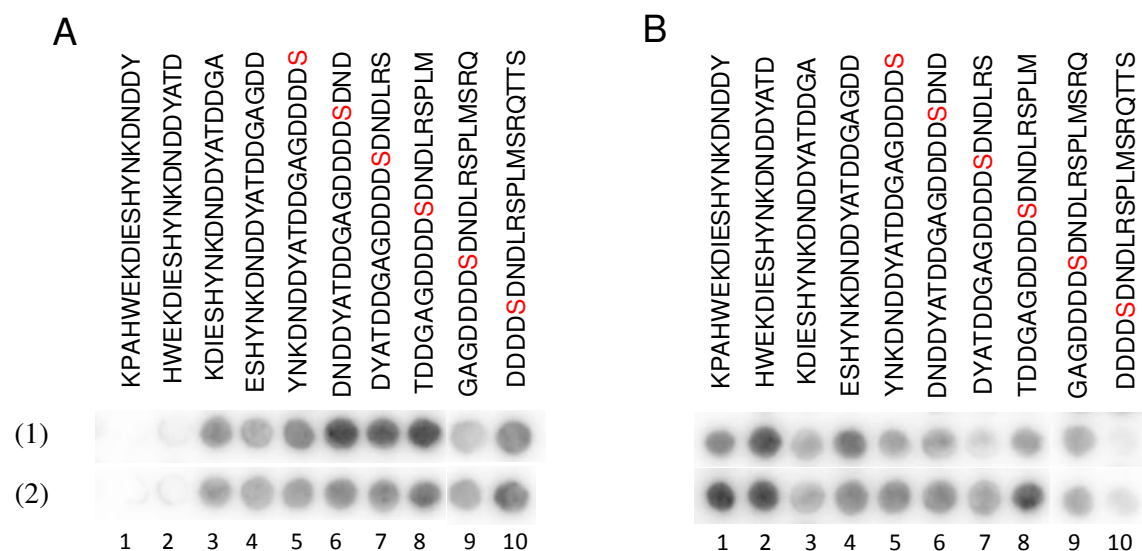
Dargestellt sind jeweils die YFP-Fluoreszenz (1, gelb), das Durchlicht-Bild (2) und die Überlagerung von YFP- und Autofluoreszenz der Chloroplasten und Durchlicht (3). Gezeigt sind Tabak-Epidermiszellen, die *tst1::yfp<sup>CT</sup>* und *14-3-3*  $\kappa::yfp<sup>NT</sup> (A) und  $\lambda$  (B) koexprimierten (Arsova *et al.*, 2010). Der Balken entspricht einer Länge von 100  $\mu\text{m}$ .$

In Abbildung 3.28 ist die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation des *AtTST1* Transporters und den *At14-3-3* Proteinen  $\kappa$  (A) und  $\lambda$  (B) nach transients Transformation in

Epidermiszellen von *N. benthamiana* dargestellt. Hierfür wurden der AtTST1 mit dem C-terminalen Fragment und die beiden At14-3-3 Proteine jeweils mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert. Die Koexpression der beiden Kombinationen resultiert in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal, was auf eine Interaktion der jeweiligen Proteine *in vivo* zurückzuführen ist.

### 3.4.2 Peptid-Spot Analyse der Bindung von 14-3-3 $\kappa$ und $\lambda$ mit dem AtTST1 Loop

Zur Bestimmung der genauen Bindestelle der At14-3-3 Proteine am verlängerten, zytosolischen Loop des AtTST1 wurde erneut eine Peptid-Spot Analyse in Kooperation mit der AG Zimmermann von der Universität des Saarlandes durchgeführt. Diesmal wurde die Proteinsequenz des Loops, der die Transmembrandomänen sechs und sieben verbindet, auf einer Zellulosemembran immobilisiert. Ein Spot entspricht 20 Aminosäuren des Proteins und es besteht eine Aminosäure-Verschiebung von drei Aminosäuren. Die Proteine, deren Interaktion mit dem AtTST1-Loop untersucht werden soll, wurden heterolog in *E. coli* synthetisiert und gereinigt (Abbildung 3.27A-3 und A-4). Dazu wurden *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 Rosetta mit den generierten *14-3-3 $\kappa$ ::pET16b* und *14-3-3 $\lambda$ ::pET16b* Konstrukten transformiert. Dadurch trägt das Protein am N-terminalen Ende einen His-tag, der eine Reinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) erlaubt.



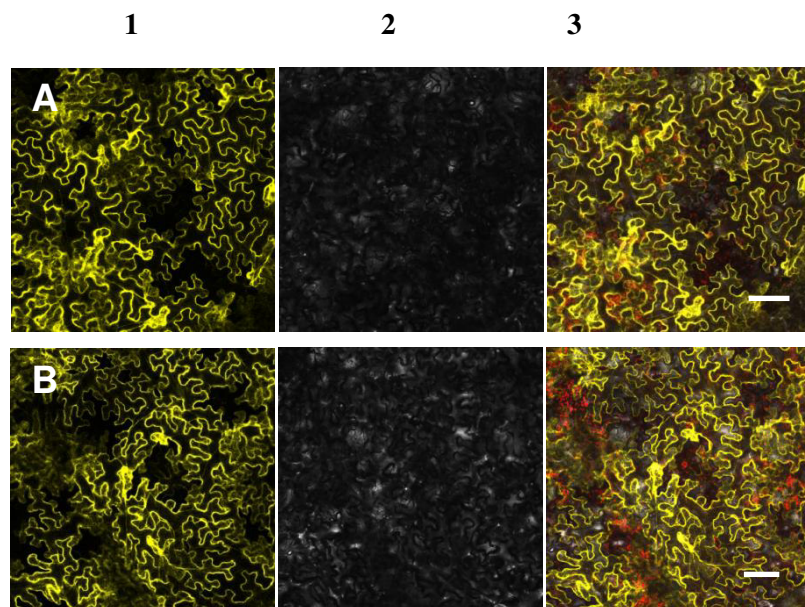
**Abbildung 3.29: Peptid-Spots von AtTST1 gebunden von At14-3-3  $\kappa$  und  $\lambda$ .**

Dargestellt sind Peptid-Spots gebunden von (10xHis)-gelabelten At14-3-3  $\kappa$  (A) und  $\lambda$  (B). Die Spots korrespondieren mit den angegebenen Aminosäuresequenzen des AtTST1, unverändert (1) und mit Mutation von S  $\rightarrow$  D (2) der gekennzeichneten Aminosäuren

Abbildung 3.29A und B zeigen Peptid-Spots gebunden mit (10xHis)-gelabeltem *At14-3-3*  $\kappa$  (A) und  $\lambda$  (B) und die korrespondierenden Aminosäuresequenzen des *AtTST1*. Die *At14-3-3*  $\kappa$  und  $\lambda$  Proteine binden die Spots mit den angegebenen Sequenzen. Das rot-markierte Serin an Position 370 innerhalb des stark negativ geladenen Aspartat-Clusters des *AtTST1*-Loops wurde als Phosphorylierungsstelle der VIK1-Kinase vorgeschlagen (Wingenter *et al.*, 2011). Das Auftreten der Interaktion von 14-3-3  $\kappa$  und  $\lambda$  an dieser Position legt eine zusätzliche Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen und der VIK1-Kinase nahe. Diese mögliche Interaktion wurde ebenfalls anhand von BiFC-Analysen untersucht.

Weiterhin fällt auf, dass die Bindung des 14-3-3  $\kappa$  Proteins nach Mutation des Serins zu Aspartat schwächer wird. Im Gegensatz dazu führt die simulierte Phosphorylierung im Fall des 14-3-3  $\lambda$  Proteins zu einer Verstärkung des Signals (Abbildung 3.29A-2,B-2).

### 3.4.3 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsstudien zwischen *At14-3-3* $\kappa$ und $\lambda$ und *AtVIK1*



**Abbildung 3.30: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsstudien zwischen *AtVIK1* und *At14-3-3*  $\kappa$  und  $\lambda$  in Tabak-Epidermiszellen**

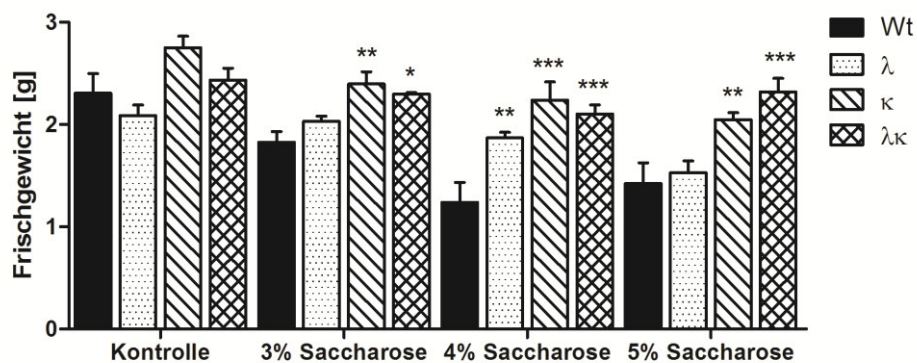
Dargestellt sind jeweils die YFP-Fluoreszenz (1, gelb), das Durchlicht-Bild (2) und die Überlagerung von YFP- und Autofluoreszenz der Chloroplasten und Durchlicht (3). Gezeigt sind Tabak-Epidermiszellen, die *vik1::yfp<sup>CT</sup>* und *14-3-3*  $\kappa::yfp<sup>NT</sup> (A) und  $\lambda$  (B) koexprimierten (Arsova *et al.*, 2010). Der Balken entspricht einer Länge von 100  $\mu\text{m}$ .$

Abbildung 3.30 zeigt die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation der *AtVIK1* Proteinkinase und den *At14-3-3* Proteinen  $\kappa$  (A) und  $\lambda$  (B) nach transients Transformation in Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Hierfür wurden die *AtVIK1* mit dem C-terminalen Fragment und die beiden *At14-3-3* Proteine jeweils mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert. Die Koexpression der beiden Kombinationen resultiert in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal, was auf eine Interaktion der jeweiligen Proteine *in vivo* zurückzuführen ist.

### 3.5 Physiologische Analysen von *At14-3-3* $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen

#### 3.5.1 Wachstum auf Hochsaccharosebedingungen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Bindung bestimmter 14-3-3 Proteine an den tonoplastidären *AtTST1*-Transporter bzw. an die korrespondierende Proteinkinase *AtVIK1* auf die Zuckerhomöostase der Pflanze hat, wurden *At14-3-3*  $\lambda$ , *At14-3-3*  $\kappa$  und *At14-3-3*  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten analysiert. Die entsprechenden Salk-Linien (Salk\_075219 und Salk\_071097, sowie die entsprechende Doppelmutante) wurden freundlicherweise von Prof. Jörg Kudla von der Universität Münster (Münster, Germany) bereitgestellt.



**Abbildung 3.31: Frischgewicht von Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (Kontrolle, 3%, 4%, 5% Saccharose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Dem Standard-MS8 Medium waren entweder 1% (Kontrolle), 3%, 4% oder 5% Saccharose zugesetzt. Nach der Ernte wurde das Frischgewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*= $p < 0,01$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ ).

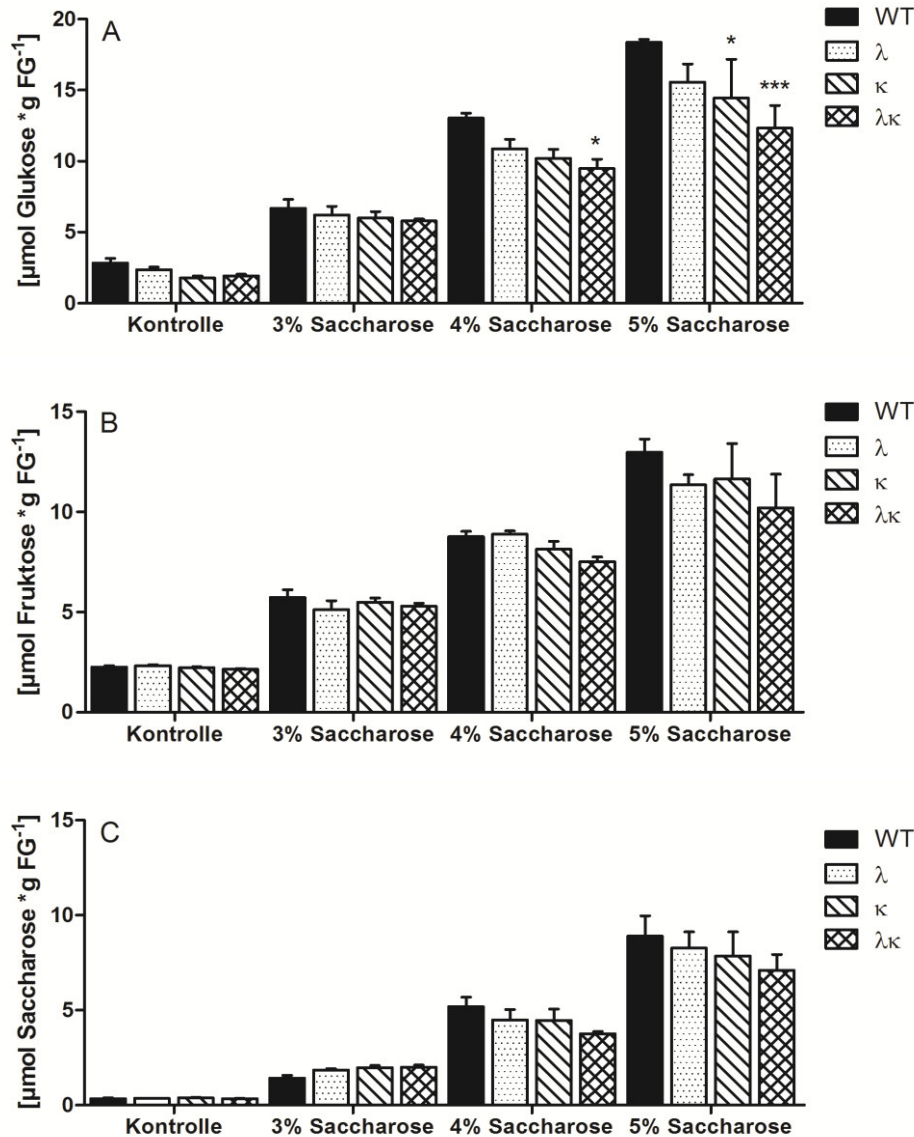
Zur Untersuchung der Auswirkungen von Zuckerstress auf die Produktion von Biomasse, wurden der Wildtyp sowie die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien in steriler Flüssigkultur angezogen.

Das Medium enthielt 1%, 3%, 4% oder 5% Saccharose. Nach 14 Tagen wurden die Keimlinge geerntet und das Frischgewicht bestimmt (Abbildung 3.31). Unter Kontrollbedingungen besitzt der Wildtyp ein Frischgewicht von 2,3 g. Die drei  $\lambda\kappa$  Mutanten-Linien weisen mit 2,1 g ( $\lambda$ ), 2,8 g ( $\kappa$ ) und 2,4 g ( $\lambda\kappa$ ) keinen Unterschied zum Wildtyp auf. Die Zugabe von 3% Saccharose führen im Wildtyp zu einer Reduktion des Frischgewichts auf 1,8 g. Ein ähnliches Frischgewicht weist die Linie  $\lambda$  mit 2 g auf. Die beiden Knockout-Linien  $\kappa$  und  $\lambda\kappa$  weisen mit 2,4 g und 2,3 g ein signifikant höheres Frischgewicht auf. 4% Saccharose führen zu einer zusätzlichen Frischgewichtsreduktion im Wildtyp auf nur noch 1,2 g. Unter diesen Bedingungen besitzen alle drei Knockout-Linien ein im Vergleich zum Wildtyp signifikant höheres Frischgewicht von 1,9 g ( $\lambda$ ), 2,2 g ( $\kappa$ ) und 2,1 g ( $\lambda\kappa$ ). Die Zugabe von 5% exogener Saccharose resultiert in Wildtyp- und in 14-3-3  $\lambda$ -Pflanzen in einem vergleichbaren Frischgewicht von 1,4 g und 1,5 g. Die beiden Knockout-Linien  $\kappa$  und  $\lambda\kappa$  zeigen auch unter diesen Bedingungen noch ein höheres Frischgewicht von 2,1 g und 2,3 g (Abbildung 3.31).

Um zu untersuchen, warum der Wildtyp unter Hochsaccharosebedingungen eine deutlich reduzierte Biomassenproduktion aufweist als die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien, wurde neben dem Frischgewicht auch die Zuckerakkumulation der in flüssiger Sterilkultur angezogenen Pflanzen bestimmt. Unter Kontrollbedingungen sind im Wildtyp 2,8  $\mu\text{mol/g}$  FG Glukose, 2,3  $\mu\text{mol/g}$  FG Fruktose und 0,4  $\mu\text{mol/g}$  FG Saccharose enthalten. Die Zugabe von 3%, 4% und 5% Saccharose führt zu einer graduellen Erhöhung aller drei Zucker (Abbildung 3.32A-C). Die Glukose nimmt sukzessive um das 2,4-, 4,6- und 6,5-fache auf einen Maximalwert von 18,36  $\mu\text{mol/g}$  FG zu. Die Fruktosewerte steigen um das 2,5-, 3,9- und 5,7-fache an. Die Saccharosewerte steigen am höchsten an und erhöhen sich um das 4-, 14,8- und 25,4-fache. Im Vergleich zum Wildtyp besitzen die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien niedrigere Zuckerkonzentrationen. In der 14-3-3  $\lambda$  Knockout-Linie nimmt die Glukose von 2,4  $\mu\text{mol/g}$  FG auf 6,2  $\mu\text{mol/g}$  FG, auf 10,9  $\mu\text{mol/g}$  FG und schließlich auf 15,6  $\mu\text{mol/g}$  FG zu. Das bedeutet eine maximale Zunahme um das 6,6-fache. Die Fruktose steigt von 2,3  $\mu\text{mol/g}$  FG sukzessive um das 4,9-fache auf 11,4  $\mu\text{mol/g}$  FG unter 5% Saccharose-Bedingungen an. Die Saccharosewerte nehmen von 0,36  $\mu\text{mol/g}$  FG auf maximal 8,3  $\mu\text{mol/g}$  FG zu. In der  $\kappa$  Knockout-Linie liegt die Glukosekonzentration mit einem Maximalwert von 14,44  $\mu\text{mol/g}$  FG nochmal niedriger als im Wildtyp. Die Fruktosewerte steigen von 2,2  $\mu\text{mol/g}$  FG um das 5,2-fache auf 11,7  $\mu\text{mol/g}$  FG an. Die Saccharose nimmt einen Maximalwert von 7,8  $\mu\text{mol/g}$  FG an. Die deutlichste Zuckerreduktion findet in der  $\lambda\kappa$  Doppelknockout-Linie statt. Hier steigt die Glukose von 1,9  $\mu\text{mol/g}$  FG um das 6,4-fache auf maximal 12,3  $\mu\text{mol/g}$  FG an. Auch die Fruktose weist unter 5% Saccharose-Bedingungen



lediglich einen Wert von 10,2  $\mu\text{mol/g FG}$  auf. Die Saccharose nimmt hier einen Maximalwert von 7,1  $\mu\text{mol/g FG}$  an (Abbildung 3.32A-C).



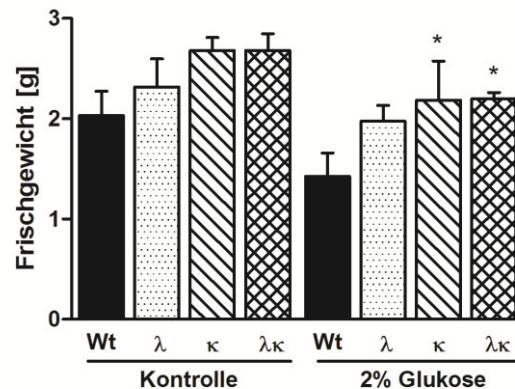
**Abbildung 3.32: Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen (Kontrolle, 3%, 4%, 5% Saccharose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Dem Standard-MS8 Medium waren entweder 1% (Kontrolle), 3%, 4% oder 5% Saccharose zugesetzt. Nach der Ernte wurde der Gehalt an Glukose (A), Fruktose (B) und Saccharose (C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*= $p < 0,001$ , \*= $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen unter Hochsaccharosebedingungen geringere Zuckerwerte aufweisen als der Wildtyp.

### 3.5.2 Wachstum auf Hochglukosebedingungen

Nach der Analyse des Wachstums auf Hochsaccharosebedingungen wurde auch das Wachstum der verschiedenen  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien auf 2% Glukose untersucht. Dazu wurden Wildtyp- sowie die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien für 14 Tage in flüssiger Sterilkultur angezogen. Nach sieben Tagen Wachstum auf Standard-MS8 Medium fand eine Zugabe von 2% Glukose statt. Die Bestimmung des Frischgewichts erfolgte nach weiteren sieben Tagen.

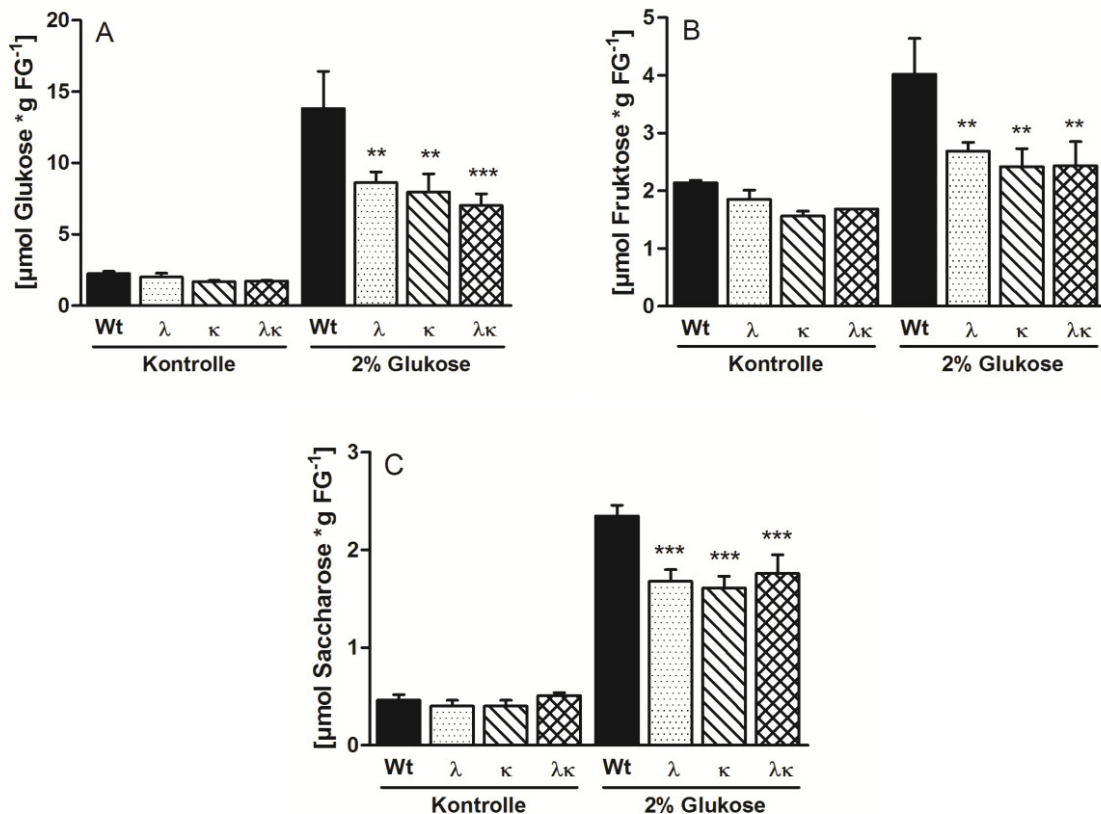


**Abbildung 3.33: Frischgewicht von Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (Kontrolle, 2% Glukose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Nach sieben Tagen Wachstum auf Standard-MS8 Medium fand ein Mediumwechsel statt. Die Keimlinge wurden für weitere sieben Tage entweder auf Kontroll- oder 2% Glukose kultiviert. Nach der Ernte wurde das Frischgewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*=  $p < 0,05$ ).

Die Zugabe von 2% Glukose ins Wachstumsmedium führt zu einer generellen Abnahme des Frischgewichts in allen vier Linien im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 3.33). Der Wildtyp zeigt eine Reduktion im Frischgewicht von 2 g auf 1,4 g. Dagegen nimmt das Frischgewicht der  $\lambda$  Knockout-Linie von 2,3 g lediglich auf 2 g ab. Signifikant erhöhte Frischgewichtswerte im Vergleich zum Wildtyp zeigen die Linien  $\kappa$  und  $\lambda\kappa$  mit je 2,2 g unter Hochglukosebedingungen.

Des Weiteren wurde auch die Zuckerakkumulation in den vier Linien unter Hochglukosebedingungen bestimmt. Neben der Zunahme im Frischgewicht weisen die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien eine deutlich reduzierte Zuckerakkumulation im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.34A-C).



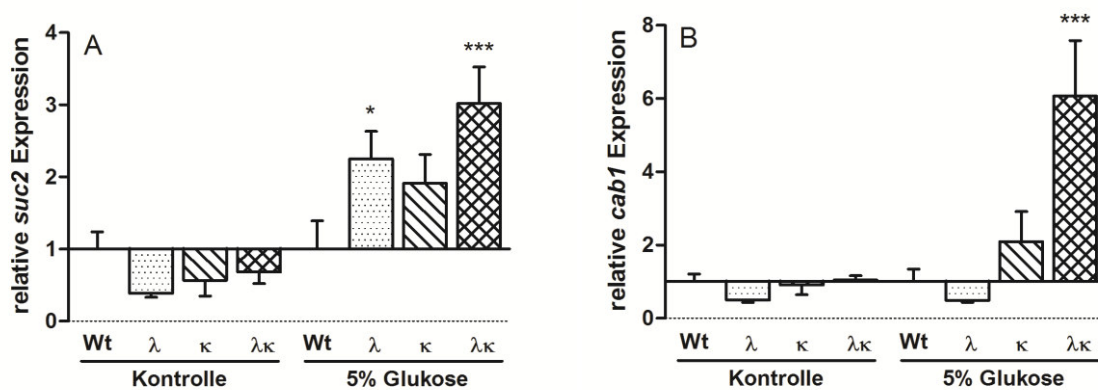
**Abbildung 3.34: Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen (Kontrolle, 2% Glukose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Nach sieben Tagen Wachstum auf Standard-MS8 Medium fand ein Mediumwechsel statt. Die Keimlinge wurden für weitere sieben Tagen entweder auf Kontroll- oder 2% Glukose kultiviert. Nach der Ernte wurde der Gehalt an Glukose (A), Fruktose (B) und Saccharose (C) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 3 Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ ).

Der Wildtyp zeigt eine Zunahme im Glukosegehalt um das 6,2-fache auf  $13,8 \mu\text{mol/g FG}$  im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Beim Fruktosegehalt tritt eine Erhöhung um das 1,9-fache auf  $4 \mu\text{mol/g FG}$  ein und die Saccharosewerte steigen von  $0,5 \mu\text{mol/g FG}$  auf  $2,4 \mu\text{mol/g FG}$  an. Im Gegensatz dazu weisen alle drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien deutlich niedrigere Zuckerkonzentrationen auf (Abbildung 3.34A-C). Unter Hochglukosebedingungen kommt es hier lediglich zu einer Glukoseakkumulation um die  $7,9 \mu\text{mol/g FG}$ , zu einer Fruktoseakkumulation zwischen  $2,4 \mu\text{mol/g FG}$  und  $2,7 \mu\text{mol/g FG}$  und zu einer Saccharoseakkumulation um die  $1,7 \mu\text{mol/g FG}$ .

### 3.5.3 Analyse von CAB1 und SUC2 unter Hochglukosebedingungen

Diese reduzierten Zuckerkonzentrationen lassen sich auch durch Analyse der Zucker-regulierten Gene *cab1* und *suc2* bestätigen. Zucker sind nicht nur wichtige Energiequellen, sie fungieren auch als Signalmoleküle und regulieren die Expression vieler Gene (Sheen *et al.*, 1999). So inhibieren hohe zytosolische Zuckerkonzentrationen die Expression von Genen, die in die Photosynthese oder generell in den Anabolismus involviert sind, und induzieren die Expression katabolischer Gene (Rolland & Sheen, 2005). Bei den Genen, die für das Chlorophyll<sub>ab</sub>-bindende Protein CAB1 und für den Phloem-Belader SUC2 kodieren, handelt es sich um Glukose-reprimierte Gene, d.h. hohe Zuckerkonzentrationen wirken sich negativ auf ihre Expression aus (Koch, 1996).



**Abbildung 3.35: Relative Expression der Zucker-reprimierten Gene *cab1* und *suc2***

Dargestellt ist der Transkriptgehalt der Zucker-reprimierten Gene *suc2* (A) und *cab1* (B) unter Kontroll- und unter Hochglukosebedingungen. Dazu wurden Blattscheibchen von einem Durchmesser von 0,7 cm über Nacht im Dunkeln in MS8-Medium oder in MS8-Medium mit 5% Glukose inkubiert. Die Daten wurden auf das *housekeeping* Gen *pp2a* normiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  SE. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ ).

Zur Analyse der Expression der Zucker-regulierten Gene *suc2* und *cab1* mittels qRT-PCR wurde RNA aus Blattscheibchen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurden die Blattscheibchen über Nacht in Standard-MS8 bzw. in Standard-MS8 mit 5% Glukose inkubiert. Die Expression der beiden Gene im Wildtyp wurde zur besseren Darstellung auf einen Wert von 1 normiert. Unter Kontrollbedingungen weisen die drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.35). Unter 5% Glukosebedingungen zeigt sich vor allem in der  $\lambda\kappa$  Knockout-Linie eine deutliche Zunahme in der Expression der beiden Gene im Vergleich zum Wildtyp. Auch die  $\kappa$  Knockout-Linie zeigt eine Zunahme der beiden

Transkripte nach Zuckerstress. Die  $\lambda$  Knockout-Linie weist eine signifikante Zunahme des *SUC2* Transkripts auf.

Die Analyse der Zucker-regulierten Gene *cab1* und *suc2* weist somit auf eine erhöhte Photosyntheseleistung bzw. auf einen erhöhten Transport von Assimilaten aus dem „Source“-ins „Sink“-Gewebe in den drei  $\lambda\kappa$  Knockout-Linien unter Hochglukosebedingungen hin.

## 4 Diskussion

Salzstress, ausgelöst durch die unsachgemäße Bewirtschaftung von Anbauflächen, stellt heutzutage eines der folgenreichsten abiotischen Umweltprobleme dar (Tester & Davenport, 2003). Vor allem das in hohen Konzentrationen im Boden vorherrschende Kation Natrium hat weitreichende Auswirkungen auf das Wachstum der vorwiegend salzsensitiven Kulturpflanzen (Park *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu dem „Makronutrient“ Kalium stellt Natrium für Pflanzen keinen essentiellen Nährstoff dar und bereits geringe Konzentrationen stellen die Pflanze vor große Schwierigkeiten. So kann Natrium das Kalium, aufgrund seiner zu Kalium sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, von den Bindestellen wichtiger Transportproteine und Enzyme verdrängen (Blumwald, 2000; Shabala & Cuin, 2008). Die dadurch veränderte intrazelluläre Ionenhomöostase hat schwerwiegende Folgen für die Pflanze, denn Kalium ist aufgrund seiner hohen intrazellulären Konzentration nicht nur das wichtigste Osmotikum in der Zelle, es aktiviert auch eine Vielzahl von Enzymen und ist u.a. an der Regulation des Zellturgors, der Stomata-Schließung, der Proteinsynthese und dem Phloem-Transport beteiligt (Wang, Zheng *et al.*, 2013; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Für den Stoffwechsel der Pflanze ist es daher von fundamentaler Bedeutung ein hohes intrazelluläres  $K^+/Na^+$ -Verhältnis aufrechtzuerhalten. Dabei liegen unter ambienten Bedingungen ca. 100 - 200 mM Kalium und 1 - 10 mM Natrium im Zytosol der pflanzlichen Zelle vor (Niu *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 2002).

Um sich vor zu hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen zu schützen, hat die Pflanze verschiedene Mechanismen entwickelt. So wird dieses Ion anhand sekundär aktiver Transportprozesse aus der Zelle exportiert oder in der Vakuole kompartimentiert (Tester & Davenport, 2003; Munns, 2005; Park *et al.*, 2016). Die an diesen Vorgängen beteiligten phylogenetisch-konservierten Transportproteine gehören der Superfamilie der Kationen-Protonen Antiporter 1 (CPA1) an (Chanroj *et al.*, 2012). Ein wichtiges Mitglied dieser Familie stellt der Plasmamembran-lokalisierte  $Na^+/H^+$ -Antiporter SOS1 dar. Dieser Transporter besteht aus 12-13 N-terminalen Transmembran-Domänen gefolgt von einer extrem verlängerten, über 700 Aminosäuren langen, C-terminalen, hydrophilen Region, die ins Zytosol ragt (Shi *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2006). Als Teil des SOS Netzwerks arbeitet der SOS1-Antiporter mit dem Calcium-Sensor Protein SOS3 und der Proteinkinase SOS2 zusammen. Hohe externe Natriumkonzentrationen lösen einen intrazellulären Calciumanstieg aus, welcher vom SOS3 Protein wahrgenommen wird. Nach Rekrutierung des SOS2-Proteins zur Plasmamembran, aktiviert der Komplex aus SOS3 und SOS2 den SOS1-Antiporter durch

Phosphorylierung am C-terminalen, regulatorischen Ende (Qiu *et al.*, 2002; Mahajan *et al.*, 2008; Quintero *et al.*, 2011). Trotz seiner enormen Länge sind bisher lediglich drei Interaktionspartner bekannt, die den SOS1 C-terminus binden und in seiner Funktion regulieren. Im Gegensatz dazu wurden bereits knapp 20 Proteine identifiziert, die mit dem menschlichen Homolog, HsNHE1 am C-terminus interagieren (Amith & Fliegel, 2013).

Die Untersuchung von Arabidopsis-Mutanten mit verändertem *SOS1*-Transkriptgehalt sollte weiterführende Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung und Regulation von SOS1, vor allem unter Salzstress liefern. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Funktion und Notwendigkeit der extrem verlängerten C-terminalen, zytosolischen Region gelegt. Weitere Interaktionspartner, die an der Feinregulation des Antiporters beteiligt sind, sollten zudem durch die heterologe Synthese von rekombinantem SOS1 C-terminus identifiziert werden.

#### **4.1 Molekulare und physiologische Charakterisierung von Pflanzen mit erhöhtem *AtSOS1 C-terminus* Transkriptgehalt**

Unter Salzstressbedingungen zeichnen sich *AtSOS1* Überexpressionspflanzen u. a. durch ein gesteigertes Wurzellängenwachstum, ein erhöhtes Frischgewicht sowie eine geringere Natriumakkumulation aus (Shi *et al.*, 2003). Dieser Effekt einer erhöhten Salztoleranz konnte durch Überexpression der N-terminalen Membrandomäne des *Triticum durum* *TdSOS1* noch verstärkt werden (Feki *et al.*, 2014). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die C-terminale Domäne eine regulatorische Funktion ausübt und dass ihr Entfernen zu einer konstitutiven Aktivierung des verbleibenden N-terminalen SOS1-Proteins führt. Die Generierung von Pflanzenlinien mit einem erhöhtem *SOS1 C-terminus* Transkriptgehalt sollte dazu dienen ein noch detaillierteres Verständnis der Regulation des SOS1-Antiporters in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) zu erlangen. Mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde zunächst der Transkriptgehalt der generierten Pflanzenlinien untersucht (Abbildung 3.1). Die drei stärksten Überexpressionslinien C1.2, C2.1 und C3.7 wiesen unter Kontrollbedingungen kaum veränderte Transkriptgehalte im Vergleich zum Wildtyp auf. Dies konnte auch schon von Shi *et al.* (2003) beobachtet werden. Auch hier wurde zur Überexpression des *AtSOS1* der sehr starke, virale Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus (CaMV-35S) verwendet. Unter Salzstressbedingungen kam es im Vergleich zum Wildtyp in den 35S:*AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien zu einer 20- bis 36-fachen Erhöhung des *SOS1 C-terminus* Transkripts im Spross und zu einer 19- bis 60-fachen Erhöhung in der Wurzel (Abbildung 3.1). Dieser Effekt lässt sich anhand der mRNA Stabilität des *SOS1*

erklären. Unter ambienten Bedingungen ist die mRNA extrem instabil und besitzt lediglich eine Halbwertszeit von circa zehn Minuten (Chung *et al.*, 2008). Erst durch Salzstress und die dadurch ausgelöste Synthese von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) steigert sich die Halbwertszeit der *SOS1* mRNA enorm. Dies gilt sowohl für den endogenen als auch für das überexprimierte Genprodukt (Shi *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2008).

Mittels qRT-PCR-Analysen wurde von mir weiterhin festgestellt, dass es in den generierten Pflanzenlinien aufgrund der Überexpression des *SOS1 C-terminus* zu keiner Cosuppression des endogenen *AtSOS1*-Transporters kam (Abbildung 3.2). Das Vorhandensein von überexprimiertem *SOS1 C-terminus* wurde anhand einer Dot blot-Analyse überprüft. Die Expression des *sos1* Gens sowie die Synthese des *SOS1*-Proteins unterliegen komplexen und streng kontrollierten Regulationsmechanismen. Da die Synthese eines derart großen Proteins für die Pflanze vergleichsweise aufwändig ist, dienen diese Regulationsmechanismen der Einsparung von zellulärer Energie. Unter ambienten Bedingungen werden die Synthese und die Aktivität des *SOS1* nur auf einem äußerst geringen, basalen Niveau gehalten. Dies spiegelt sich auch in der geringen Menge an *SOS1 C-terminus* Transkript unter Kontrollbedingungen wider (Abbildung 3.1). Ein Nachweis des überexprimierten Genprodukts unter diesen Bedingungen ist daher nicht möglich gewesen. Unter Salzstressbedingungen wurde ein deutliches Signal in der Wurzel der drei Überexpressionslinien nachgewiesen (Abbildung 3.3). Das lässt sich dadurch erklären, dass die Wurzel das Eintrittstor von Natrium-Ionen aus dem Boden darstellt. Mittels GFP-Analysen konnte die Wurzelspitze auch als Ort der höchsten *sos1* Expression identifiziert werden (Shi *et al.*, 2000; 2002). Im Spross war auf diese Weise kein Proteinnachweis möglich. Es ist festzuhalten, dass die erhöhte Menge an *SOS1 C-terminus* Transkript auch zu einer erhöhten Menge an synthetisiertem Protein führt. Die Wildtyp-Probe zeigt kein positives Signal, da diese Pflanzen nicht genetisch modifiziert wurden, konnte hier auch kein „getagtes“ Protein identifiziert werden.

Alle weiteren Untersuchungen wurden an den drei genannten *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien C1.2, C2.1 und C3.7 durchgeführt.

#### **4.1.1 Die Überexpression des *SOS1 C-terminus* führt zu einer erhöhten Salztoleranz**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Beweis erbracht, dass die Überexpression der löslichen C-terminalen Domäne des *SOS1*-Proteins zu einer erhöhten Salztoleranz dieser Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp führt. Diese Schlussfolgerung basiert auf verschiedenen



morphologischen, physiologischen und molekularen Beobachtungen, die an den untersuchten Pflanzenlinien gemacht wurden.

Einen ersten Hinweis für eine erhöhte Salztoleranz liefert die Tatsache, dass die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien unter Salzstress schneller blühten als der Wildtyp (Abbildung 3.4B). Salzstress führt in *A. thaliana* generell zu einer verzögerten Entwicklung und zu einem verspäteten Blühzeitpunkt (Achard *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Dieser negative Effekt ließ sich in allen vier Linien feststellen (Abbildung 3.4A,B). Die Zugabe von 150 mM NaCl ins Gießwasser führte zu einer deutlichen Verlängerung der vegetativen Wachstumsphase. Im Wildtyp war die Verzögerung im Blühzeitpunkt im Vergleich zu den Überexpressionslinien noch stärker ausgeprägt. Die Kontrolle des Blühzeitpunktes ist für die Pflanze von großer Bedeutung und wirkt sich auf die Produktivität sowie den Reproduktionserfolg aus (Simpson & Dean, 2002). Sie ist abhängig von endogenen sowie exogenen Faktoren. Auf molekularer Ebene wird der Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum u. a. durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors *Flowering Locus T (FT)* in Abhängigkeit von der Tageslänge reguliert (Li *et al.*, 2007). So führen Langtagbedingungen zur Induktion der Transkription des *FT* Gens. Das FT-Protein wird anschließend über das Phloem zum apikalen Sprossmeristem befördert, wo es die Blütenbildung initiiert (Mouradov *et al.*, 2002; Bäurle & Dean, 2006; Wahl *et al.*, 2013).

Die Analyse des in die Regulierung des Blühzeitpunktes involvierten Transkriptionsfaktors *FT* zeigte deutlich, dass unter Salzstressbedingungen der Transkriptgehalt von *FT* in den drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp erhöht war (Abbildung 3.4C). Der frühere Blühzeitpunkt der Überexpressionslinien kann somit auf die erhöhte Expression von *FT* zurückgeführt werden, welche letztlich in einer schnelleren Induktion der Blühphase resultiert.

Weiterhin zeigte die Analyse der Natriumgehalte in den vier Linien, dass die drei *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger Natrium in ihren Blättern anhäufen (Abbildung 3.5B). Diese Tatsache liefert einen weiteren Hinweis für eine erhöhte Salztoleranz der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien. Hohe intrazelluläre Natriumkonzentrationen stören das Ionen-Gleichgewicht der Pflanze und wirken sich auf diese Weise negativ auf den Blühzeitpunkt aus (Achard *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Somit erklären die extrem hohen Natriumgehalte im Wildtyp auch den im Vergleich zu den Überexpressionslinien verzögerten Blüheintritt. Da eine ausgeglichene Ionen-Homöostase besonders während der reproduktiven Phase von immenser Bedeutung ist, stellt die Salzvermittelte Verschiebung des Blühzeitpunktes vermutlich einen adaptiven Mechanismus dar,

der die Pflanze davor schützen soll Ressourcen zu verbrauchen bevor nicht wieder ein Ionen-Gleichgewicht herrscht (Li *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2016).

Eine Verbindung zwischen der Salzstress-Antwort und dem Blühzeitpunkt entsteht durch die Interaktion zwischen der Proteinkinase SOS2 und GIGANTEA (GI). Das GI-Protein reguliert den Eintritt in die reproduktive Phase und bildet unter ambienten Bedingungen einen Komplex mit dem SOS2-Protein (Kim *et al.*, 2013). Dieser GI:SOS2 Komplex verhindert die SOS2-vermittelte Aktivierung des SOS1-Antiporters durch Phosphorylierung. Salzstress resultiert im Abbau des GI-Proteins und der Freisetzung des SOS2-Proteins, wodurch dieses den SOS1-Transporter aktivieren kann und schließlich Natrium aus der Zelle gepumpt wird. Gleichzeitig führt der Salzstress-ausgelöste Abbau des GI-Proteins zu einer Verzögerung des Blühzeitpunktes (Kim *et al.*, 2013). Die geringeren intrazellulären Natriumkonzentrationen in den salztoleranteren *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien resultieren somit in einem geringeren Abbau des GI-Proteins, wodurch es folglich zu einer weniger drastischen Verzögerung im Blühzeitpunkt kommt.

Die Anzucht von Wildtyp-Pflanzen in steriler Flüssigkultur ergab eine Frischgewichtsreduktion von 40% unter 100 mM Salzstressbedingungen (Abbildung 3.6A,B). Im Gegensatz dazu kam es in den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien C3.7 und C1.2 zu einer Frischgewichtsreduktion von lediglich 30% bzw. 20%. Die Linie C2.1 hat unter den genannten Bedingungen 0% Biomasse verloren, hier betrug das Frischgewicht unter Kontroll- und unter Salzstressbedingungen 1,4 g. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch Betrachtung der Natriumgehalte in den verschiedenen Linien (Abbildung 3.6C). Die Überexpressionslinie C2.1 häufte im Schüttelkolben die geringste Natriumkonzentration an und zwar rund ein Drittel weniger als der Wildtyp. Da intrazelluläre Natriumkonzentrationen von 100 mM und mehr einen äußerst schädigenden Einfluss auf die Aktivität einer Vielzahl von zytosolischen Enzymen haben, löst Salzstress eine Reihe von nachteiligen Effekten in der Pflanze aus (Blumwald *et al.*, 2000). Er führt nicht nur zu einer Verzögerung des Blühzeitpunktes, sondern hat generell negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Produktivität der Pflanze (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester & Davenport, 2003). Die Fähigkeit Biomasse anzuhäufen nimmt daher umso drastischer ab je gestresster eine Pflanze ist. Somit steht die Tatsache, dass die *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien weniger in ihrem Blühverhalten beeinträchtigt sind als der Wildtyp und unter Salzstressbedingungen weniger Natrium akkumulieren in Einklang mit der höheren Biomasseproduktion.

In den Linien C1.2 und C3.7 kam es lediglich zu einer geringfügigen Reduktion im Natriumgehalt. Da es sich bei der Anzucht im Schüttelkolben um ein artifizielles System

handelt, das sich doch sehr deutlich von der Anzucht auf Erde unterscheidet, ist es nicht verwunderlich, dass es hier zu veränderten Ionenverhältnissen kommt. Weiterhin befinden sich die Pflanzen auf Erde in einer ganz anderen entwicklungsbedingten Wachstumsphase als die Pflanzen im Schüttelkolben. Auf Erde sind die Pflanzen bereits fünf Wochen alt bevor sie einem Salzstress ausgesetzt werden, sie befinden sich mitten in der vegetativen Wachstumsphase. In dieser Entwicklungsphase können veränderte Ionen-Verhältnisse am besten toleriert werden, ein ionisches Ungleichgewicht während der embryonalen bzw. der reproduktiven Phase hingegen kann zu extremen Wachstumsdefiziten führen (Park *et al.*, 2016). Bei den Pflanzen im Schüttelkolben handelt es sich jedoch um Keimlinge, die nach sieben Tagen Salzstress erfahren. Diese Pflanzen sind hauptsächlich damit beschäftigt wichtige entwicklungspezifische Merkmale auszubilden. Daher sind Schutzmechanismen, wie die SOS-Signalkaskade, gegen Natriumstress vielleicht noch nicht so ausgeprägt wie in älteren Pflanzen.

#### **4.1.1.1 Analyse und Bestätigung der erhöhten Salztoleranz in Hydrokultur**

Da weder die Anzucht auf Erde noch die Anzucht in steriler Flüssigkultur einen Aufschluss über die Ionengehalte in der Wurzel liefern können, wurden die verschiedenen Pflanzenlinien auch im hydroponischen System untersucht. Zunächst fällt auf, dass die Pflanzen auf Hydrokultur unter Kontrollbedingungen einen um die Hälfte bis um ein Drittel reduzierten Natriumgehalt aufwiesen (Abbildung 3.7A). Das liegt daran, dass der Ionen- und Nährstoffgehalt wässriger Anzuchtmedium präzise eingestellt werden kann, wohingegen Erde immer einen gewissen Anteil an Natrium-Ionen enthält. Somit gleicht die Anzucht auf Erde unter Kontrollbedingungen bereits einem Salzstress von 2,5 mM NaCl in Hydrokultur (Abbildung 3.7C). Generell enthielt die Wurzel im Vergleich zum Spross weniger Natrium-Ionen, allerdings zeigten sich hier unter Kontroll- sowie unter 2,5 mM NaCl Salzstressbedingungen keine Unterschiede zwischen den vier Pflanzen-Linien (Abbildung 3.7B,D). Die weitere Erhöhung der Natriumkonzentration im Wachstumsmedium führte in allen vier Linien zu einer sukzessiven Zunahme in der Natriumakkumulation, bis sich bei einem Natriumstress von 200 mM NaCl extreme Anzeichen von Stress erkennen ließen und alle Pflanzen-Linien einen Natriumgehalt von rund 15 mg/g FG aufwiesen (Abbildung 3.10C).

Auffallend ist, dass bei einer Konzentration von 100 mM NaCl eine deutlich reduzierte Natriumakkumulation im Spross der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien zu verzeichnen war (Abbildung 3.9A). Während der Wildtyp mehr als 3 mg Natrium/g FG im

Spross anhäufte, waren die Mutanten-Linien in der Lage ihre Natriumkonzentration zwischen 1,5 mg/g FG und 2,2 mg/g FG zu begrenzen. Das entspricht einer bis zu 50% verringerten Natriumaufnahme. Eine ähnliche Reduktion im Natriumgehalt konnten Shi *et al.* (2003) in ihren *AtSOS1* Überexpressionspflanzen feststellen, die über fünf Tage einem NaCl-Stress von 100 mM ausgesetzt waren. In der Wurzel kam es im Vergleich zum Spross lediglich in der Linie C3.7 zu einer signifikanten Abnahme im Natriumgehalt, die anderen beiden Linien zeigten aber ebenfalls niedrigere Natriumkonzentrationen (Abbildung 3.9B). Da die im Rahmen dieser Arbeit generierten *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen im Gegensatz zu den von Shi *et al.* (2003) verwendeten Linien nur die zytosolische Domäne des SOS1-Antiporters überexpressieren, können die niedrigeren Natriumkonzentrationen nicht direkt auf eine erhöhte Menge an SOS1-Transporter in der Plasmamembran der Pflanzen zurückgeführt werden. Weiterhin wurde von Núñez-Ramírez *et al.* (2012) nachgewiesen, dass das funktionelle SOS1-Protein ein Dimer ist, wobei sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne für eine erfolgreiche Interaktion und Aktivierung des Proteins nötig sind. Die Überexpression der zytosolischen SOS1 C-terminus Domäne kann also nicht direkt zu einer erhöhten Aktivität des endogenen SOS1-Antiporters durch Interaktion führen. Da die generierten Mutanten aber unter 100 mM NaCl-Bedingungen deutlich weniger Natrium akkumulierten, muss die Überexpression des C-terminus auf indirekte Weise eine erhöhte Aktivität des endogenen SOS1-Antiporters bewirken.

Diese Toleranz gegenüber Natrium ging allerdings wieder verloren, wenn man die Pflanzen höheren Natriumkonzentrationen aussetzte (Abbildung 3.10). Die hier erhobenen Daten legen somit nahe, dass die Überexpression des SOS1 C-terminus nicht zu einer generellen Verbesserung der Salztoleranz der Pflanzen führt. Extreme Natriumkonzentrationen, wie beispielsweise 150 mM und 200 mM NaCl, sind auch für diese Pflanzen weiterhin auf Dauer letal. Deutlich wird dies, wenn man sich die Kaliumkonzentrationen in den vier Linien betrachtet (Abbildung 8.1-8.4). Während ein Salzstress von 100 mM NaCl über drei Tage lediglich zu einer geringfügigen Abnahme der Kaliumkonzentration in den Wurzeln der vier Pflanzenlinien führte, resultierten 150 mM sowie 200 mM NaCl-Stress in drastisch niedrigeren Kaliumkonzentrationen in den Wurzeln. Natrium ist hier in derart hohen Konzentrationen im Medium vorhanden, dass es Kalium vermutlich gänzlich von den Bindestellen einwärts-gerichteter Transporter verdrängt (Blumwald, 2000; Shabala & Cuin, 2008). Untersuchungen an der mit *A. thaliana* verwandten Halophyte *Thelungiella halophila* haben gezeigt, dass diese ihren Natriuminflux in die Wurzel durch eine höhere  $K^+/Na^+$ -Selektivität ihrer Kaliumaufnahmesysteme gering halten. Die erhöhte Salztoleranz dieser

Pflanzen resultiert somit aus einem höheren zytoplasmatischen  $K^+/Na^+$ -Verhältnis (Wang *et al.*, 2006). Für das Überleben der Pflanze unter Salzstress und die Gewährleistung vitaler metabolischer Zellfunktionen ist es demnach von fundamentaler Bedeutung ein hohes  $K^+/Na^+$ -Verhältnis aufrechtzuerhalten (Zhu *et al.*, 1998). Die Höhe dieses Verhältnisses kann als eine Art physiologischer Indikator für Salzstress bzw. für Salztoleranz angesehen werden und gibt Aufschluss über die Fähigkeit einer Pflanze ihre zytosolische Natriumakkumulation zu minimieren und somit einem hohen Kaliumverlust vorzubeugen (Zhu *et al.*, 1998; Maathius & Amtmann, 1999; Shabala & Cuin, 2008).

Externe NaCl-Konzentrationen von 150 mM bzw. 200 mM führten in den hier untersuchten Arabidopsis-Linien dazu, dass Kalium kaum mehr in die Wurzel aufgenommen wurde bzw. aus der Wurzel verloren ging (Abbildung 8.3B und 8.4B). Da Kalium als „Makronutrient“ an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle, wie beispielsweise der Osmoregulation oder der Aktivierung von Enzymen, beteiligt ist, kommt es auf diese Weise zum Erliegen fundamentaler Stoffwechselprozesse (Wang, Zheng *et al.*, 2013). Die Pflanzen erleiden letztlich neben dem Salzstress zusätzlich noch einen Trockenstress, da sie aufgrund der extrem hohen externen NaCl-Konzentrationen kaum mehr Wasser aus dem Medium aufnehmen können und durch das Fehlen von Kalium in der Stomata-Regulation zusätzlich noch Wasser durch erhöhte Transpiration verlieren. In der Summe verdeutlichen diese Ergebnisse, dass es zur Generierung genetisch-veränderter Mutanten, die eine erhöhte Salztoleranz auf salzhaltigen Nährmedien aufweisen, folglich nicht ausreicht den regulatorischen SOS1 C-terminus in großer Menge in den Zellen zu produzieren.

Die weiteren Untersuchungen wurden bei einer Konzentration von 100 mM NaCl und einer Stressdauer von drei Tagen durchgeführt.

#### **4.1.1.2 Molekulare und metabolische Indikatoren bestätigen erhöhte Salztoleranz der *SOS1 C-terminus* Mutanten**

Die Akkumulation von Salz ruft verschiedenste Veränderungen in der pflanzlichen Zelle hervor. Sie wirkt sich nicht nur auf den Metabolismus aus, sondern führt auch zu veränderten posttranslationalen Proteinmodifikationen und zu Änderungen in der Genexpression (Munns, 2005; Munns & Tester, 2008). Zu diesen Salz-induzierten Genen zählen u. a. eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren. Ein gut charakterisiertes Beispiel stellt *WRKY25* dar, dieser Transkriptionsfaktor sorgt unter Salzstressbedingungen für die Expression spezifischer Gene, die die Salztoleranz der Pflanze erhöhen (Jiang & Deyholos, 2009; Golldack *et al.*, 2014). Die

Expressionsanalyse von *wrky25* zeigte deutlich niedrigere Transkriptgehalte sowohl im Spross als auch in der Wurzel der *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen unter 100 mM NaCl-Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.11). In der Wurzel waren die Transkriptlevel im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 60%, im Spross sogar um bis zu 80% reduziert. Der Transkriptionsfaktor *WRKY25* weist eine äußerst spezifische NaCl-Induktion seiner Expression auf und kann auf diese Weise als Indikator für Salzstress angesehen werden (Jiang & Deyholos, 2009). Die niedrigen Transkriptgehalte im Spross der Mutanten lassen sich direkt auf die niedrigeren Natriumkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp zurückführen (Abbildung 3.9A). In der Wurzel wiesen die Linien C1.2 und C2.1 ähnlich hohe Natriumgehalte auf wie der Wildtyp, die *wrky25* Expression war dennoch niedriger. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Wurzel über den Apoplast im Äquilibrium mit der umgebenden Nährlösung steht. Das in Abbildung 3.9B nachgewiesene Natrium könnte also nicht vollständig im Zytosol der C-terminus Mutanten stecken, sondern aufgrund der erhöhten SOS1-Aktivität bereits aus der Zelle gepumpt worden sein, sich demnach aber noch im Apoplasten befinden. Auf diese Weise stört es die Vorgänge in der Zelle nicht und löst auch keine übermäßige Expression des Transkriptionsfaktors *wrky25* aus.

Der Gehalt an löslichen Zuckern, Prolin und Stärke gibt ebenfalls Aufschluss über die Toleranz von Pflanzen gegenüber verschiedenen, abiotischen Stress-Stimuli (Chaves *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2013). Verschiedene Stress-Arten, wie beispielsweise Kälte-, Trocken- oder Hitzestress führen zur aktiven Synthese sogenannter „kompatibler Solute“ (Tester & Davenport, 2003; Deinlein *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016). Die löslichen Zucker, Saccharose und Fruktose, sowie die Aminosäure Prolin dienen dabei vorwiegend als Osmolyte zum Ausgleich des osmotischen Potentials innerhalb der Zelle und zur Aufrechterhaltung des Wassertransports aus dem Boden (Bohnert *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000). Ein wichtiges Kriterium dieser Substanzen ist, dass sie sich auch in hohen Konzentrationen nicht schädlich auf im Zytosol ablaufenden Reaktionen auswirken (Hu *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2016). Darüber hinaus nehmen sie wichtige Funktionen als Osmoprotektanten von Proteinen, Enzymen und Membranen ein, wirken sich als Antioxidantien positiv auf den Redox-Status der Zelle aus und nehmen als Signalmoleküle eine wichtige Rolle in der Stress-Antwort ein (Mansour, 2000; Chen & Murata, 2002; Ashraf & Foolad, 2007; Wang, Chang *et al.* 2013; Park *et al.*, 2016). Aufgrund seiner physikalisch-chemischen und molekularen Eigenschaften zeichnet sich vor allem die Aminosäure Prolin als universales Stress-Adapter-Molekül aus (Liang *et al.*, 2013). Glukose und Stärke dienen im Gegensatz dazu vermutlich vorwiegend

als Energie- und Speicherstoffe, die unter langanhaltenden Stress-Perioden als Kohlenstoff-Quelle genutzt werden (Chen & Hoehenwarter, 2015).

Salzstress führte somit in allen vier Linien zu einer Erhöhung der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose, sowie der Stärke (Abbildung 3.12). Außerdem hat auch der Gehalt an Prolin in den vier Pflanzen-Linien unter Salzstressbedingungen drastisch zugenommen, im Wildtyp beispielsweise um das 50-fache im Spross und sogar um das 90-fache in der Wurzel (Abbildung 3.13). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die *35S:AtSOS1 C-terminus* Mutanten allerdings für alle genannten Substanzen einen geringeren Wert auf. Diese Tatsache lässt sich im Fall von Prolin direkt auf die niedrigere Natriumakkumulation in den Mutanten zurückführen. Durch die geringere Konzentration von Natrium ist das osmotische Potential innerhalb der Zelle nicht so stark aus dem Gleichgewicht geraten und es müssen weniger osmotisch aktive Natrium-Ionen durch die Synthese von Prolin ausgeglichen werden. Vorausgehende Analysen an *sos1* Mutanten bestätigen diese Beobachtung und weisen eine direkte Korrelation zwischen der auftretenden Salzsensitivität der Pflanzen und dem Prolingehalt nach (Liu & Zhu, 1997). Die zwar erhöhten, aber im Vergleich zum Wildtyp niedrigeren Zucker- und Stärkegehalte der *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien stehen ebenfalls in Einklang mit der weniger inhibierten Physiologie der Mutanten und lassen sich durch Betrachtung der morphologischen Unterschiede zwischen den *35S:AtSOS1 C-terminus* Linien und dem Wildtyp erklären. Durch den verzögerten Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase im Wildtyp unter Salzstressbedingungen, kommt es zu einem Anstau von Zuckern und Stärke. Die Mutanten sind weniger gehemmt und blühen früher als der Wildtyp. Sie sind in der Lage mehr Biomasse durch die Umsetzung von Kohlenstoffen anzuhäufen (Abbildung 3.4B und 3.6B).

Die hier erhobenen Daten bestätigen somit weiter die Tatsache, dass die *35S:AtSOS1 C-terminus* Mutanten salztoleranter gegenüber einer externen NaCl-Konzentration von 100 mM sind. Die niedrigeren Konzentrationen des Salz-induzierten Gens *wrky25* und der kompatiblen Solute Saccharose, Fruktose und Prolin deuten einerseits darauf hin, dass ihr Ionen-Haushalt durch die geringere Natriumakkumulation weniger angegriffen ist. Andererseits führt das niedrigere Stressniveau in den Pflanzen zu einer erhöhten Fähigkeit vorhandene Zucker in Biomasse zu konvertieren.

## 4.2 Molekulare und physiologische Charakterisierung von *sos1* Knockout-Pflanzen

Um die morphologischen, physiologischen und molekularen Veränderungen, die in den generierten *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionslinien festgestellt und bewiesen wurden, besser einordnen zu können, wurden auch *sos1* Knockout-Pflanzen generiert. Diese Pflanzen werden durch Insertion einer T-DNA in die kodierende Sequenz des Zielgens erzeugt. Dadurch wird das entsprechende Gen nicht mehr abgelesen und folglich wird auch kein Protein mehr synthetisiert. Mittels PCR-Analyse wurden die Knockout-Pflanzen auf das Vorhandensein der T-DNA-Insertion untersucht. Es wurden zwei unabhängige, homozygote Knockout-Linien identifiziert und mittels qRT-PCR wurde der Verlust des *SOS1*-Transkripts bestätigt (Abbildung 3.14A-C).

### 4.2.1 *sos1* Knockout-Pflanzen sind sehr sensitiv gegenüber Salzstress

Knockout-Pflanzen, die kein *SOS1* Transkript mehr aufweisen, wurden bereits in früheren Arbeiten identifiziert und charakterisiert (Wu *et al.*, 1996; Liu & Zhu, 1997; Shi *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2002). Unter Kontrollbedingungen weisen diese Pflanzen keinen morphologischen Phänotyp auf, der vom Wildtyp abweicht. Salzstress resultiert jedoch in einem wesentlich stärker ausgeprägten Stress-Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Wu *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000). So zeigen *sos1* Mutanten ein stark eingeschränktes Wurzellängenwachstum sowie ein stark inhibiertes Wachstum der Rosettenblätter unter Salzstressbedingungen. Weiterhin konnten Wu *et al.* (1996) feststellen, dass die *sos1* Mutanten nicht in der Lage sind auf niedrigen Kaliumkonzentrationen zu wachsen. Diese Beobachtung erklärten die Autoren durch eine Störung im High-Affinity-Kalium-Aufnahmesystem in den Mutanten. Dieses wird im Wildtyp durch geringe externe Kaliumkonzentrationen induziert und erlaubt es den Pflanzen weiterhin aktiv Kalium aus dem Boden aufzunehmen. Hohe Natriumkonzentrationen erschweren die Aufnahme von Kalium zusätzlich durch Depolarisation des Membranpotentials und einer dadurch bedingten geringeren Permeabilität der Membran für Kalium. Durch Export von Natrium aus der Zelle hält der *SOS1*-Antiporter die Membran permeabel für Kalium (Qi & Spalding, 2004). Das Fehlen des *SOS1*-Transporters in den *sos1* Mutanten sowie das fehlerhafte High-Affinity-Kalium-Aufnahmesystem resultieren somit in einem deutlich stärker ausgeprägten Kaliummangel (Ding & Zhu, 1997; Qi & Spalding, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass der extrem salzsensitive Phänotyp der Mutanten hauptsächlich auf die im Vergleich zum Wildtyp niedrigeren Kaliumkonzentrationen zurückzuführen ist (Wu *et al.*, 1996; Ding & Zhu, 1997).



Auch für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *sos1* Knockout-Mutanten wurde ein extrem salzsensitiver Phänotyp bestätigt. Dieser ließ sich unter Langzeit-Salzstressbedingungen anhand einer drastischen Verzögerung des Blühzeitpunktes bis hin zum kompletten Ausfall der Blühphase nachweisen (Abbildung 3.15B). Weiterhin wiesen die *sos1* Knockout-Mutanten einen enormen Verlust an Biomasse und eine erhöhte Produktion von Anthocyanen auf.

Erklären lässt sich der im Vergleich zum Wildtyp später eintretende Blühzeitpunkt auch hier durch eine Analyse des Transkriptionsfaktors *Flowering Locus T (FT)*. Unter Salzstressbedingungen wiesen die beiden *sos1* Mutanten eine extrem verringerte Expression von *FT* auf, und zwar war diese um ca. 80% in der Linie *sos1-1* und sogar um ca. 90% in der Linie *sos1-2* reduziert (Abbildung 3.15C). Insgesamt fällt auf, dass die Knockout-Linie *sos1-2* im Gegensatz zur Linie *sos1-1* noch gravierender auf Salzstress reagiert (Abbildung 3.15B).

Erste physiologische Unterschiede zwischen den *sos1* Knockout-Pflanzen und dem Wildtyp wurden bereits unter Kontrollbedingungen deutlich (Abbildung 3.16A,B). Die Linie *sos1-1* akkumulierte hier die doppelte Menge Natrium/g FG im Spross und sogar die dreifache Menge in der Wurzel im Vergleich zum Wildtyp. Die Natriumgehalte in der Wurzel der Linie *sos1-2* sind hier sogar bereits um das achtfache erhöht. Auch 2,5 mM NaCl führten insgesamt zu einer Zunahme im Natriumgehalt um das zwei- bis vierfache (Abbildung 3.16C,D). Die weitere Erhöhung der externen Natriumkonzentration führte zu einer sukzessiven Zunahme der aufgenommenen Natriumkonzentrationen in allen drei Linien (Abbildung 3.17A-D), wobei die Natriumkonzentrationen in den *sos1* Knockout-Mutanten durchgängig sowohl im Spross als auch in der Wurzel höher waren als im Wildtyp. Lediglich im Fall des 25 mM NaCl-Stress ist diese Zunahme im Spross nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die plötzliche extreme Erhöhung in der Natriumakkumulation im Wildtyp von 2,5 mM auf 25 mM NaCl um das achtfache auf 840 µg/g FG sein. Im Gegensatz dazu verzeichnen die *sos1* Knockout-Linien lediglich eine 5- bzw. 3,5-fache Erhöhung, da ihre Ausgangskonzentration bereits höher war.

Insgesamt stehen die hier erhobenen Daten für die Natriumgehalte in den *sos1* Knockout-Mutanten im Einklang mit früheren Arbeiten (Ding & Zhu, 1997; Shi *et al.*, 2002). Unter milden Salzstressbedingungen von 25 mM NaCl wurden in den genannten Arbeiten sogar niedrigere Natriumkonzentrationen im *sos1* Keimling bzw. im Spross von *sos1* Mutanten nachgewiesen. Auch hier geht dieser Phänotyp unter 100 mM NaCl-Bedingungen wieder verloren und die *sos1* Mutanten akkumulieren nun im Spross sowie in der Wurzel mehr Natrium als der Wildtyp (Shi *et al.*, 2002). Die Autoren führten diesen Effekt auf eine duale

Funktion des SOS1-Transporters bei der Xylem-Natrium-Beladung und -Natrium-Resorption zurück. Da das *sos1*-Gen die höchste Expression in der Wurzelspitze und entlang der Xylem-Gefäße aufweist und sich unter Salzstressbedingungen höhere Natriumkonzentrationen im Xylem-Saft der *sos1* Mutanten nachweisen lassen, wird hier von einer Beteiligung des SOS1-Antiporters in der Kontrolle der Xylem-Be-/Entladung ausgegangen (Shi *et al.*, 2002). Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass der SOS1 unter mildem Salzstress an der kontrollierten Beladung des Xylems in der Wurzel mit Natrium-Ionen beteiligt ist. Im Spross angekommen, werden diese mithilfe der NHX-Transporter in der Vakuole verstaubt. Die aktive Beladung des Xylems mit Natrium im Austausch für ein Proton, wird durch den sauren pH-Wert in den Xylem-Gefäßen begünstigt (Fisher, 2000). Steigt die externe Natriumkonzentration an und kommt es somit zu einem Natriumanstau in der Wurzel und einem höheren Natriumtransport in den Spross, limitiert der SOS1-Transporter nun die Aufnahme von Natrium ins Xylem, um die oberirdischen, photosynthetisch-aktiven Organe vor schädigenden Natriumkonzentrationen zu schützen (Shi *et al.*, 2002). Diese Resorption von Natrium aus dem Xylem-Saft scheint in Zusammenhang mit einer Zunahme der Kaliumkonzentration im Xylem zu stehen. Somit könnte die Energie für die Resorption von Natrium aus dem sauren Xylem-Saft durch Kopplung mit einem  $K^+/H^+$ -Antiport und  $H^+$ /Anionen-Symport geliefert werden. Diese Hypothese würde auch die Tatsache erklären, dass *sos1* Mutanten nicht auf Böden mit niedriger Kaliumverfügbarkeit wachsen können. Ein funktionaler SOS1, der Natrium-Ionen aus dem Xylem resorbiert, wäre dann nämlich nötig, um eine Beladung des Xylems mit Kalium zu ermöglichen (Shi *et al.*, 2002).

Die weiteren Untersuchungen wurden bei einer Konzentration von 100 mM NaCl und einer Stressdauer von drei Tagen durchgeführt.

Die Kaliumkonzentration in den *sos1* Knockout-Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp vor allem in der Wurzel reduziert (Abbildung 3.18B). Diese waren um die Hälfte bis um ein Drittel niedriger. Wie bereits erwähnt, wird davon ausgegangen, dass sich die extreme Salzsensitivität der *sos1* Knockout-Mutanten vorwiegend auf geringere intrazelluläre Kaliumkonzentrationen zurückführen lässt. Diese niedrigen Kaliumkonzentrationen werden wiederum durch die höheren extra- sowie intrazellulären Natriumkonzentrationen bedingt. Auf diese Weise entsteht ein ungünstiges  $K^+/Na^+$ -Verhältnis in den *sos1* Knockout-Mutanten (Zhu, 2002; Shabala & Cuin, 2008). Da ein hohes  $K^+/Na^+$ -Verhältnis als Indikator für die Salztoleranz einer Pflanze dient, ist es nicht verwunderlich, dass vitale Zellfunktionen in den *sos1* Knockout-Mutanten unter Salzstressbedingungen früher zum Erliegen kommen und die

Pflanzen daher eine höhere Salzsensitivität aufweisen (Zhu *et al.*, 1998; Maathius & Amtmann, 1999).

#### **4.2.1.1 Molekulare und metabolische Indikatoren bestätigen erhöhte Salzsensitivität der *sos1* Knockout-Mutanten**

Einen molekularen Indikator für den in der Zelle herrschenden Salzstress liefert die Expression des Salz-induzierten Transkriptionsfaktors *WRKY25*. Dieser sorgt unter Salzstressbedingungen für die Expression spezifischer Gene, die die Salztoleranz der Pflanze erhöhen und gibt gleichzeitig Aufschluss über das Stresslevel in der Zelle (Jiang & Deyholos, 2009; Golldack *et al.*, 2014). Die Expressionsanalyse von *wrky25* zeigte extrem erhöhte Transkriptgehalte in der Wurzel der *sos1* Knockout-Pflanzen unter 100 mM NaCl-Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.19B). Salzstress führte hier zu einer bis zu 50-fachen Zunahme der *WRKY25*-mRNA. Diese sehr hohen Transkriptgehalte in den Mutanten stehen in direktem Zusammenhang mit den hohen Natriumkonzentrationen und vor allem den niedrigen Kaliumkonzentrationen in der Wurzel im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.17D und 3.18B). Im Spross waren die Transkriptlevel im Vergleich zum Wildtyp um das 3,5-fache bzw. um das 6,8-fache höher als im Wildtyp (Abbildung 3.19A). Auch hier stehen die hohen Transkriptgehalte in den Mutanten in direktem Zusammenhang mit den hohen Natriumkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.17C). Die Tatsache, dass die Steigerung des *WRKY25*-Transkripts im Spross nicht so extrem ausfällt wie in der Wurzel, könnte an dem hier bestehenden besseren  $K^+/Na^+$ -Verhältnis liegen (Abbildung 3.17C,D und 3.18A,B).

Die Pflanze reagiert auf Salzstress mit der aktiven Synthese sogenannter „kompatibler Solute“ (Tester & Davenport, 2003; Deinlein *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016). So steigen als metabolische Antwort auf Salzstress die Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke im Wildtyp sowie in den *sos1* Knockout-Mutanten an (Chaves *et al.*, 2009). Die löslichen Zucker, Saccharose und Fruktose, dienen als Osmolyte zum Ausgleich des osmotischen Potentials innerhalb der Zelle (Bohnert *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000). Glukose und Stärke dienen vermutlich vorwiegend als Energie- und Speicherstoffe, die unter langanhaltenden Stress-Perioden als Kohlenstoff-Quelle genutzt werden (Chen & Hoehenwarter, 2015). Auffällig ist, dass die Linie *sos1-2* vorwiegend Kohlenstoff in Form der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose anhäufte, und zwar jeweils mindestens doppelt so viel wie der Wildtyp (Abbildung 3.20A-C). Stärke akkumulierte diese Linie dagegen genauso viel wie der

Wildtyp unter Salzstressbedingungen. Im Gegensatz dazu kam es in der Linie *sos1-1* zu einer enormen Zunahme der Stärkekonzentration um das 3-fache mehr im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.20D). Bei den löslichen Zuckern staute sich lediglich eine erhöhte Konzentration an Glukose an. Die anderen Zucker blieben unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Generell lässt sich somit festhalten, dass es in den *sos1* Knockout-Pflanzen unter Salzstressbedingungen zu einer höheren Akkumulation von Kohlenhydraten in Form von löslichen Zuckern und Stärke kommt. Der Unterschied, der sich vor allem bezüglich der Saccharose- bzw. der Stärkekonzentrationen beobachten ließ, könnte sich vermutlich auf die etwas stärker ausgeprägte Salzsensitivität der *sos1-2* Knockout-Linie zurückführen lassen, die sich bereits im Blüh-Phänotyp sowie in der *wrky25*-Expression erkennen ließ (Abbildung 3.15B und 3.19). Vielleicht führt diese stärker ausgeprägte Salzsensitivität in den *sos1-2* Pflanzen dazu, dass die angestaute Stärke schneller zum Zweck des osmotischen Ausgleichs in die osmotisch aktiven Mono- und Disaccharide gespalten wird und somit zum Zeitpunkt der Messung bereits gespalten vorliegt. In der Linie *sos1-1* findet diese Stärkespaltung womöglich etwas zeitverzögert statt und war zum Zeitpunkt der Messung noch nicht abgeschlossen.

Der Wurzellängenphänotyp steht ebenfalls im Einklang mit vorher beschriebenen Arbeiten (Wu *et al.*, 1996). Der Knockout des *sos1* Gens führte zu einem extrem eingeschränkten Wurzellängenwachstum auf 100 mM NaCl aufgrund deutlich erhöhter Natriumkonzentrationen und deutlich reduzierter Kaliumkonzentrationen in den Wurzeln der Knockouts im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.21). Als Indikator für Salztoleranz steht die Wurzellänge demnach in direktem Verhältnis zum Kaliumgehalt in den Wurzeln (Zhu *et al.*, 1998). Da die *35S:AtSOS1 C-terminus* Mutanten einen ähnlich hohen Kaliumgehalt wie der Wildtyp aufwiesen, waren auch ihre gemessenen Wurzellängen vergleichbar mit dem Wildtyp.

### **4.3 *AtSOS1* C-terminus interagiert mit den *At14-3-3* Proteinen $\nu$ , $\omega$ , $\lambda$ und $\kappa$**

Mittels Pulldown-Assay wurden im Rahmen dieser Arbeit mögliche Interaktionspartner des *SOS1* C-terminus identifiziert. Da diese Methode eine hohe Anzahl an falsch positiven aber auch falsch negativen Ergebnissen liefern kann, wurden die gefundenen Interaktionen zwischen dem *AtSOS1* C-terminus und den *At14-3-3* Proteinen mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation (BiFC), sowie Peptid-Spot Analyse verifiziert (Abbildung 3.25A-D und 3.27B). Die BiFC-Methode dient nicht nur zum Nachweis einer Interaktion

zwischen zwei Proteinen *in planta*, sondern erlaubt auch die Einschätzung ihrer Intensität. Ein Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass sich einmal gebildete BiFC-Komplexe nur schwer wieder voneinander lösen. Deshalb ist es mit dem BiFC-Verfahren nicht möglich, räumliche und zeitliche Dynamiken von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu analysieren (Hu *et al.*, 2002; Kerppola, 2008).

Bei den pflanzlichen 14-3-3 Proteinen handelt es sich um regulatorische Proteine, die Phospho-Proteine in ihrer Funktion und Aktivität modulieren (Sehnke *et al.*, 2002a; Roberts, 2003). Dabei binden sie an bestimmte, konservierte Aminosäuresequenzen, welche in den meisten Fällen ein phosphoryliertes Serin sowie ein Arginin und ein Prolin enthalten: RSxpSxP, RSxxpSxP und YpT (Dubois *et al.*, 1997a; Yaffe *et al.*, 1997; Ferl *et al.*, 2002). Jedoch binden 14-3-3 Proteine auch Interaktionspartner ohne diese konservierten Motive und sogar Phosphorylierungs-unabhängige Interaktionen wurden in der Zwischenzeit identifiziert (Wang *et al.*, 1999; Fuglsang *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2012). Die 14-3-3 Proteine erschienen als äußerst vielversprechende Kandidaten für eine Interaktion mit dem SOS1 C-terminus, da gleich fünf Isoformen ( $\omega$ ,  $\phi$ ,  $\kappa$ ,  $\nu$  und  $\nu$ ) unter den 15 häufigsten Proteinen im Pulldown-Assay gefunden wurden (Tabelle 8.1). Weiterhin wurde eine Verbindung zwischen den 14-3-3 Proteinen  $\kappa$  und  $\lambda$  und dem SOS Netzwerk bereits von Zhou *et al.*, (2014) nachgewiesen. Diese fungieren als negative Regulatoren des SOS-Signalwegs, indem sie den SOS2 unter ambienten Bedingungen durch Bindung der sogenannten „junction“-Domäne inhibieren. Zudem wurden 14-3-3 Proteine in tierischen Zellen bereits als Interaktionspartner des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters *HsNHE1* identifiziert und bestätigt (Lehoux *et al.*, 2001). Eine mögliche Interaktion zwischen dem SOS1 und den 14-3-3 Proteinen wurde außerdem bereits von Quintero *et al.* (2011) postuliert. Die Autoren identifizierten das Serin1138 am Ende des zytosolischen C-terminus des SOS1 als Phosphorylierungsstelle der SOS2-Proteinkinase. Die Aminosäuresequenz <sup>1133</sup>RIDSPpSK<sup>1139</sup> wurde als putatives 14-3-3 Sequenzmotiv vorgeschlagen (Quintero *et al.*, 2011).

Um nun die Interaktion zwischen dem SOS1 und den 14-3-3 Proteinen zu verifizieren, wurde der *AtSOS1* C-terminus mit dem N-terminalen Fragment und die vier 14-3-3 Proteine  $\nu$ ,  $\omega$ ,  $\nu$  und  $\kappa$  jeweils mit dem C-terminalen Fragment des YFP fusioniert und transient in *N. benthamiana* transformiert. Die Coexpression aus SOS1 C-terminus und 14-3-3 Protein resultierte in allen vier Fällen in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.25A-D). Diese Beobachtung weist auf eine Interaktion zwischen dem *AtSOS1* und den vier 14-3-3 Proteinen  $\nu$ ,  $\omega$ ,  $\nu$  und  $\kappa$  *in planta* hin. Am stärksten scheint die Interaktion zwischen dem SOS1 und dem 14-3-3  $\nu$  zu sein (Abbildung 3.25A).

Während die Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen und dem *HsNHE1* in tierischen Zellen anhand der typischen, konservierten Serin-Bindestelle RSXpS<sub>730</sub>XP stattfindet, bindet das 14-3-3  $\omega$  Protein in pflanzlichen Zellen die nicht-kanonische Sequenz <sup>1112</sup>TRQNTMVESSDEEDEDEG<sup>1129</sup> des SOS1 C-terminus in nicht-phosphorylierter Form (Lehoux *et al.*, 2001; Abbildung 3.27B). Das von Quintero *et al.* (2011) vorgeschlagene Sequenzmotiv <sup>1133</sup>RIDSPpSKIV<sup>1141</sup> wird gemäß meiner Befunde nicht gebunden. Auch die Mutation von Serin1138 zu Aspartat, welche durch die negative Ladung eine Phosphorylierung simuliert, führte hier zu keiner Bindung des 14-3-3  $\omega$  mit dem SOS1. Obwohl 14-3-3 Proteine vorwiegend phosphorylierte Interaktionspartner binden, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Beweis erbracht, dass das 14-3-3  $\omega$  Protein im Fall des SOS1-Antiporters das nicht-phosphorylierte Sequenzmotiv <sup>1112</sup>TRQNTMVESSDEEDEDEG<sup>1129</sup> bindet (Abbildung 3.27B). Diese Sequenz beinhaltet neben zwei Serin-Resten vor allem Aspartat-(D) und Glutamat-(E)-Reste. Die negativen Ladungen dieser beiden Aminosäurereste sind vermutlich in der Lage die Phosphat-Gruppe des Phospho-Serins zu imitieren und auf diese Weise die Phosphat-Gruppe innerhalb eines kanonischen Bindemotivs zu ersetzen (Wang *et al.*, 1999). Auch im Fall der Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen  $\lambda$  und  $\kappa$  und der SOS2-Proteinkinase tritt die Bindung an einer solchen nicht-konservierten Aminosäuresequenz auf (Zhou *et al.*, 2014). Zwölf der 41 Aminosäuren innerhalb der „junction“-Domäne des SOS2 sind negativ geladene Aspartat- bzw. Glutamat-Reste und imitieren wohl auch hier die negative Ladung einer Phosphat-Gruppe. Weiterhin konnten Zhou *et al.* (2014) feststellen, dass die Phosphorylierung des Serin295 innerhalb der „junction“-Domäne die Bindung zwar verstärkt, aber nicht essentiell für deren Auftreten ist. Da die „junction“-Domäne des SOS2, welche den regulatorischen, auto-inhibitorischen C-terminus mit der N-terminalen Kinase-Domäne verbindet, erforderlich für die Aktivität der Kinase ist, unterdrückt die Bindung der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  an dieser Stelle die Aktivität des SOS2 (Guo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2014).

#### **4.4 *AtSOS1* C-terminus interagiert mit CPK3**

Der durchgeführte Pulldown-Assay mit Rohextrakt von salzgestressten Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen lieferte neben anderen Proteinen drei Calcium-abhängige Proteinkinasen, CPK3, CPK4 und CPK11, als mögliche Interaktionspartner des SOS1 C-terminus unter Salzstressbedingungen (Tabelle 8.2). Es gibt 34 Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPK) in *A. thaliana*, die anhand von Sequenz-Ähnlichkeiten und -Unterschieden in vier Untergruppen eingeteilt werden (Hrabak *et al.*, 2003). Neben einer katalytischen und einer auto-

inhibitorischen Domäne zeichnen sich alle CPK-Kinasen durch den Besitz einer C-terminalen Calcium-bindenden, regulatorischen Domäne aus (Hrabak *et al.*, 1996; Hrabak *et al.*, 2003). Zahlreiche extrazelluläre Stressstimuli, wie beispielsweise Kälte und Trockenheit lösen eine Veränderung in der intrazellulären Calciumkonzentration von Pflanzen aus (Cheng *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 2004). Die CPK-Kinasen entschlüsseln diese Calcium-Signale und übersetzen sie in zelluläre Antworten. Dies kann entweder direkt durch die Aktivierung von Proteinen und Enzymen durch Phosphorylierung geschehen oder indirekt durch die Veränderung im Expressionsmuster der Zelle (Sathyanarayanan & Poovaiah, 2004). Ein zytosolischer Calcium-Anstieg gehört auch zu den ersten zellulären Reaktionen, die als Antwort auf extrazellulären Salzstress folgen (Knight *et al.*, 1997). Da für die CPK3 bereits eine Interaktion mit den 14-3-3 Proteinen  $\nu$  und  $\omega$  aufgedeckt werden konnte und *cpk3* Knockout-Mutanten einen deutlich beeinträchtigten Keimungs-Phänotyp unter Salzstressbedingungen aufweisen, wurde die CPK3 als vielversprechender Bindepartner eingestuft (Mehlmer *et al.*, 2010). Diese Interaktion wurde *in planta* mittels BiFC verifiziert (Abbildung 3.26). Dazu wurde der *AtSOS1* C-terminus mit dem C-terminalen Fragment und die CPK3-Proteinkinase mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert und transient in *N. benthamiana* transformiert. Die Coexpression aus diesen beiden Proteinen resultierte in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.26). Diese Beobachtung weist auf eine Interaktion zwischen dem *AtSOS1* und der *AtCPK3* *in vivo* hin.

Calcium-Signale stellen den zentralen Regulationsmechanismus zahlreicher Stressausgelöster Signalkaskaden dar (Zhu, 2002). So wird auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SOS-Signalweg durch einen intrazellulären Calcium-Anstieg induziert (Mahajan *et al.*, 2008). Ähnlich wie das Calcium-Sensor-Protein SOS3 besitzt auch die u. a. im Zytosol lokalisierte CPK3 eine N-terminale Myrestylierungs-Domäne zur Membran-Assoziierung mit dem Tonoplast oder der Plasmamembran (Mehlmer *et al.*, 2010). *In vitro* konnte eine Stress-induzierte Expression der CPK3 als Antwort auf Kälte-, Salz-, Hitze- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress nachgewiesen werden. *In planta* scheint die CPK3 hingegen konstitutiv aktiv zu sein, sowohl im Blatt- als auch vor allem im Wurzelgewebe (Mehlmer *et al.*, 2010). Nach Salzstress konnten die Autoren jedoch keine Veränderung im Expressionsmuster bekannter Salz-induzierter Gene in *cpk3* Knockout-Mutanten feststellen. Die Analyse des Phosphorylierungsmusters in den *cpk3* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels 2D-Phospho-Proteom-Analyse lieferte eine Erklärung für den Salz-sensitiven Phänotyp der *cpk3* Mutanten (Mehlmer *et al.*, 2010). Unter den gefundenen Phosphorylierungs-Partnern der CPK3 befanden sich u. a. die drei 14-3-3 Proteine  $\nu$ ,  $\omega$  und  $\psi$ , drei PP2C-Typ

Proteinphosphatasen, eine Proteinkinase und verschiedene Ionenkanäle (Mehlmer *et al.*, 2010). Die Autoren schlussfolgerten aus den von ihnen erhobenen Daten, dass die CPK3-Kinase als Antwort auf erhöhte Salzkonzentrationen Membran-assoziierte Proteinkomplexe sowie regulatorische Proteine durch Phosphorylierung reguliert und somit an der unmittelbaren Stressantwort durch posttranslationale Modifikation beteiligt ist (Mehlmer *et al.*, 2010; Schweighofer & Meskiene, 2015).

#### 4.5 Zusammenfassung und Hypothese der Regulation am SOS1 C-terminus

Als sessile Organismen müssen sich Pflanzen den gegebenen Umweltbedingungen anpassen. Sie nutzen dazu ein Netzwerk aus komplexen, reversiblen regulatorischen Prozessen und Vorgängen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem SOS1 und den regulatorischen 14-3-3 Proteinen  $\nu$ ,  $\omega$ ,  $\lambda$  und  $\kappa$  bestätigt. Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die 14-3-3 Proteine durch den überexprimierten SOS1 C-terminus gebunden und weggefangen werden. Da die *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen salztoleranter sind als der Wildtyp, muss es sich wohl um Inhibitoren des SOS-Signalwegs handeln, die durch Bindung an den überexprimierten C-terminus nicht mehr in der Lage sind ihre inhibierende Funktion auszuüben. Tatsächlich wurden die 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  bereits von Zhou *et al.* (2014) als Inhibitoren des SOS-Netzwerks identifiziert. Unter ambienten Bedingungen unterdrücken die 14-3-3 Proteine die Aktivität der SOS2-Kinase durch Bindung der sogenannten „junction“-Domäne. Diese Domäne befindet sich zwischen dem regulatorischen, auto-inhibitorischen C-terminus und der N-terminalen Kinase-Domäne und ist erforderlich für die Aktivität des SOS2-Proteins (Guo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2014). Salzstress führt durch Dissoziation der 14-3-3 Proteine zur Freisetzung der SOS2-Kinase, welche nun im Komplex mit SOS3 den SOS1-Antiporter phosphorylieren und aktivieren kann (Mahajan *et al.*, 2008). Demnach sind die 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten salztoleranter als der Wildtyp, da das Fehlen der inhibierenden Wirkung in einer verstärkten Aktivierung der SOS2-Proteinkinase und somit auch des SOS1-Transporters resultiert (Zhou *et al.*, 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen sind ebenfalls toleranter gegenüber Salzstress als der Wildtyp. Durch die Bindung von löslichen, regulatorischen Interaktionspartnern greift der in größerer Menge in den transgenen Pflanzen vorhandene, rekombinante SOS1 C-terminus in die Regulation der SOS-Signalkaskade ein. Die erhöhte Aktivität des endogenen SOS1-Antiporters könnte demnach auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass ein Teil der inhibierenden 14-3-3 Proteine nicht mehr mit der



SOS2-Kinase interagieren, was zu einer erhöhten Aktivität des SOS2-Proteins in den Mutanten führt. Eine erhöhte Aktivität des SOS2 hat dann schließlich auch eine erhöhte Aktivität des SOS1 zur Folge. Somit gleicht der salztolerantere Phänotyp der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionsmutanten in gewisser Weise dem für die  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten beschriebenen Phänotypen.

Die Tatsache, dass meine Befunde auch eine Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen und dem SOS1-Transporter direkt bestätigen, könnte ein Hinweis für eine übergeordnete Rolle der 14-3-3 Proteine im SOS-Signalweg sein. Demnach könnte der SOS1-Antiporter durch Bindung der 14-3-3 Proteine ähnlich wie der SOS2 in einer Art Ruhezustand gehalten werden solange kein Salzstress herrscht (Zhou *et al.*, 2014). Salzstress führt dann durch Dissoziation der Interaktion mit den 14-3-3 Proteinen nicht nur zur Aktivierung der SOS2-Kinase, sondern auch des SOS1-Transporters. Verantwortlich für die Dissoziation des SOS1:14-3-3 Komplexes könnte die Aktivität der Salzstress-induzierten CPK3-Kinase sein. So konnte gezeigt werden, dass die CPK3-vermittelte Phosphorylierung des 14-3-3  $\zeta$  an Serin58 zur Monomerisierung des Dimers führt und auf diese Weise im Funktionsverlust des 14-3-3 Proteins resultiert (Woodcock *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*, 2013). Das Serin58 ist hochkonserviert und ist in allen 14-3-3 Proteinen mit Ausnahme von 14-3-3  $\lambda$  und 14-3-3  $\kappa$  zu finden (Lachaud *et al.*, 2013). Die CPK3-Kinase interagiert neben dem 14-3-3  $\zeta$  auch mit den bereits genannten Isoformen  $\omega$  und  $\upsilon$ , und weiterhin mit den 14-3-3 Isoformen  $\psi$ ,  $\varepsilon$  und  $\chi$  (Mehlmer *et al.*, 2010; Lachaud *et al.*, 2013; Swatek *et al.*, 2014). Diese Beobachtung könnte somit als Erklärung für die Salzstress-ausgelöste Dissoziation der 14-3-3  $\omega$  und  $\upsilon$  Dimere vom SOS1 dienen. Die Isoformen 14-3-3  $\lambda$  und  $\kappa$  besitzen zwar nicht das konservierte Serin an Position 58, Swatek *et al.* (2014) konnten insgesamt aber sieben Phosphorylierungsstellen innerhalb der 14-3-3 Proteine identifizieren. Einige davon sind bei allen 14-3-3 Isoformen konserviert, andere scheinen Isoform-spezifisch zu sein. So könnte im Fall von 14-3-3  $\lambda$  und  $\kappa$  eine andere Phosphorylierungsstelle verantwortlich für den Zerfall des Dimers sein oder aber 14-3-3  $\lambda$  und  $\kappa$  bilden Heterodimere mit einer Isoform, die über das genannte Serin58 verfügt. Es wäre aber auch möglich, dass die Phosphorylierung der CPK3 am SOS1-Protein eine Konformationsänderung auslöst und auf diese Weise zur Ablösung der 14-3-3 Dimere führt. Dass es unter Salzstress zur Dissoziation des SOS1:14-3-3 Komplexes kommt, wird dadurch belegt, dass im Rahmen dieser Arbeit unter Salzstressbedingungen keine 14-3-3 Proteine als mögliche Interaktionspartner im Pulldown-Assay gefunden wurden (Tabelle 8.2). Allerdings wurden die für den Rohextrakt verwendeten Pflanzen über fünf Tage einem Salzstress von 400 mM NaCl ausgesetzt. Das ist ein enormer Salzschock für die Pflanzen. Unter natürlichen

Bedingungen erhöht sich die Salzkonzentration im Boden normalerweise kontinuierlich (Park *et al.*, 2016). Es ist also möglich, dass *in vivo* erst moderate Salzkonzentrationen zu einer Ablösung der 14-3-3 Proteine vom SOS1 führen.

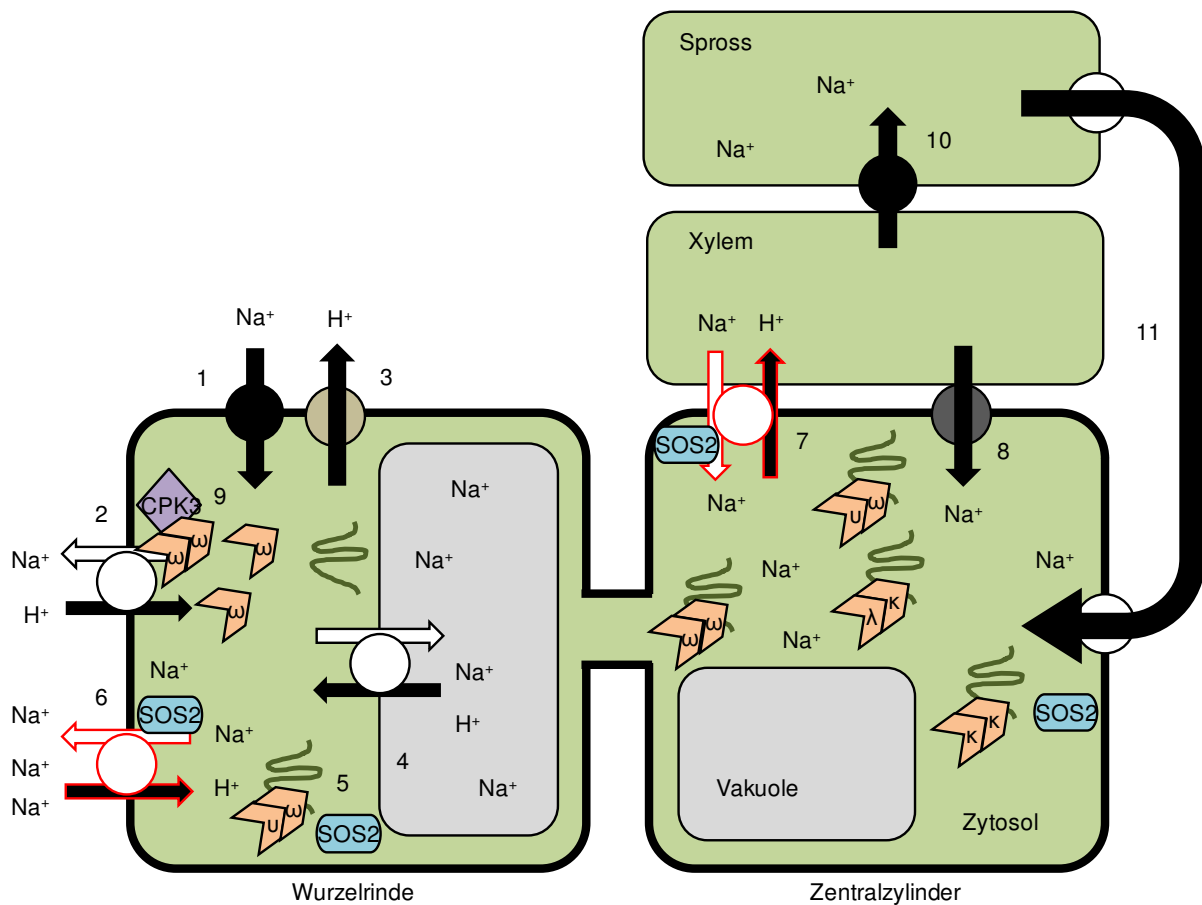
Die durch das Wegfangen der 14-3-3 Proteine erhöhte Aktivität des endogenen SOS1-Transporters resultiert schließlich in einer erhöhten Salztoleranz der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen, welche sich besonders bei einer NaCl-Konzentration von 100 mM äußert. Die Mutanten zeichnen sich unter diesen Bedingungen durch verschiedene Eigenschaften aus, die eine erhöhte Salztoleranz bestätigen. So wiesen die Überexpressionslinien i) eine geringere Akkumulation von Natrium im Spross (Abbildung 3.9A), ii) reduzierte Transkriptgehalte des Salz-induzierten Transkriptionsfaktors *WRKY25* (Abbildung 3.11), iii) geringere Konzentrationen der löslichen Zucker Glukose, Fruktose, Saccharose, sowie Stärke (Abbildung 3.12), iv) eine geringere Akkumulation des kompatiblen Soluts Prolin im Spross (Abbildung 3.13B) und v) eine weniger verzögerte Blühinduktion im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.4B,C).

Im genauen Gegensatz dazu stehen die hier erhobenen Befunde bezüglich der Salzsensitivität der *sos1* Knockout-Pflanzen. Das Fehlen des SOS1-Antiporters führt in diesen Mutanten zu i) einer höheren Akkumulation von Natrium im Spross und in der Wurzel (Abbildung 3.16 und 3.17), ii) einem erhöhten Transkriptgehalt des Salz-induzierten Transkriptionsfaktors *WRKY25* (Abbildung 3.19), iii) größeren Mengen der löslichen Zucker Glukose, Fruktose, Saccharose, sowie Stärke (Abbildung 3.20), iv) einer geringeren Konzentration des „Makronutrients“ Kalium in der Wurzel (Abbildung 3.18B) und v) einer stark verzögerten Blühinduktion im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.15B,C). Durch dieses gegensätzliche Verhalten der *sos1* Knockout-Mutanten im Vergleich mit den *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen bestätigen diese Befunde weiterhin die Beobachtung, dass die erhöhte Salztoleranz der Überexpressionsmutanten auf eine erhöhte Aktivität des SOS1-Antiporters zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, dass es unter niedrigen NaCl-Konzentrationen bis 25 mM zu keiner geringeren Natriumakkumulation im Spross der *35S:AtSOS1 C-terminus* Überexpressionspflanzen kommt, lässt sich durch die Stabilität der *SOS1* mRNA erklären. Diese besitzt unter Kontrollbedingungen lediglich eine Halbwertszeit von ca. zehn Minuten. Unter Salzstressbedingungen nimmt die Stabilität dann proportional zur externen NaCl-Konzentration zu (Shi *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2008). Somit könnte die geringere Menge an überexprimiertem SOS1 C-terminus, die bei einer Konzentration von 25 mM NaCl in den transgenen Pflanzen vorliegt, nicht ausreichen, um genügend inhibierende Interaktionspartner

vom SOS-Netzwerk abzufangen. Zu hohe externe NaCl-Konzentrationen führen im Gegensatz dazu über eine ausgeprägte Kalium-Defizienz in allen vier Pflanzenlinien zu einer extremen Salzsensitivität (Abbildung 8.3 und 8.4). Weiterhin würde auch die von Quintero *et al.* (2002) aufgestellte Hypothese diese Beobachtungen erklären. Sie postulierten, dass der SOS1-Antiporter bei mildem Salzstress (25 mM NaCl) für die Beladung der Xylem-Gefäße verantwortlich ist, während hohe externe Salzkonzentrationen (100 mM NaCl) dazu führen, dass der SOS1 nun die Xylem-Beladung durch Resorption von Natrium aus dem Xylem-Strom limitiert. Auf diese Weise wird gleichzeitig der Kaliumtransport über das Xylem in den Spross erhöht (Shi *et al.*, 2002). Da ein hohes  $K^+/Na^+$ -Verhältnis besonders im Spross als phytophysiologischer Indikator für die Salztoleranz angesehen wird, liefert diese Hypothese ebenfalls ein Indiz für die erhöhte Salztoleranz der *35S:AtSOS1 C-terminus* Mutanten (Zhu *et al.*, 1998). Somit würde der endogene SOS1, welcher in den Überexpressionspflanzen durch seltener auftretende, inhibierende Wechselwirkungen des SOS-Netzwerks mit den 14-3-3 Proteinen aktiver ist, einerseits mehr Natrium über die Plasmamembran aus der Wurzel in den Apoplasten pumpen und andererseits mehr Natrium aus dem Xylem-Saft resorbieren (Abbildung 4.1). Beide genannten Prozesse führen dann zu einer niedrigeren Natriumkonzentration im Spross der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die erhöhte Resorption von Natrium aus dem Xylem führt vermutlich dazu, dass die Natriumgehalte in der Wurzel nur geringfügig niedriger sind als im Wildtyp. Oder aber die Tatsache, dass Natrium, welches aus dem Zytosol der Wurzelzellen gepumpt wird, weiterhin im Apoplast der Wurzel verweilt, wo es metabolische Zellfunktionen nicht stört.

Da jedoch weder die genaue Menge an rekombinantem SOS1 C-terminus noch die exakten Mengen an 14-3-3 Proteinen in Arabidopsis-Zellen bekannt sind, kann hier keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob der Anteil an 14-3-3 Proteinen, der durch den überexprimierten C-terminus weggefangen wird, ausreicht, um den SOS-Signalweg in seiner Funktion zu beeinflussen.



**Abbildung 4.1: Hypothese des Natriumstroms von der Wurzel in den Spross**

Modell des Natriumstroms von der Wurzel in den Spross unter Berücksichtigung der Regulation des SOS1 am zytosolischen C-terminus durch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Interaktionen. Natrium gelangt passiv, vorwiegend wahrscheinlich über sogenannte Nicht-Selektive-Kationen-Kanäle (NSCCs) in die Wurzel (1). Natrium, welches sich im äußeren Teil der Wurzel anhäuft, wird vermutlich wieder zurück in das umgebende Medium gepumpt, durch Antiporter wie den SOS1 (2). Energetisiert wird der Export von Natrium durch den Protonengradienten über der Plasmamembran. Dieser Gradient wird durch die Funktion von  $\text{H}^+$ -ATPasen aufrechterhalten (3). Weiterhin kann Natrium auch durch die tonoplastidären NHX-Transporter in der Vakuole sequestriert werden (4). Unter Kontroll- und vermutlich auch unter moderaten Salzkonzentrationen werden die SOS2-Kinase und der SOS1-Antiporter von 14-3-3 Dimeren gebunden und inhibiert. Der in den *35S::AtSOS1 C-terminus* Mutanten vorliegende zytosolische SOS1 C-terminus akkumuliert in der Zelle und fängt 14-3-3 Dimere vom SOS2-Protein und vom endogenen SOS1 ab (5). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Aktivität des endogenen SOS1-Antiporters in der Rhizodermis, welcher nun mehr Natrium aus der Wurzel in den Apoplasten pumpt (6). Auch der im Xylem-Parenchym sitzende SOS1-Antiporter ist auf diese Weise aktiver und kann vermutlich mehr Natrium aus dem Xylem resorbieren. Der Transport von Natrium aus dem Xylem in die Wurzel durch den SOS1 ist nur sehr hypothetisch möglich und benötigt eine sehr hohe Natriumkonzentration im Xylem, um seine Transportrichtung zu ändern (7). Rücktransport von Natrium aus dem Xylem wird auch durch andere Transporter, wie z.B. den HKT1 Transporter erreicht (8). Die Salzstress-induzierte Proteinkinase CPK3 sorgt für die Dissoziation des SOS1:14-3-3 Komplexes durch Monomerisierung der 14-3-3 Dimere (9). Im Spross wird das Natrium wohl passiv aus dem Xylem in die Blätter entladen (10). Ob eine Umverteilung von Natrium innerhalb der Pflanze über das Phloem stattfindet ist noch nicht eindeutig geklärt (11). Modifiziert nach Davenport *et al.*, 2007.

#### 4.6 Physiologische Charakterisierung von *At14-3-3* $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen

Um zu untersuchen in wie weit sich der Verlust bestimmter 14-3-3 Proteine auf das Wachstum von *A. thaliana* unter Kontroll- bzw. vor allem unter abiotischen Stressbedingungen auswirkt, wurden 14-3-3 Knockout-Pflanzen charakterisiert. Bei den hier verwendeten Pflanzen handelt es sich um eine 14-3-3  $\kappa$ , eine 14-3-3  $\lambda$  sowie um eine 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutante. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Jörg Kudla (Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsgruppe um Prof. Kudla konnte bereits eine erhöhte Salztoleranz der Pflanzen auf Erde feststellen (Zhou *et al.*, 2014). Generell ist die Charakterisierung von 14-3-3 Knockout-Pflanzen problematisch, da vor allem Single-Knockouts aufgrund der Redundanz der Proteine oftmals keinen nachweisbaren Phänotyp aufweisen (Paul *et al.*, 2012). Weiterhin interagieren 14-3-3 mit einer derart großen Anzahl an verschiedensten Proteinen, dass die Zuordnung eines auftretenden Phänotyps auf eine Interaktion mit einem bestimmten Protein oftmals schwierig ist.

##### 4.6.1 *At14-3-3* $\lambda$ und $\kappa$ interagieren mit *AtTST1* und *AtVIK1*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Beweis erbracht, dass die regulatorischen 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  nicht nur mit dem Plasmamembran-ständigen Transporter SOS1, sondern auch mit tonoplastidären *AtTST1* interagieren. Den Hinweis für diese Interaktion lieferte die Arbeit von Shin *et al.* (2011). Zum Zweck der Verifizierung der Bindung zwischen den 14-3-3 Proteinen  $\lambda$  und  $\kappa$  *in planta* wurde auch hier die BiFC-Methode gewählt. Dazu wurde der *AtTST1* mit dem C-terminalen Fragment und die beiden 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  jeweils mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert und transient in *N. benthamiana* transformiert. Die Coexpression aus diesen beiden Proteinkombinationen resultierte jeweils in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.28). Diese Beobachtung weist auf eine Interaktion zwischen dem *AtTST1* und den beiden *At14-3-3* Proteinen  $\lambda$  und  $\kappa$  hin.

Auch im Fall dieser Interaktion handelt es sich um ein nicht-konserviertes Bindemotiv im Bereich der Aminosäuren 340-380, am langen hydrophilen Loop des *AtTST1*-Transporters (Abbildung 3.29A,B). Innerhalb dieser Sequenz befindet sich ein Serinrest an Position 370, innerhalb eines stark negativ geladenen Aspartat-Clusters. Diese Aspartat-reiche Region ist erforderlich für die effektive und funktionelle Interaktion des TST1-Loops mit seiner korrespondierenden Mitogen-aktivierten Tripelkinase (MAPKKK) *AtVIK1* (Wingenter *et al.*, 2011). Das Serin370 innerhalb dieser Aspartat-reichen Region könnte somit die putative Phosphorylierungsstelle der VIK1 darstellen. Interessanterweise scheint auch hier die

Phosphorylierung am Serin370 nicht essentiell für eine Bindung der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  am Loop des TST1 zu sein (Abbildung 3.29A-1,B-1). Es fällt jedoch auf, dass sich das Interaktionsmuster am Loop ändert, wenn Serin370 zu Aspartat370 mutiert ist (Abbildung 3.29A-2,B-2). Die Mutation von Serin zu Aspartat imitiert durch die negative Ladung eine Phosphorylierung am Serinrest. Das Protein 14-3-3  $\kappa$  weist nach Phosphorylierung eine Abschwächung des Antikörpersignals auf, 14-3-3  $\lambda$  zeigt unter diesen Bedingungen eine Verstärkung des Signals. Anhand dieser Daten könnte man spekulieren, dass 14-3-3  $\kappa$  möglicherweise als Inhibitor des TST1 fungiert, welcher den unphosphorylierten TST1 bindet. Phosphorylierung durch die VIK1 führt dann unter abiotischen Stressbedingungen zur Dissoziation der Bindung und zur Aktivierung des TST1-Transporters. Bei 14-3-3  $\lambda$  könnte es sich im Gegensatz dazu um einen Aktivator des TST1 handeln, welcher den TST1 nach Phosphorylierung durch die VIK1 aktiviert.

Da 14-3-3 Proteine als funktionale Homo- und Heterodimere in der Zelle vorliegen, wird spekuliert, dass ihre Funktion u. a. darin liegen könnte, dass sie zwei interagierende Proteine in räumliche Nähe bringen (Jaspert *et al.*, 2011). Somit lieferte die Interaktion der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  an Serin370 den Hinweis für eine mögliche Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen  $\lambda$  und  $\kappa$  und *At*VIK1. Auch diese Interaktion wurde hier mithilfe der BiFC-Methode verifiziert (Abbildung 3.30). Dazu wurde die *At*VIK1 mit dem C-terminalen Fragment und die beiden 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  jeweils mit dem N-terminalen Fragment des YFP fusioniert und transient in *N. benthamiana* transformiert. Die Coexpression aus diesen beiden Proteinkombinationen resultierte jeweils in einem deutlichen YFP-Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.30). Die hier erhobenen Daten belegen eine Interaktion der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  sowohl mit dem *At*TST1 als auch mit der korrespondierenden MAPKKK *At*VIK1. Ob es zur Bildung eines großen Komplexes aus TST1:VIK1:14-3-3  $\lambda$ - $\kappa$  kommt oder ob sich kleine Komplexe aus den 14-3-3  $\lambda$ - $\kappa$ :TST1 und 14-3-3  $\lambda$ - $\kappa$ :VIK1 formen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

#### 4.6.2 Wachstum von 14-3-3 $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen auf Zucker

Da Pflanzen sessile Organismen sind, müssen sie sich den gegebenen Umweltbedingungen anpassen. Sie nutzen dazu ein Netzwerk aus komplexen, reversiblen regulatorischen Prozessen und Vorgängen. Da durch die Interaktion der *At*14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  mit dem *At*TST1 sowie der korrespondierenden Proteinkinase *At*VIK1, eine mögliche Regulation der Zuckerhomöostase durch die 14-3-3 Proteine aufgedeckt wurde, wurden die drei 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten auf ihre Toleranz gegenüber exogen applizierter Zucker untersucht. Hohe Konzentrationen exogen applizierter Zucker, die sich schließlich im Zytosol anhäufen,

beeinflussen das Wachstum von Pflanzen ebenso wie hohe zytosolische Salzkonzentrationen. Vorausgehende Arbeiten in der Arbeitsgruppe Neuhaus haben gezeigt, dass *35S:tst1*-Mutanten unter diesen Bedingungen ein verbessertes Wachstum aufweisen als der Wildtyp. Die Überexpression des TST1 führt zu einem erhöhten Import von Zuckern in die Vakuole, wo sie die zellulären Vorgänge nicht negativ beeinflussen (Wingenter *et al.*, 2010). Im Zytosol reprimieren hohe Mengen an Zuckern die Expression von Genen, die für photosynthetisch-aktive Proteine bzw. entwicklungsrelevante Proteine kodieren (Jang *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 2002; Rolland & Sheen, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Fehlen der regulatorischen 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  unter Hochzuckerbedingungen zu einer veränderten Toleranz der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp führt und ob diese Veränderungen möglicherweise auf die Interaktion mit dem TST1 und seiner korrespondierenden Kinase VIK1 zurückzuführen sind.

Sowohl unter Hochsaccharose- als auch unter Hochglukosebedingungen wiesen vor allem die 14-3-3  $\kappa$  und  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten ein erhöhtes Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.31 und 3.33). Im Wildtyp ist unter Hochsaccharosebedingungen eine kontinuierliche Frischgewichtsabnahme von 1% Saccharose (Kontrolle) zu 3%, 4% und schließlich 5% Saccharose erkennbar. Diese Biomassenreduktion ist auf die bereits erwähnte Zucker-regulierte Repression der Photosyntheseleistung zurückzuführen (Jang *et al.*, 1997; Rolland & Sheen, 2005). Vor allem die 14-3-3  $\kappa$  und die 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten waren in der Lage ihr Frischgewicht unter diesen Bedingungen beinahe konstant zu halten (Abbildung 3.31). Die 14-3-3  $\lambda$  Knockout-Mutante hielt bis 4% Saccharose ein nahezu konstantes Frischgewicht aufrecht, wies unter 5% Saccharose aber ein ähnliches Frischgewicht wie der Wildtyp auf. Dasselbe gilt für das Frischgewicht der Pflanzen auf 2% Glukose (Abbildung 3.33). Betrachtet man die zellulären Zuckergehalte unter Hochzuckerbedingungen fällt auf, dass vor allem unter 2% Glukose alle drei 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten deutlich weniger Zucker akkumulierten als der Wildtyp (Abbildung 3.34A-C). Unter Hochsaccharosebedingungen war diese Reduktion der Zuckergehalte nicht so ausgeprägt, aber dennoch vorhanden.

Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede im Frischgewicht und im Zuckergehalt der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten auf eine veränderte Zucker-Regulierung zurückzuführen sind, wurden die Transkriptgehalte verschiedener Zucker-regulierter Gene bestimmt (Abbildung 3.35A,B). Das Chlorophyll<sub>ab</sub>-bindende Protein CAB1 und der Phloem-Belader SUC2 sind beides Zucker-reprimierte Gene, d.h. ihre Expression nimmt mit steigender zytosolischer Zuckerkonzentration ab (Koch, 1996). Somit dient ihre Expression einerseits als Indikator für

ihre Aktivität in den Pflanzen und gibt andererseits Aufschluss über die zytosolische Zuckerkonzentration (Koch, 1996; Wingenter *et al.*, 2010). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen alle drei Mutanten eine erhöhte Menge an *SUC2*-mRNA auf, jedoch ist diese Zunahme in der Linie 14-3-3  $\kappa$  nicht signifikant. 14-3-3  $\lambda\kappa$  zeigte zudem eine deutlich erhöhte Menge an *CABI*-mRNA. Auch 14-3-3  $\kappa$  wies eine erhöhte, aber nicht signifikante Zunahme der *cab1* Expression auf. 14-3-3  $\lambda$  weist hier keinen Unterschied zum Wildtyp auf, enthielt tendenziell sogar geringfügig weniger *CABI*-mRNA (Abbildung 3.35B). Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass die Expressionsstudien an Blattscheibchen durchgeführt wurden, die über Nacht mit 5% Glukose gestresst waren. Unter diesen Bedingungen zeigten nur noch die Linien 14-3-3  $\kappa$  und 14-3-3  $\lambda\kappa$  reduzierte Zuckergehalte im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 8.6). 14-3-3  $\lambda$  wies hier weder ein höheres Frischgewicht auf als der Wildtyp noch wies diese Linie veränderte Zuckergehalte auf im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 8.5 und 8.6). Insgesamt deuten die erhöhten Transkriptgehalte von *SUC2* und *CABI* auf niedrigere Konzentrationen löslicher Zucker im Zytosol der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hin.

#### 4.7 Zusammenfassung und Hypothese der Regulation der Zuckerhomöostase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  in einem veränderten Zuckerhaushalt sowie in einer veränderten Biomassenproduktion unter Hochzuckerbedingungen resultiert. Die drei untersuchten 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten wiesen sowohl unter Hochsaccharose- als auch unter Hochglukosebedingungen höhere Frischgewichte und niedrigere Zuckergehalte auf als der Wildtyp. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der Tatsache, dass die Zucker-reprimierten Gene *suc2* und *cab1* in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hochgefahren sind.

Die Tatsache, dass die 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten zwar ein höheres Frischgewicht aufwiesen als der Wildtyp, aber insgesamt weniger lösliche Zucker enthielten, schließt eine Beteiligung des TST1-Transporters am auftretenden Phänotyp der Mutanten jedoch eher aus. Zwar könnte eine erhöhte Aktivität des TST1-Proteins und eine dadurch erzielte höhere Transportrate löslicher Zucker in die Vakuole ausschlaggebend für das höhere Frischgewicht der Mutanten sein, sie müssten dann aber insgesamt höhere Mengen der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose aufweisen als der Wildtyp. Es wäre natürlich auch möglich, dass sich der Phänotyp auf eine Überaktivierung bzw. Deaktivierung der MAPKKK *AtVIK1* zurückführen lässt. Die hochkonservierten MAP-Kinasen sind in zahlreiche Signaltransduktionskaskaden



involviert und die von ihnen regulierten Prozesse reichen von Zellteilung, Zelldifferenzierung bis hin zu Pathogenabwehr und Stress-Antworten (Moustafa *et al.*, 2014; Xu & Zhang, 2015). Um dieser Hypothese nachzugehen, sind jedoch weiterführende Versuche nötig.

Anhand verschiedener „Screenings“ auf zuckerhaltigen Medien wurden bereits zahlreiche Arabidopsis-Mutanten identifiziert, die einen veränderten Wachstumsphänotyp auf Zucker aufweisen als der Wildtyp (Jang *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998). Bei diesen Mutanten ist das sogenannte „sugar sensing“ fehlerhaft. Die Fähigkeit des „sugar sensing“ ist für Pflanzen von fundamentaler Bedeutung, da es den Pflanzen erlaubt ihren Metabolismus und ihre Entwicklung in Abhängigkeit der vorhandenen Mengen an Kohlenhydraten zu regulieren (Coruzzi & Zhou, 2001). Als sessile Organismen müssen Pflanzen schnell und effektiv auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren können und die ihnen zur Verfügung stehende Energie effizient nutzen bzw. aufsparen. Zu diesem Zweck übernehmen Zucker in Pflanzen zwei wichtige Aufgaben, sie sind Nährstoff und Signalmolekül (Rolland *et al.*, 2002). Das wichtigste Signalmolekül ist die Glukose, sie spielt u. a. eine elementare Rolle in der Kontrolle der Genexpression, der Zellproliferation, der Keimlingsentwicklung, des Blattwachstums, der Seneszenz und der Samenentwicklung (Rolland *et al.*, 2006). So führen hohe Konzentrationen exogen applizierter Glukose im Wildtyp zu einem reversiblen Wachstumsarrest in der frühen Keimlingsentwicklung (Gibson, 2000; Coruzzi & Zhou, 2001). Saccharose übt ihren inhibierenden Einfluss auf die Keimlingsentwicklung vermutlich nach Spaltung in Glukose und Fruktose aus und aktiviert auf diese Weise ebenfalls einen Hexose-Signalweg (Gibson, 2000). Da hohe Mengen akkumulierter Zucker während der frühen Entwicklungsphase des Keimlings wohl eine unerwünschte Wachstumsbedingung darstellen, soll dieser Wachstumsstopp vor allem als Schutzmechanismus dienen (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2002).

Somit stimmt der hier identifizierte Wachstumsphänotyp der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten überein mit dem Phänotyp der *gin1-6* (Glukose-insensitiv1-6) Mutanten. Diese Mutanten sind, wie der Name bereits verrät, insensitiv gegenüber hohen Konzentrationen exogen applizierter Glukose (Rolland *et al.*, 2002; Gibson, 2005). Den gut charakterisierten *gin2* Mutanten fehlt das Gen *hexokinase1* (*hvk1*; Moore *et al.*, 2003). Die HXK1 übernimmt in Pflanzen eine duale Funktion, sie reguliert in der Glykolyse den ersten Schritt im Zuckerabbau und sorgt als Signalstoff für das Glukose-vermittelte „sugar sensing“ und „sugar signaling“ (Jang *et al.*, 1997; Sheen *et al.*, 1999). Das Fehlen der HXK1 sorgt in den *gin2* Mutanten für die Insensitivität gegenüber hohen Konzentrationen an Glukose, wodurch es in den Mutanten zu

keiner Verzögerung in der Keimlingsentwicklung auf Hochzuckerbedingungen kommt (Jang *et al.*, 1997; Coruzzi & Zhou, 2001; Moore *et al.*, 2003).

Eine mögliche Erklärung für den auftretenden Phänotyp der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten unter Hochzuckerbedingungen könnte somit ein verändertes „sugar sensing“ bzw. „sugar signaling“ in den Mutanten sein, dass zu einer Insensitivität der Pflanzen gegenüber hohen exogenen Zuckern führt. Dadurch tritt in den Keimlingen kein Entwicklungsstopp auf und ihre Photosyntheserate bleibt hoch. Die im Vergleich zum Wildtyp niedrigeren Konzentrationen an löslichen Zuckern könnten dadurch erklärt werden, dass die Mutanten in der Lage sind übermäßig aufgenommene bzw. generierte Zucker vermehrt in die Biomasseproduktion zu stecken.

Die Existenz weiterer *gin* Mutanten, die die gleiche Insensitivität gegenüber der Glukosevermittelten Inhibition der frühen Keimlingsentwicklung aufweisen, aber keine veränderte HXK-Aktivität zeigen, deutet auf die Existenz weiterer Akteure im „sugar signaling“ hin (Zhou *et al.*, 1998; Rolland *et al.*, 2002). Die in diesen Pflanzen auftretenden Mutationen sind teilweise allelisch zu anderen bereits beschriebenen Zucker-, Abscicinsäure- (ABA) und Salz-abhängigen Mutationen (Rolland *et al.*, 2002; Gibson, 2005). Ob die auftretenden Veränderungen in den 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten also auf eine reduzierte Aktivität der HXK1 zurückzuführen sind oder doch auf einen anderen Akteur des „sugar signalings“, müsste durch weitere Versuche geklärt werden.

Wie bereits erwähnt interagieren 14-3-3 Proteine mit zuvor phosphorylierten Peptid-Sequenzen und beeinflussen auf diese Weise nicht nur die Aktivität ihrer Bindepartner, sondern auch deren Stabilität oder deren subzelluläre Lokalisierung (Fu *et al.*, 2000). Dabei können 14-3-3 Proteine durch Bindung sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Aktivität ihrer Bindepartner wirken (Diaz *et al.*, 2011). Durch die Interaktion mit einer Vielzahl an zytosolischen Enzymen, sind 14-3-3 Proteine in die Assimilation von Kohlenstoffen und die Proteinsynthese involviert und haben auf diese Weise einen bedeutenden Einfluss auf die Verteilung von Metaboliten in Pflanzen (Cotelle *et al.*, 2000; Swatek *et al.*, 2014). So interagieren 14-3-3 Proteine u. a. mit den zytosolischen Enzymen Nitrat-Reduktase (NR), Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und Saccharose-Synthase (SS; Moorhead *et al.*, 1999; Cotelle *et al.*, 2000; Smeekens, 2000; MacKintosh & Meek, 2001). Im Fall der NR und der SPS führt Zuckermangel zur Proteolyse, ausgelöst durch die Dissoziation der 14-3-3 nach Dephosphorylierung der Bindeproteine (Cotelle *et al.*, 2000; Coruzzi & Zhou, 2001). 14-3-3 Proteine schützen ihre Bindepartner demnach vor Proteolyse durch Dephosphorylierung. Durch das Fehlen der 14-3-3 Proteine  $\lambda$  und  $\kappa$  könnte es in den

Mutanten somit aufgrund eines beschleunigten Abbaus verschiedener Enzyme zu einer veränderten Zuckerhomöostase kommen.

Weitere Interaktionen der 14-3-3 Proteine wurden mit den Transportproteinen *AtSUC6*, *AtSTP4* und *AtSTP14* vorgeschlagen (Shin *et al.*, 2011; Jaspert *et al.*, 2011). Während der Saccharosetransporter SUC6 von Sauer *et al.* (2004) als Pseudogen identifiziert wurde, handelt es sich bei den beiden Zuckertransportern STP4 und STP14 um funktionelle Transporter aus der Familie der Monosaccharid-Transporter (MST; Büttner, 2007). Die 14 Mitglieder der Gruppe der STPs sind allesamt in der Plasmamembran lokalisiert und katalysieren einen H<sup>+</sup>/Hexose-Symport aus dem Apoplasten in die Zelle (Büttner, 2010). Aufgrund ihrer „Sink“-Gewebe-spezifischen Expression wird den STPs eine Rolle in der Versorgung von „Sink“-Geweben mit Monosacchariden zugesprochen. Neben Glukose transportieren die STP-Transporter weiterhin die Hexosen Galaktose und Mannose, sowie die Pentose Xylose (Büttner, 2010). *AtSTP4* zählt zu den am besten charakterisierten STP-Isoformen. Dieser Symporter weist eine hohe Expression in den Pollenkörnern und der Wurzelspitze auf und eine geringe Expression in den Blättern (Truernit *et al.*, 1996). Weiterhin gehört STP4 zu den Stress-regulierten STP-Isoformen und zeigt eine starke Zunahme der Expression als Antwort auf Pathogen-Stress und Verletzungen (Truernit *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass der STP4-Transporter und die Zellwand-Invertase *AtcwINV1* eine koordinierte Expression während der Pathogen-Abwehr aufweisen, deutet weiterhin auf eine Rolle von *AtSTP4* in der Versorgung der „Sink“-Gewebe mit Hexosen hin (Fotopoulos *et al.*, 2003). Als „Sink“-Gewebe ohne größeren Stärkespeicher ist auch die Wurzel auf die Versorgung mit Kohlenhydraten aus den „Source“-Geweben angewiesen. Unter Hochzuckerbedingungen kann der STP4-Symporter Hexosen nicht nur aus dem Apoplast, sondern auch aus dem umgebenden Medium in die Zelle transportieren (Büttner, 2010). *AtSTP14* ist vorwiegend im Samen sowie in Blättern des „Source“-Gewebes zu finden und zeigt eine spezifische Affinität für Galaktose (Poschet *et al.*, 2010). Glukose wird von STP14 nur in geringem Umfang transportiert. Daher wird spekuliert, dass STP14 eine Rolle in der Zellwandverwertung hat (Poschet *et al.*, 2010).

Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit den beschriebenen Monosaccharid-Transportern *AtSTP4* und *AtSTP14* könnte eine weitere Erklärung für den beobachteten Phänotyp der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten liefern. Geht man davon aus, dass die Bindung von 14-3-3 Proteinen aktivierend auf diese Transporter wirkt, würde das Fehlen der 14-3-3 Proteine in den 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten somit zu einer Inaktivierung der beiden STP-Symporter führen. Vor allem im Fall des in der Wurzelspitze lokalisierten STP4 würde sich diese Inhibierung der Aktivität in

einer geringeren Aufnahme exogen applizierter Monosaccharide im Vergleich zum Wildtyp äußern. Dadurch ließen sich die niedrigeren Zuckergehalte in den Mutanten erklären, welche folglich auch zu einer geringeren Repression der Keimlingsentwicklung führen. Somit stünden auch die höhere Biomasse unter Hochzuckerbedingungen und die höhere Expression der Zucker-regulierten Gene *cab1* und *suc2* in den Mutanten im Einklang mit dieser Hypothese.

Da die Charakterisierung von 14-3-3 Knockout-Mutanten aber wie bereits erwähnt aufgrund der Redundanz der Isoformen und der Vielzahl an bekannten und unbekanntem Interaktionspartnern problematisch ist, sind das nur Hypothesen. Weitere Untersuchungen der 14-3-3  $\lambda\kappa$  Mutanten müssen folgen, um den beobachteten Phänotyp aufzuklären.

## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Erkenntnisse über die Regulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters SOS1 von *Arabidopsis thaliana* erbracht. Zur detaillierten Analyse des Einflusses von 14-3-3 Proteinen auf die ablaufenden Regulationsprozesse am SOS1-Antiporter sollten weitere 14-3-3 Mutanten untersucht werden. Die Untersuchung von Knockout-Mutanten höherer Ordnung könnte über den Effekt der funktionalen Redundanz hinweghelfen. Die Analyse von spezifischen Überexpressionspflanzen könnte durch teilweise oder vollständige Aufhebung der in den Knockout-Pflanzen beobachteten Phänotypen Hinweise auf die individuellen Aufgaben der einzelnen 14-3-3 Proteine liefern.

Um die Interaktion des SOS1 mit der CPK3 im Detail zu untersuchen, sollte zunächst die Phosphorylierungsstelle der CPK3 am SOS1 C-terminus geklärt werden. Dies kann mithilfe eines Peptid-Spot Binde-Assays durchgeführt werden. Weitere Erkenntnisse könnte die Analyse von *cpk3* Knockout-Mutanten oder Überexpressionspflanzen liefern. Da die CPK3 auch mit 14-3-3 Proteinen interagiert, könnte die Generierung von Pflanzen, die sowohl die *CPK3* als auch bestimmte *14-3-3* Isoformen überexprimieren, von großer Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche putative Interaktionspartner des SOS1 C-terminus mithilfe eines Pulldown-Assays identifiziert. Um weiterführende Einblicke in die Kontrolle der Aktivität des SOS1 durch Interaktionen am regulatorischen C-terminus zu bekommen, sollten weitere Kandidaten als Interaktionspartner verifiziert werden. Dies kann anhand der hier gewählten Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation geschehen oder mittels anderer Methoden, wie beispielsweise FRET, Co-Immunopräzipitation oder Biacore. Einen äußerst spannenden Bindepartner stellt die  $\Delta$ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat Synthetase (P5CS) dar. Diese ist in die Synthese des kompatiblen Solut Prolin involviert (Hu *et al.*, 1992). Da gerade unter Salzstress die Prolinsynthese extrem hochgefahren wird, könnte eine Bindung zwischen den beiden Proteinen eine wichtige Rolle in der Salzstress-Antwort spielen. Auch die bereits verifizierten Interaktionen könnten durch Untersuchung mit den genannten Techniken weiter gestützt werden.

Außerdem wurde festgestellt, dass es in den drei 14-3-3  $\lambda\kappa$  Knockout-Mutanten zu einer veränderten Reaktivität gegenüber der exogen applizierten Zucker, Glukose und Saccharose, kommt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Mechanismen diesem Phänotyp zugrunde liegen, sollte eine weiterführende, molekulare und physiologische Charakterisierung dieser Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erfolgen. Zunächst könnten z.B. anhand von qRT-

PCR-Analysen Expressionsunterschiede verschiedener Zucker-regulierter Gene zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Ein vielversprechender Kandidat wäre hier in jedem Fall der *AtSTP4*-Symporter. Die Interaktion zwischen den 14-3-3 Proteinen und dem *STP4*-Symporter sollte zudem mittels BiFC verifiziert werden. Außerdem sollten auch weitere STP-Transporter, SUC-Transporter und lösliche Proteine, wie die Nitratreduktase (NR), die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) oder die Proteinkinase VIK1 hinsichtlich ihres Transkriptsgehalts untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weiterführende Erkenntnisse über die Regulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters *AtSOS1* erbracht werden. Die Analyse von Mutanten, die den zytosolischen *AtSOS1 C-terminus* überexprimieren, bestätigte eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Salztoleranz. Diese Feststellung lässt sich an verschiedenen Beobachtungen festmachen: Unter Salzstressbedingungen i.) akkumulieren die Überexpressionsmutanten deutlich weniger Natrium im Spross, ii.) sie blühen früher, iii.) sie weisen eine geringere Expression des Salz-induzierten Gens *wrky25* auf, iv.) sie häufen geringere Mengen „kompatibler Solute“ an und v.) sie speichern weniger Stärke im Vergleich zum Wildtyp.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Überexpression der C-terminalen Domäne des SOS1 zu einer erhöhten Salztoleranz der entsprechenden Mutanten durch erhöhte Aktivierung des endogenen SOS1-Transporters führt. Es lässt sich spekulieren, dass negative Regulatoren des SOS-Signalwegs vom löslichen C-terminus abgefangen werden, wodurch ihre inhibierende Funktion auf das endogene SOS-Netzwerk verloren geht.

Im Gegensatz dazu führt der Verlust des SOS1-Transporters in den *sos1* Knockout-Pflanzen zu einer erhöhten Salzsensitivität. Diese Feststellung lässt sich wiederum an verschiedenen Beobachtungen festmachen: Unter Salzstressbedingungen i.) akkumulieren die Knockout-Mutanten deutlich mehr Natrium im Spross sowie vor allem in der Wurzel, ii.) sie blühen verzögert bis gar nicht, iii.) sie weisen eine höhere Expression des Salzstress-Indikatorgens *wrky25* auf, iv.) sie häufen große Mengen kompatibler Solute in Form löslicher Zucker an und v.) sie speichern mehr Stärke im Vergleich zum Wildtyp.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen zwischen dem SOS1 C-terminus und den regulatorischen *At14-3-3* Proteinen  $\nu$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$  und  $\lambda$ , sowie zwischen *AtTST1/AtVIK1* und *14-3-3*  $\kappa$  und  $\lambda$  mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementation verifiziert. Sie binden den SOS1 C-terminus an der Stelle  $^{1112}\text{TRQNTMVESSDEEDEDEG}^{1129}$ , den *AtTST1* an der Stelle  $^{361}\text{DDGAGDDDDSDNDLR}^{375}$ . Beide Bindemotive weisen einen hohen Anteil negativ geladener Aspartat- und Glutamat-Reste auf. Durch die Analyse von *At14-3-3*  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen wurden diese Proteine als Signalstoffe im Zuckerhaushalt von *A. thaliana* identifiziert. Ihr Fehlen führt zu einer Veränderung im „sugar sensing“ bzw. „sugar signaling“. Diese Behauptung lässt sich an verschiedenen Beobachtungen festmachen: Unter Hochzucker-Bedingungen i.) akkumulieren die Knockout-Mutanten mehr Biomasse, ii.) sie akkumulieren weniger Zucker und iii.) sie weisen eine gesteigerte Expression der Glukose-reprimierten Gene *cab1* und *suc2* auf.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, H., Van Der Straeten, D., Peng, J. & Harberd, N. P. (2006)** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**(5757): 91-94
- Adams, E. & Shin, R. (2014)** Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**:231-249
- Aléman, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. & Rubio, F. (2009)** Root (K<sup>+</sup>) acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant Cell Physiology* **52**(9): 1603-1612
- Amith, S. R. & Fliegel, L. (2013)** Regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (NHE1) in Breast Cancer Metastasis. *American Association for Cancer Research* **73**(4): 1259-1264
- An, R., Chen, Q. J., Chai, M. F., Lu, P. L., Su, Z., Qin, Z. X., Chen, J. & Wang, X. C. (2007)** AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *The Plant Journal* **49**: 718-728
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. & Blumwald, E. (1999)** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258
- Apse, M. P. & Blumwald, E. (2002)** Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 146-150
- Apse, M. P., Sottosanto, J. B. & Blumwald, E. (2003)** Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *The Plant Journal* **36**: 229-239
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. & Börnke, F. (2010)** Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell Online* **22**(5): 1498-1515
- Ashraf, M. & Foolad, M. A. (2007)** Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycine betaine and proline. *Environmental and Experimental Botany* **59**:206-216
- Bäurle, I., & Dean, C. (2006)** The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**(4): 655-664
- Bassil, E., Ohto, M., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T. & Blumwald, E. (2011a)** The *Arabidopsis* intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell Online* **23**: 224-239
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y. C., Ohto, M., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M. & Blumwald, E. (2011b)** The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K<sup>+</sup> homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell Online* **23**: 3482-3497



- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K. S., Grillo, S. & Zhu, J.-K. (2007)** SOS2 Promotes Salt Tolerance in Part by Interacting with the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Upregulating Its Transport Activity. *Molecular and Cellular Biology* **27**(22): 7781-7790
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah P. A., Tester, M., Véry, A. A., Sentenac, H. & Casse, F. (2003)** Functional analysis of *AtHKT1* in Arabidopsis shows that Na(+) recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal* **22**(9): 2004-2014
- Bihn, E. A., Paul, A.-L., Wang, S. W., Erdos, G. W. & Ferl, R. J. (1997)** Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *The Plant Journal* **12**(6): 1439-1445
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**(6): 1513-1523
- Blumwald, E. (1987)** Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiologia Plantarum* **69**: 731-734
- Blumwald, E. (2000)** Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 431-434
- Blumwald, E., Aharon, G. S. & Apse, M. P. (2000)** Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1465**: 140-151
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. & Jensen, R. G. (1995)** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A. & Shabala, S. (2014)** ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1241-1257
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Brett, C. L., Donowitz, M. & Rao, R. (2005a)** Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **288**: C223-C239
- Brini, F. & Masmoudi, K. (2012)** Ion Transporters and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *ISRN Molecular Biology* Vol. 2012, Article ID 927436
- Büttner, M. (2007)** The monosaccharide transporter (-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**(12): 2318-2324
- Büttner, M. (2010)** The *Arabidopsis* sugar transporter (*AtSTP*) family: an update. *Plant Biology* **12**(Suppl. 1): 35-41
- Bullock, W., Fernandez, J. M. & Short, J. (1987)** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-379
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T. & Raikhel, N. V. (2004)** The Vegetative Vacuole Proteome of Arabidopsis thaliana Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *The Plant Cell* **16**(12): 3285-3303

- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F. & Sze, H. (2012)** Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers in plant science* **3**: Article 25
- Chaves, M. M., Flexas, J. & Pinheiro, C. (2009)** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551-560
- Cheeseman, J. M. (1988)** Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Physiology* **87**: 547-550
- Chen, T. H. & Murata, N. (2002)** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(3): 250-257
- Chen, Y. & Hoehenwarter, W. (2015)** Changes in the Phosphoproteome and Metabolome Link Early Signaling Events to Rearrangement of Photosynthesis and Central Metabolism in Salinity and Oxidative Stress Response in Arabidopsis. *Plant Physiology* **169**(4): 3021-3033
- Cheng, S. H., Willmann, M. R., Chen, H. & Sheen, J. (2002)** Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology* **129**(2): 469-485
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. & Zhu, J.-K. (2004)** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**(395): 225-236
- Chung, J.-S., Zhu, J.-K., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Shi, H. (2008)** Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. *Plant Journal* **53**(3): 554-565
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998)** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16**: 735-743
- Colcombet, J. & Hirt, H. (2008)** Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**: 217-226
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M. K., Fuentes, S., Tyerman, S. D. & Gilliam, M. (2013)** Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants. *Plant Methods* **9**:4
- Coruzzi, G. M., & Zhou, L. (2001)** Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(3): 247-253
- Cosentino, C., Fischer-Schliebs, E., Bertl, A., Thiel, G. & Homann, U. (2010)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytologist* **186**: 669-680
- Cotelle, V., Meek, S. E. M., Provan, F., Milne, F. C., Morrice, N. & MacKintosh, C. (2000)** 14-3-3s regulate global cleavage of their binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *The EMBO Journal* **19**(12): 2869-2876
- Craig Plett, D. & Moller, I. S. (2010)** Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: What we know and what we would like to know. *Plant, Cell & Environment* **33**: 612-626

- Davenport, R. J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. & Tester, M. (2007)** The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **30**: 497-507
- De Boer, A. H., van Kleeff, P. J. M. & Gao, J. (2013)** Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma* **250**(2): 425-440
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G. & Schroeder, J. I. (2014)** Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* **19**(6): 1360-1385
- Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. (1993)** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* **4**: 215-223
- Denison, F. C., Paul, A.-L., Zupanska, A. K. & Ferl, R. J. (2011)** 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**: 720-727
- Diaz, C., Kusano, M., Sulpice, R., Araki, M., Redestig, H., Saito, K., Stitt, M. & Shin, R. (2011)** Determining novel functions of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins in central metabolic processes. *BMC Systems Biology* **5**:192
- Ding, L. & Zhu, J.-K. (1997)** Reduced Na<sup>+</sup> uptake in the NaCl-hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **113**: 795-799
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995)** Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1085-1097
- Du, W., Lin, H., Chen, S., Wu, Y., Zhang, J., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Wu, W. & Guo, Y. (2011)** Phosphorylation of SOS3-like Calcium-Binding Proteins by Their Interacting SOS2-like Protein Kinases Is a Common Regulatory Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156**(4): 2235-2243
- Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., Chaudhri, M., Ritinger, K., Scarabel, M., Soneji, Y. & Aitken, A. (1997a)** Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3 protein: role in coordinating signal transduction pathways. *Journal of Protein Chemistry* **16**(5): 513-522
- Endler, A., Reiland, S., Gerrits, B., Schmidt, U. G., Baginsky, S. & Martinoia, E. (2009)** *In vivo* phosphorylation sites of barley tonoplast proteins identified by a phosphoproteomic approach. *Proteomics* **9**(2): 310-321
- Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I.W., Qu, X.-Q., Braun, D. M. & Frommer, W. B. (2015)** SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* **25**: 53-62
- Europäische Gemeinschaften (2009)** „Nachhaltige Landwirtschaft und Bodenschutz“ – „Sustainable Agriculture and Soil Conservation“. Verschlechterung der Bodenqualität, Factsheet **4**: Versalzung und Sodifizierung
- Feki, K., Quintero, F. J., Khoudi, H., Leidi, E. O., Masmoudi, K. & Pardo, J. M. (2014)** A constitutively active form of a durum wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 confers high salt tolerance to transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **33**: 277-288
- Ferl, R. J., Lu, G. & Bowen, B. W. (1994)** Evolutionary implications of the family of 14-3-3 brain protein homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* **92**(2): 129-138

- Ferl, R. J. (1996)** 14-3-3 Proteins and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 49-73
- Ferl, R. J., Manak, M. S. & Reyes, M. F. (2002)** The 14-3-3s. *Genome Biology* **3**(7): Reviews3010
- Fisher, D. B. (2000)** Long-distance transport. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L., eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 730-784
- Flowers, T. J., Troke, P. & Yeo, A. (1977)** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 89-121
- Flowers, T. J. & Colmer, T. D. (2008)** Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**: 945-963
- Flowers, T. J. & Colmer, T. D. (2015)** Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* **115**: 327-331
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., Hall, J. L. & Williams, L. E. (2003)** The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* **132**: 821-829
- Fu, H., Subramanian, R. R. & Masters, S. C. (2000)** 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**:617-647
- Fuglsang, A. T., Borch, J., Bych, K., Jahn, T. P., Roepstorff, P. & Palmgren, M. G. (2003)** The Binding Site for 14-3-3 Protein in Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Involvement of a Region Promoting Phosphorylation-Independent Interaction in Addition to the Phosphorylation-Dependent C-Terminal End. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(43): 42266-42272
- Fuglsang, A. T., Guo, Y., Cuin, T. A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K. A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K. S., Palmgren, M. G. & Zhu, J.-K. (2007)** *Arabidopsis* Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein. *Plant Cell* **19**(5): 1617-1634
- Furumoto, T., Yamaguchi, T., Ohshima-Ichie, Y., Nakamura, M., Tsuchida-Iwata, Y., Shimamura, M., Ohnishi, J., Hata, S., Gowik, U., Westhoff, P., Bräutigam, A., Weber, A. P. M. & Izui, K. (2011)** A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* **476**: 472-475
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G. & Schumacher K. (2007)** Plant proton pumps. *FEBS Letters* **581**(12): 2204-2214
- Gibson, S. I. (2000)** Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* **124**(4): 1532-1539
- Gibson, S. I. (2005)** Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(1): 93-102
- Gleave, A. P. (1992)** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* **20**: 1203-1207

- Gökirmak, T., Paul, A.-L. & Ferl, R. J. (2010)** Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Current Opinion in Plant Biology* **13**:527-532
- Golldack, D. (2003)** Molecular responses of halophytes to high salinity. *Progress in Botany* **65**: 219-234
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H. & Probst, N. (2014)** Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* **5**(151): 1-10
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K. S. & Zhu, J.-K. (2004)** The SOS3 Family of Calcium Sensors and SOS2 Family of Protein Kinases in Arabidopsis. *Plant Physiology* **134**: 919-926
- Greenway, H. & Munns, R. (1980)** Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149-190
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010)** A ubiquitin10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal* **64**(2): 355-365
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. (2001)** Molecular Characterization of Functional Domains in the Protein Kinase SOS2 That is Required for Plant Salt Tolerance. *Plant Cell* **13**(6): 1383-1400
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. (2000)** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(7): 3735-3740
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K. & Bohnert, H. J. (2000)** Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499
- Hill, C. B., Jha, D., Bacic, A., Tester, M. & Roessner, U. (2012)** Characterization of Ion Contents and Metabolic Responses to Salt Stress of Different *Arabidopsis AtHKT1;1* Genotypes and Their Parental Strains. *Molecular Plant* **6**(2): 350-368
- Hilpert, K., Winkler, D. F. H. & Hancock, R. E. W. (2007)** Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols* **2**(6): 1333-1349
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1988)** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**: 9877
- Höfgen, R. & Willmitzer, L. (1990)** Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science* **66**: 221-230
- Hrabak, E. M., Dickmann, L. J., Satterlee, J. S. & Sussmann, M. R. (1996)** Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **31**(2): 405-412
- Hrabak, E. M., Chan, C. W., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K.,**

- Zhu, J.-K. & Harmon, A. C. (2003)** The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* **132**(2): 666-680
- Hu, C.-A. A., Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. (1992)** A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 9354-9358
- Hu, Y., Schnyder, H. & Schmidhalter, U. (2000)** Carbohydrate deposition and partitioning in elongating leaves of wheat under saline soil conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 363-370
- Hu, C. D., Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2002)** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* **9**(4): 789-798
- Huber, S. C. (2007)** Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochemical Society Transactions* **35**(1): 28-32
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.-S., Shi, W. & Zhu, J.-K. (2000)** SOS3 Function in Plant Salt Tolerance Requires N-Myristoylation and Calcium Binding. *The Plant Cell* **12**: 1667-1677
- Jang, J. C., León, P., Zhou, L., & Sheen, J. (1997)** Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell Online* **9**(1): 5-19
- Jaspert, N., Throm, C. & Oecking, C. (2011)** *Arabidopsis* 14-3-3 proteins: fascinating and less fascinating aspects. *Frontiers in Plant Science* **2**(96):1-8
- Jeschke, W. D. (1984)** Effects of transpiration on potassium and sodium fluxes in root cells and the regulation of ion distribution between roots and shoots of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology* **117**(3): 267-285
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A. & Li, X. (2013)** The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway: Established and Emerging Roles. *Molecular Plant* **6**(2): 275-286
- Jiang, Y. & Deyholos, M. K. (2009)** Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stress. *Plant Molecular Biology* **69**(1-2): 91-105
- Jones, D. H., Ley, S. & Aitken, A. (1995)** Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adaptor proteins. *FEBS Letters* **368**: 55-58
- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J. L. & Boutry, M. (2005)** Activation of the plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 11675-11680
- Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A. & Zhu, J.-K. (2006)** The plasma membrane  $Na^+/H^+$  antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(49): 18816-18821

- Kerppola, T. K. (2006)** Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols* **1**(3): 1278-1286
- Kerppola, T. K. (2008)** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics*, **37**, 465
- Kim, W.-Y., Ali, Z., Park, H. J., Park, S. J., Cha, J.-Y., Perez-Hormaeche, J., Quintero, F. J., Shin, G., Kim, M. R., Qiang, Z., Ning, L., Park, H. C., Lee, S. Y., Bressan, R. A., Pardo, J. M., Bohnert, H. J. & Yun, D.-J. (2013)** Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nature communications* **4**(1352): 1-12
- Knight, H., Trewavas, A. J. & Knight, M. R. (1997)** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* **12**(5): 1067-1078
- Koch, K. E. (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology* **47**(1): 509-540
- Koncz, C. & Schell, J. (1986)** The promoter of T L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**: 383-396
- Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Brière, C., Mazars, C. & Cotelle, V. (2013)** 14-3-3-Regulated Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death and Differentiation* **20**: 209-217
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Läuchli, A. & Pflüger, R. (1978)** Potassium research review and trends. *Potassium research review and trends*
- Lehoux, S., Abe, J.-I., Florian, J. A. & Berk, B. C. (2001)** 14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Isoform-1 Is Associated with Serum-dependent Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 15794-15800
- Li, K., Wang, Y., Han, C., Zhang, W., Jia, H. & Li, X. (2007)** GA signaling and CO/FT regulatory module mediate salt-induced late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **53**(3): 195-206
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K. & Becker, D. F. (2013)** Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**(9): 998-1011
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K. S., Pardo, J. M. & Guo, Y. (2009)** Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 Protein Kinase Stabilizes Their Protein Complex and Regulates Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**(5): 1607-1619
- Liu, J. & Zhu, J.-K. (1997)** Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **114**(2): 591-596
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S. & Zhu, J.-K. (2000)** The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(7): 3730-3734

- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. & Chua, N. H. (2001)** A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(8): 4782-4787
- Lotkowska, M. E., Tohge, T., Fernie, A. R., Xue, G.-P., Balazadeh, S. & Mueller-Roeber, B. (2015)** The Arabidopsis Transcription Factor MYB112 Promotes Anthocyanin Formation during Salinity and under High Light Stress. *Plant Physiology* **169**: 1862-1880
- Ludwig, A. A., Romeis, T. & Jones, J. D. (2004)** CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany* **55**: 181-188
- Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1995)** Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salt resistance. *Journal of Experimental Botany* **46**(12): 1843-1852
- Maathuis, F. J. M. & Amtmann, A. (1999)** K<sup>+</sup> Nutrition and Na<sup>+</sup> Toxicity: The Basis of Cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ratios. *Annals of Botany* **84**: 123-133
- MacKintosh, C. & Meek, S. E. M. (2001)** Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 205-214
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J. I., Ward, J. M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I. N., Amtmann, A., Maathuis, F. J. M., Sanders, D., Harper, J. F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M. W., Salt, D. E., Kim, S. A. & Gueriot, M. L. (2001)** Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**(4): 1646-1667
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussmann, M. R. & Schroeder, J. I. (2002)** Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter *AtHKT1*. *FEBS letters* **531**(2): 157-161
- Mahajan, S., Pandey, G. K. & Tuteja, N. (2008)** Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **471**(2): 146-158
- Malo, M. E. & Fliegel, L. (2006)** Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**(11): 1081-1095
- Mandel, M. & Higa, A. (1970)** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**: 159-162
- Mansour, M. M. F. (2000)** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum* **43**(4): 491-500
- Marger, M. D., & Saier, M. H. (1993)** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in biochemical sciences* **18**(1): 13-20
- Marschner, P. (1995)** Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic press
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.-K., Pardo, J. M. & Quintero, F. J. (2007)** Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology* **143**: 1001-1012



- Marty, F. (1999)** Plant vacuoles. *The Plant Cell Online* **11**(4): 587-599
- Mehlmer, N., Wurzinger, B., Stael, S., Hofmann-Rodrigues, D., Csaszar, E., Pfister, B., Bayer, R. & Teige, M. (2010)** The Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**:484-498
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2010)** Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* **33**:453-467
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T. & Sheen, J. (2003)** Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science* **300**: 332-336
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. & MacKintosh, C. (1999)** Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* **18**(1): 1-12
- Mouradov, A., Cremer, F., & Coupland, G. (2002)** Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell Online* **14**(suppl 1): S111-S130
- Moustafa, K., AbuQamar, S., Jarrar, M., Al-Rajab, A. J. & Trémouillaux-Guiller, J. (2014)** MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **33**(8): 1217-1225
- Mülhardt, C. (2006)** *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 5. Auflage, Elsevier, München. Spektrum Akademischer Verlag
- Müller, M., Kunz, H.-H., Schroeder, J. I., Kemp, G., Young, H. S. & Neuhaus, H. E. (2014)** Decreased capacity for sodium export out of *Arabidopsis* chloroplasts impairs salt tolerance, photosynthesis and plant performance. *The Plant Journal* **78**:646-658
- Munns, R. (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* **25**: 239-250
- Munns, R. (2005)** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**: 645-663
- Munns, R., James, R. A. & Läuchli, A. (2006)** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* **57**(5): 1025-1043
- Munns, R. & Tester, M. (2008)** Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-681
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**: 473-497
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P.M. & Shaw, A. S. (1996)** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897
- Nah, G., Pagliarulo, C. L., Mohr, P. G., Luo, M., Sisneros, N., Yu, Y., Collura, K., Currie, J., Gioechea, J. L., Wing, R. A. & Schumaker, K. S. (2009)** Comparative sequence analysis of the SALT OVERLY SENSITIVE 1 orthologous region in *Thelungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Genomics* **94**(3): 196-203
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000)** Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2

genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* **42**: 657-665

**Neuhaus, H. E. (2007)** Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS letters* **581**(12): 2223-2226

**Nieves-Cordones, M., Al Shiblawi, F. R. & Sentenac, H. (2016)** Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. *Metal Ions in Life Sciences* **16**: 291-324

**Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. & Pardo, J. M. (1995)** Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiology* **109**(3): 735-742

**Niu, X., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. (1996)** NaCl-Induced Alterations in Both Cell Structure and Tissue-Specific Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Gene Expression. *Plant Physiology* **111**: 679-686

**Núñez-Ramírez, R., Sánchez-Barrena, M., Villalta, I., Vega, J. F., Pardo, J. M., Quintero, F. J., Martínez-Salazar, J. & Albert, A. (2012)** Structural Insights on the Plant Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *Journal of Molecular Biology* **424**: 283-294

**Odell, J. T., Nagy, F. & Chua, N. H. (1985)** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**(6005): 810-812

**Oliás, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P. A., Marín-Manzano, M. C., Pardo, J. M. & Belver, A. (2009)** The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup> between plant organs. *Plant Cell Environment* **32**: 904-916

**Orlowski, J. & Grinstein, S. (2007)** Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 483-492

**Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O. & Quintero, F. J. (2006)** Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1181-1199

**Parida, A. K. & Das, A. B. (2005)** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324-349

**Park, H. J., Kim, W.-Y. & Yun, D.-J. (2016)** A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. *Molecules and Cells* **39**(6): 447-459

**Paul, A.-L., Denison, F. C., Schultz, E. R., Zupanska, A. K. & Ferl, R. J. (2012)** 14-3-3 Phosphoprotein interaction networks – does isoform diversity present functional interaction specification? *Frontiers in Plant Science* **3**(190):1-12

**Petosa, C., Masters, S. C., Bankston, L. A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. & Liddington, R. C. (1998)** 14-3-3zeta binds phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *Journal of Biological Chemistry* **273**(26): 16305-16310

**Poschet, G., Hannich, B. & Büttner, M. (2010)** Identification and Characterization of AtSTP14, a Novel Galactose Transporter from Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **51**(9): 1571-1580

- Putney, L. K., Denker, S. P. & Barber, D. L. (2002)** The changing face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1: Structure, Regulation and Cellular Actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**: 527-552
- Qi, Z. & Spalding, E. P. (2004)** Protection of Plasma Membrane K<sup>+</sup> Transport by the Salt Overly Sensitive1 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Antiporter during Salinity Stress. *Plant Physiology* **136**: 2548-2555
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. & Zhu, J.-K. (2002)** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(12): 8436-8441
- Qiu, Q.-S., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Zhu, J.-K. & Schumaker, K.S. (2003)** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Activity in the Plasma Membrane of Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**: 1041-1052
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Schumaker, K. S. & Zhu J.-K. (2004)** Regulation of Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(1): 207-215
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J. K. & Pardo, J. M. (2002)** Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 9061
- Quintero, F. J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.-Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.-J., Zhu, J.-K. & Pardo, J. M. (2011)** Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(6): 2611-2616
- Rausch, T. (1991)** The hexose transporters at the plasma membrane and the tonoplast of higher plants. *Physiologia Plantarum* **82**(1): 134-142
- Rengasamy, P. (2006)** World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1017-1023
- Roberts, M. R. (2003)** 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signaling. *Trends in Plant Science* **8**(5): 218-223
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002)** Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* **14**(Suppl. 1): S185-S205
- Rolland, F. & Sheen, J. (2005)** Sugar sensing and signaling networks in plants. *Biochemical Society*: 269-271
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006)** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709
- Roy, S. J., Negrão, S. & Tester, M. (2014)** Salt resistant crop plants. *Current opinion in Biotechnology* **26**: 115-124
- Rozema, J. & Riphagen, I. (1977)** Physiology and Ecologic Relevance of Salt Secretion by the Salt Gland of *Glaux maritima* L.. *Oecologia* **29**(4): 349-357
- Rubio, F., Gassmann, W. & Schroeder, J. I. (1995)** Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**: 1660-1663

- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.-H., Matsumoto, T. K., Koiwa, H., Zhu, J.-K., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. (2001)** *AtHKT1* is a salt tolerance determinant that controls  $\text{Na}^+$  entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(24): 14150-14155
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sakamoto, A. & Murata, N. (2002)** The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment* **25**(2): 163-171
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. & Harper, J. F. (2002)** Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**(Suppl): S401-S417
- Sathyanarayanan, P. V. & Poovaiah, B. W. (2004)** Decoding  $\text{Ca}^{2+}$  signals in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* **23**: 1-11
- Sauer, N., Ludwid, A., Knoblauch, A., Rothe, P., Gahrtz, M. & Klebl, F. (2004)** *AtSUC8* and *AtSUC9* encode functional sucrose transporters, but the closely related *AtSUC6* and *AtSUC7* genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Journal* **40**(1): 120-130
- Sauer, N. (2007)** Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**: 2309-2317
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N. & Hedrich, R. (2011)** Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters *SUC4* and *TMT1/2*. *The Plant Journal* **68**(1): 129-136
- Schulze, E.-D., Beck, E. & Müller-Hohenstein, K. (2002)** *Pflanzenökologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Schulze, W., 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* **69**: 529-541
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügel, U. I. & Kunze, R. (2003)** ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**: 16-26
- Schweighofer, A. & Meskiene, I. (2015)** Phosphatases in plants. *Methods in Molecular Biology* **1306**: 25-46
- Sehnke, P. C., Henry, R., Cline, K. & Ferl, R. J. (2000)** Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiology* **122**(1): 235-242
- Sehnke, P. C., Chung, H. J., Wu, K. & Ferl, R. J. (2001)** Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(2): 765-770

- Sehnke, P. C., DeLille, J. M. & Ferl, R. J. (2002a)** Consummating Signal Transduction: The Role of 14-3-3 Proteins in the Completion of Signal-Induced Transitions in Protein Activity. *The Plant Cell Suppl.*: S339-S354
- Sehnke, P. C., Rosenquist, M., Alsterfjord, M., DeLille, J., Sommarin, M., Larsson, C. & Ferl, R. J. (2002b)** Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins. *Plant Molecular Biology* **50**(6): 1011-1018
- Shabala, S. (2003)** Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. *Annals of Botany* **92**(5): 627-634
- Shabala, L., Cuin, T. A., Newman, I. A. & Shabala, S. (2005)** Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis sos* mutants. *Planta* **222**: 1041-1050
- Shabala, S. & Cuin, T. A. (2008)** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiology Plantarum* **133**(4): 651-669
- Sheen, J., Zhou, L., & Jang, J. C. (1999)** Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(5): 410-418
- Sheen, J. (2014)** Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks. *National Institutes of Health Public Access* **57**(2): 67-79
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. & Zhu, J. K. (2000)** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 6896
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. & Zhu, J. K. (2002)** The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *The Plant Cell Online* **14**: 465-477
- Shi, H., Lee, B., Wu, S. J. & Zhu, J. K. (2003)** Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology* **21**: 81-85
- Shin, R., Jez, J. M., Basra, A., Zhang, B. & Schachtman, D. P. (2011)** 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Letters* **585**: 143-147
- Simpson, G. G. & Dean, C. (2002)** Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?. *Science* **296**(5566): 285-289
- Slepkov, E. & Fliegel, L. (2002)** Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Biochemistry and Cell Biology* **80**(5): 499-508
- Smeekens, S. (2000)** Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **51**(1): 49-81
- Stelzer, R. & Läuchli, A. (1977b)** Salt- and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis*. II. Structural differentiation of the root in relation to function. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **84**: 95-108
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185**: 60-89
- Sun, J., Dai, S., Wang, R., Chen, S., Li, N., Zhou, X., Lu, C., Shen, X., Zheng, X., Hu, Z., Zhang, Z., Song, J. & Xu, Y. (2009)** Calcium mediates root K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiology* **29**: 1175-1186

- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I. & Uozumi, N. (2005)** Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant Journal* **44**: 928-938
- Swatek, K. N., Wilson, R. S., Ahsan, N., Tritz, R. L. & Thelen, J. J. (2014)** Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochemical Journal* **459**(1): 15-25
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2000)** *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Taylor, R. G., Walker, D. C., & McInnes, R. R. (1993)** *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research* **21**(7): 1677
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. & Hirt, H. (2004)** The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**: 141-152
- Tester, M. & Davenport, R. (2003)** Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany* **91**: 503-527
- Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J., & Sauer, N. (1996)** The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *The Plant Cell Online* **8**(12): 2169-2182
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. B., Nakamura, T. & Schroeder, J. I. (2000)** The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* **122**: 1249-1259
- Van Kleeff, P. J. M., Jaspert, N., Li, K. W., Rauch, S., Oecking, C. & de Boer, A. H. (2014)** Higher order *Arabidopsis* 14-3-3 mutants show 14-3-3 involvement in primary root growth both under control and abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **65**(20): 5877-5888
- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M. & Donaire, J. P. (2002)** The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2413-2418
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P. & Donaire, J. P. (2003)** A Novel Intracellular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Related to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters is important for K<sup>+</sup> Ion Homeostasis in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(25): 22453-22459
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., García-Ramírez, L. & Pantoja, O. (2005)** Salt stress in *Thelungiella halophila* activates Na<sup>+</sup> transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiology* **139**: 1507-1517
- Verbruggen, N. & Hermans, C. (2008)** Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**: 753-759

- Verma, D. P. S. (1999)** Osmotic stress tolerance in plants: role of proline and sulfur metabolisms. In Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., eds, *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt stress in Higher Plants*. R. G. Landes Company, Austin, TX, pp. 153-168
- Vitart, V., Baxter, I., Doerner, P. & Harper, J. F. (2001)** Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root endodermis. *The Plant Journal* **27**(3): 191-201
- Wagner, W., Keller, F. & Wiemken, A. (1983)** Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **112**: 359-372
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn J. E., Stitt, M. & Schmid, M. (2013)** Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **339**(6120): 704-707
- Waisel, Y., Eshel, A. & Agami, M. (1986)** Salt balance of leaves of the mangrove *Avicennia marina*. *Physiologia Plantarum* **67**(1): 67-72
- Wang, B., Yang, H., Liu, Y.-C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. & Fu, H. (1999)** Isolation of High-Affinity Peptide Antagonists of 14-3-3 Proteins by Phage Display. *Biochemistry* **38**(38): 12499-12504
- Wang, B., Davenport, R. J., Volkov, V. & Amtmann, A. (2006)** Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **57**(5): 1161-1170
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q. & Guo, S. (2013)** The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 7370-7390
- Wang, X., Chang, L., Wang, B., Wang, D., Li, P., Wang, L., Yi, X., Huang, Q., Peng, M. & Guo, A. (2013)** Comparative Proteomics of *Thellungiella halophila* Leaves from Plants Subjected to Salinity Reveals the Importance of Chloroplastic Starch and Soluble Sugars in Halophyte Salt Tolerance. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**(8): 2174-2195
- Ward, J. M., Hirschi, K. D. & Sze, H. (2003)** Plants pass the salt. *Trends in Plant Science* **3**(5): 200-201
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2001)** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**(6): 581-590
- Whiteman, S.-A., Serazetdinova, L., Jones, A. M. E., Sanders, D., Rathjen, J., Peck, S., C. & Maathius, F. J. M. (2008)** Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Proteomics* **8**(17): 3536-3547
- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W. & Faaij, A. (2011)** The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy & Environmental Science* **4**: 2669-2681
- Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I. I., Heyer, A.G., Marten, I., Hedrich, R. & Neuhaus, H. E. (2010)** Increased activity of the vacuolar

monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant physiology* **154**(2): 665-677

**Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I. I., Heyer, A. G., Reinders, J., Schulz, A., Geiger, D., Hedrich, R. & Neuhaus, H. E. (2011)** A member of the mitogenactivated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal* **68**(5): 890-900

**Wink, M. (1993)** The plant vacuole: a multifunctional compartment. *Journal of Experimental botany* 231-246

**Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M. L. & Jeschke, W. D. (1991)** The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. *Journal of Experimental Botany* **42**(6): 697-704

**Woodcock, J. M., Murphy, J., Stomski, F.C., Berndt, M.C. & Lopez, A. F. (2003)** The dimeric versus monomeric status of 14-3-3 $\zeta$  is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *Journal of Biological Chemistry* **278**(38): 36323-36327

**Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E. & Neuhaus, H. E. (2006)** Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell Online* **18**(12): 3476-3490

**Wu, S. J., Ding, L. & Zhu, J. K. (1996)** *SOS1*, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *The Plant Cell* **8**: 617-627

**Wydro, M., Kozubek, E. & Lehmann, P. (2006)** Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica* **53**: 289-298

**Xu, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J. M. & Cui, D. (2008)** Functional characterization of a wheat plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**(1): 8-15

**Xu, J. & Zhang, S. (2015)** Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**(1): 56-64

**Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. & Cantley, L. C. (1997)** The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **91**(7): 961-971

**Yeo, A. R. & Flowers, T. J. (1980)** Salt Tolerance in the Halophyte *Suaeda maritima* L. Dum.: Evaluation of the Effect of Salinity upon Growth. *Journal of Experimental Botany* **31**(123): 1171-1183

**Yeo, A. R. (1981)** Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum.: intracellular compartmentation of ions. *Journal of Experimental Botany* **32**: 487-497

**Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, J., Liang, Y. & Zhang, W. (2010)** Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **188**: 762-773

**Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y. & Dai, S. (2012)** Mechanisms of Plant Salt Response: Insights from Proteomics. *Journal of Proteome Research* **11**(1):49-67



- Zhang, J.-L. & Shi, H. (2013)** Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis Research* **115**:1-22
- Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T. L. & Sheen, J. (1998)** Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 10294-10299
- Zhou, H., Lin, H., Chen, S., Becker, K., Yang, Y., Zhao, J., Kudla, J., Schumaker, K. S. & Guo, Y. (2014)** Inhibition of the *Arabidopsis* Salt Overly Sensitive Pathway by 14-3-3 Proteins. *The Plant Cell* **26**: 1166-1182
- Zhu, J.-K., Liu, J. & Xiong, L. (1998)** Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role to potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1191
- Zhu, J.-K. (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247
- Zhu, L. & Li, N. (2013)** Quantitation, networking, and function of protein phosphorylation in plant cell. *Frontiers in Plant Science* **3**: Article 302

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen CPA1-Familie.....	6
Abbildung 1.2:	Topographisches Modell des Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporters <i>AtSOS1</i> .....	7
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung des SOS-Signalwegs .....	9
Abbildung 1.4:	Phylogenetischer Stammbaum der <i>At14-3-3</i> Proteine .....	12
Abbildung 1.5:	Topographisches Modell von Zuckertransportern der MF-Superfamilie ....	15
Abbildung 3.1:	Relativer <i>AtSOS1 C-terminus</i> Transkriptgehalt in <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen.....	50
Abbildung 3.2:	Relativer <i>AtSOS1 N-terminus</i> Transkriptgehalt in <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen.....	51
Abbildung 3.3:	Proteingehalt in <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen .....	52
Abbildung 3.4:	Wildtyp und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen unter Kontroll- und Salzstressbedingungen sowie Analyse des <i>FT</i> Transkripts unter Salzstressbedingungen .....	53
Abbildung 3.5:	Natriumakkumulation in Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen auf Erde .....	55
Abbildung 3.6:	Frischgewicht und Natriumgehalt von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen.....	56
Abbildung 3.7:	Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium und in 2,5 mM NaCl-Medium .....	58
Abbildung 3.8:	Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 25 mM NaCl-Medium .....	59
Abbildung 3.9:	Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium .....	60
Abbildung 3.10:	Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 150 mM und 200 mM NaCl-Medium .....	61
Abbildung 3.11:	Relative Expression des Salz-induzierten Gens <i>wrky25</i> .....	62
Abbildung 3.12:	Zucker- und Stärkeakkumulation in Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen.....	63
Abbildung 3.13:	Prolinakkumulation in Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen ....	64
Abbildung 3.14:	Identifizierung von <i>sos1</i> Knockout-Mutanten .....	66

Abbildung 3.15: Wildtyp und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen unter Kontroll- und Salzstressbedingungen sowie Analyse des <i>FT</i> Transkripts unter Salzstressbedingungen .....	68
Abbildung 3.16: Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium und in 2,5 mM NaCl-Medium .....	71
Abbildung 3.17: Natriumgehalte von Wildtyp- und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen bei Anzucht in 25 mM und 100 mM NaCl-Medium .....	72
Abbildung 3.18: Kaliumgehalte von Wildtyp- und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium.....	73
Abbildung 3.19: Relative Expression des Salz-induzierten Gens <i>wrky25</i> .....	74
Abbildung 3.20: Zucker-/Stärkeakkumulation in Wildtyp- und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen.....	75
Abbildung 3.21: Wurzellänge von Wildtyp-, <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Überexpressions- und <i>sos1</i> Knockout-Pflanzen .....	77
Abbildung 3.22: Expression und Reinigung von <i>AtSOS1 C-terminus</i> in <i>E. coli</i> Zellen.....	79
Abbildung 3.23: Kopplung von <i>AtSOS1 C-terminus</i> an Affi-Gel10 Säule und Elution .....	80
Abbildung 3.24: BiFC zwischen <i>AtTS1</i> , <i>AtSOS1 C-terminus</i> und <i>AtVIK1</i> .....	82
Abbildung 3.25: BiFC zwischen <i>AtSOS1 C-terminus</i> und <i>At14-3-3 v, ω, κ</i> und <i>λ</i> .....	83
Abbildung 3.26: BiFC zwischen <i>AtSOS1 C-terminus</i> und <i>AtCPK3</i> .....	84
Abbildung 3.27: Reinigung von <i>At14-3-3 ω, λ, κ</i> und Peptid-Spots von <i>SOS1 C-terminus</i> ..	85
Abbildung 3.28: BiFC zwischen <i>AtTST1</i> und <i>At14-3-3 κ</i> und <i>λ</i> .....	86
Abbildung 3.29: Peptid-Spots von <i>AtTST1</i> gebunden von <i>At14-3-3 κ</i> und <i>λ</i> .....	87
Abbildung 3.30: BiFC zwischen <i>AtVIK1</i> und <i>At14-3-3 κ</i> und <i>λ</i> .....	88
Abbildung 3.31: Frischgewicht von Wildtyp- und <i>λκ</i> Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (Kontrolle, 3%, 4%, 5% Saccharose).....	89
Abbildung 3.32: Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und <i>λκ</i> Knockout-Pflanzen (Kontrolle, 3%, 4%, 5% Saccharose).....	91
Abbildung 3.33: Frischgewicht von Wildtyp- und <i>λκ</i> Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (Kontrolle, 2% Glukose).....	92
Abbildung 3.34: Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und <i>λκ</i> Knockout-Pflanzen (Kontrolle, 2% Glukose) .....	93
Abbildung 3.35: Relative Expression der Zucker-reprimierten Gene <i>cab1</i> und <i>suc2</i> .....	94
Abbildung 4.1: Hypothese des Natriumstroms von der Wurzel in den Spross.....	118
Abbildung 8.1: Kaliumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium .....	154

Abbildung 8.2:	Kaliumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium.....	154
Abbildung 8.3:	Kaliumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 150 mM NaCl-Medium.....	155
Abbildung 8.4:	Kaliumgehalte von Wildtyp- und <i>35S:AtSOS1 C-terminus</i> Pflanzen bei Anzucht in 200 mM NaCl-Medium.....	155
Abbildung 8.5:	Frischgewicht von Wildtyp- und $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (5% Glukose).....	156
Abbildung 8.6:	Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und $\lambda\kappa$ Knockout-Pflanzen (5% Glukose).....	156
Abbildung 8.7:	Peptid-Spots von <i>AtSOS1 C-terminus</i> (14-3-3 $\omega$ ).....	157
Abbildung 8.8:	Peptid-Spots des <i>AtTST1</i> Loops (14-3-3 $\kappa$ ).....	157
Abbildung 8.9:	Peptid-Spots des <i>AtTST1</i> Loops (14-3-3 $\lambda$ ).....	157

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Pflanzen.....	18
Tabelle 2.2:	Medienzusammensetzung für die Hydrokultur.....	20
Tabelle 2.3:	Verwendete Oligonukleotide.....	27
Tabelle 2.4:	Verwendete Vektoren.....	29
Tabelle 2.5:	Hergestellte Konstrukte.....	29
Tabelle 2.6:	Bakterienstämme.....	31
Tabelle 2.7:	Verwendete Antibiotika.....	32
Tabelle 8.1:	Putative Interaktionspartner des rekombinanten <i>AtSOS1 C-terminus</i> unter Kontrollbedingungen, identifiziert mittels Massenspektrometrie.....	158
Tabelle 8.2:	Putative Interaktionspartner des rekombinanten <i>AtSOS1 C-terminus</i> unter Salzstressbedingungen, identifiziert mittels Massenspektrometrie.....	165
Tabelle 8.3:	Beladungsmuster Peptid-Spots - <i>AtSOS1 C-terminus</i> .....	168
Tabelle 8.4:	Beladungsmuster Peptid-Spots - <i>AtTST1</i> Loops.....	171

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

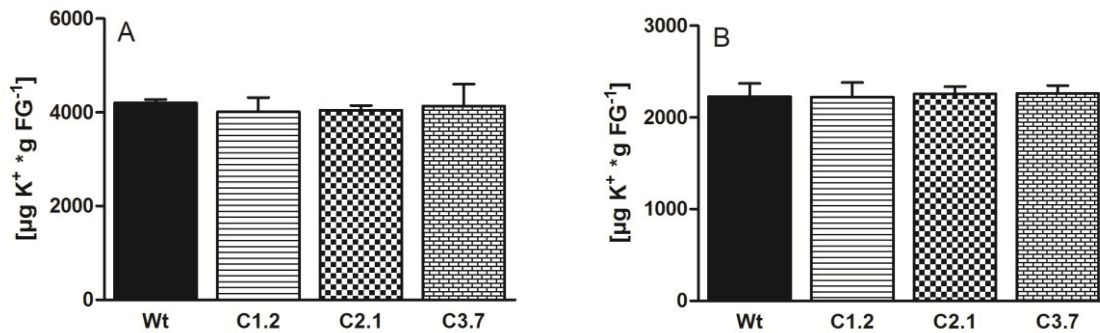
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtprozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>At/A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Arabidopsis Zucker Transporter
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAB1	Chlorophyll <sub>ab</sub> -bindendes Protein
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHX	Kationen-Protonen-Antiporter
Clm	Chloramphenicol
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPA	Kationen-Protonen-Antiporter
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
C <sub>t</sub>	„Threshold Cycle“, Zyklus zu einem Schwellenwert
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Glc	Glukose
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde(n)
H <sup>+</sup>	Proton
HCl	Salzsäure

H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC	Ionen-Chromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
K	Kalium
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KEA	Kalium-Efflux-Antiporter
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
λ	Lambda, Wellenlänge
μ	mikro
m	Milli
m	Meter
M	Molar
MAPK, MPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
Mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
MOPS	2-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Murashige Skoog
n	Nano
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
OD	optische Dichte
NHX	Natrium-Protonen-Antiporter
Ni	Nickel

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pBSK	pBlueskript-SK, Klonierungsvektor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
s	Sekunde
SDS	Natrium-(„sodium“-)-Dodecylsulfat
SOS	Salt-Overly-Sensitive
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	„Terrific Broth“, ein Bakterienmedium
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TST	Tonoplast-Zucker-Transporter
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-ATPase	vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase
V-PPase	vakuoläre Pyrophosphatase
Wt	Wildtyp
YT	„Yeast Trypton“, ein Bakterienmedium
z.B.	zum Beispiel

## 8.4 Physiologische Untersuchung von *35S:AtSOS1 C-terminus* Mutanten

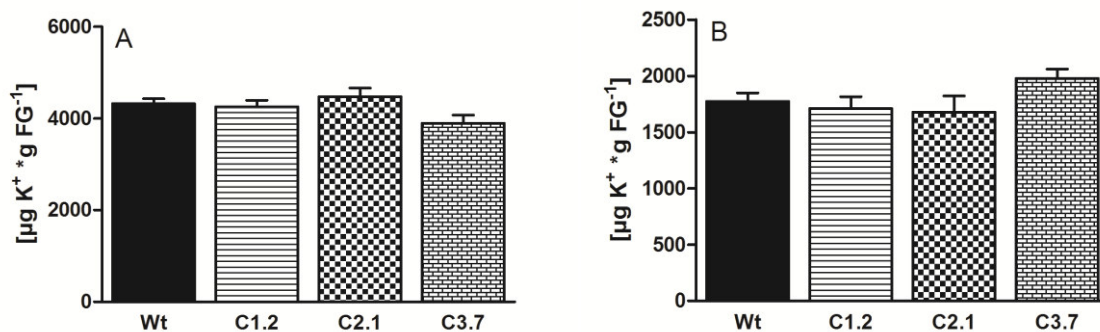
### 8.4.1 Kaliumgehalt unter Kontrollbedingungen



**Abbildung 8.1: Kaliumgehalte von Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen bei Anzucht in Kontrollmedium**

Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden für fünf Wochen in hydroponischer Kultur angezogen. Nach der Ernte wurde der Kaliumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE.

### 8.4.2 Kaliumgehalt unter 100 mM NaCl-Bedingungen

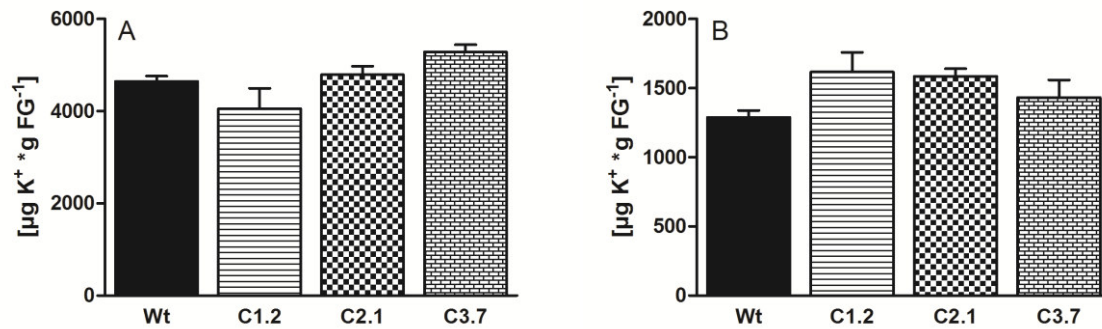


**Abbildung 8.2: Kaliumgehalte von Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen bei Anzucht in 100 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und *35S:AtSOS1 C-terminus* Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 100 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Kaliumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit je 6 Replikaten  $\pm$  SE.



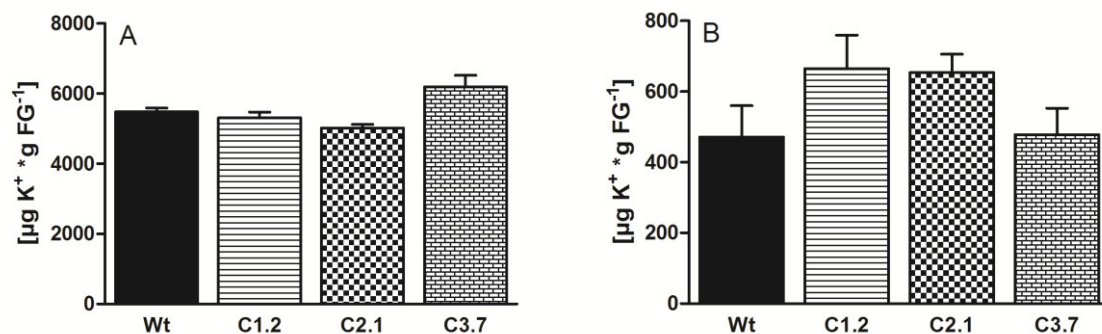
### 8.4.3 Kaliumgehalt unter 150 mM NaCl-Bedingungen



**Abbildung 8.3: Kaliumgehalte von Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen bei Anzucht in 150 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 150 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Kaliumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mind. je 3 Replikaten ± SE.

### 8.4.4 Kaliumgehalt unter 200 mM NaCl-Bedingungen

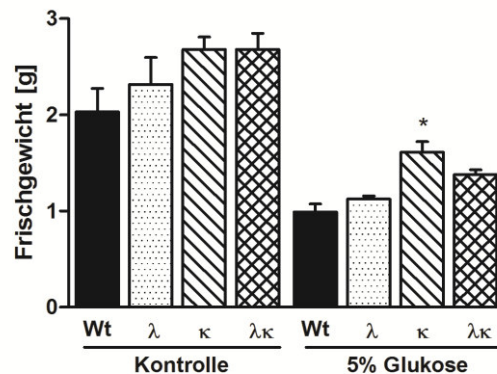


**Abbildung 8.4: Kaliumgehalte von Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen bei Anzucht in 200 mM NaCl-Medium**

Fünf Wochen alte Wildtyp- und 35S:AtSOS1 C-terminus Pflanzen wurden 72 h vor der Ernte einer 200 mM NaCl-Lösung ausgesetzt. Nach der Ernte wurde der Kaliumgehalt in den Wurzeln (B) und im Spross (A) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit mind. je 3 Replikaten ± SE.

## 8.5 Physiologische Untersuchung von $\lambda\kappa$ Knockout-Mutanten

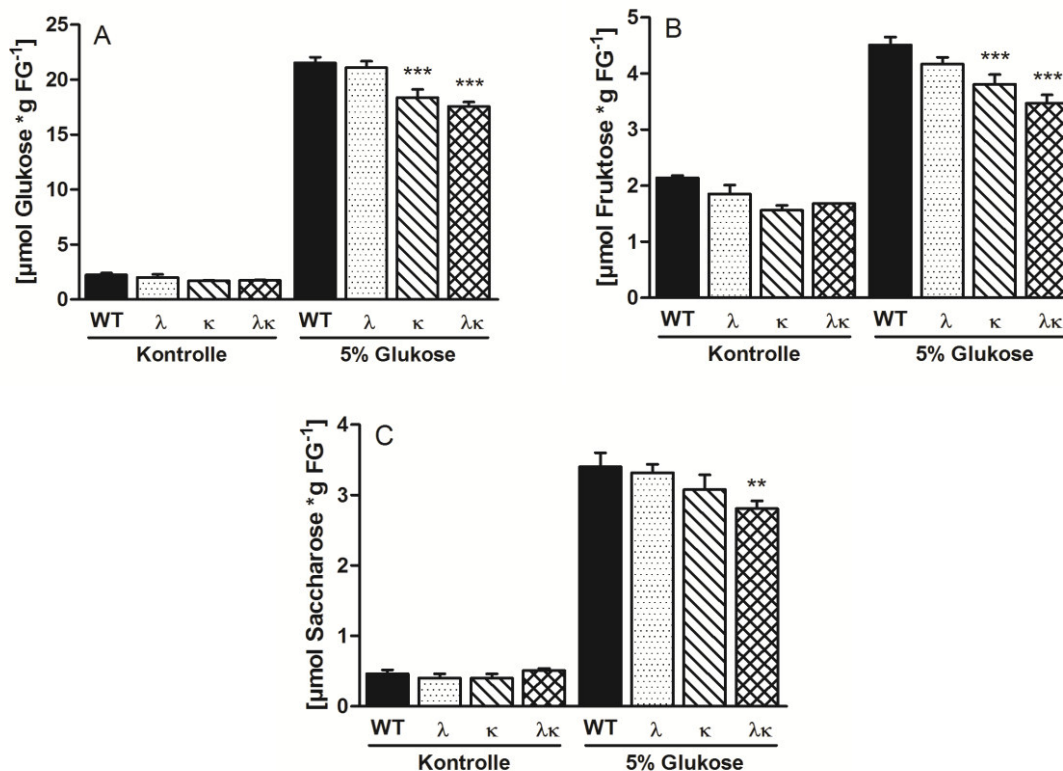
### 8.5.1 Frischgewicht unter 5% Glukosebedingungen



**Abbildung 8.5: Frischgewicht von Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen in steriler Flüssigkultur (5% Glukose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Nach sieben Tagen Wachstum auf Standard-MS8 Medium fand ein Mediumwechsel statt. Die Keimlinge wurden für weitere sieben Tage entweder auf Kontrolle oder 5% Glukose kultiviert. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*=  $p < 0,05$ ).

### 8.5.2 Zuckerakkumulation unter 5% Glukosebedingungen

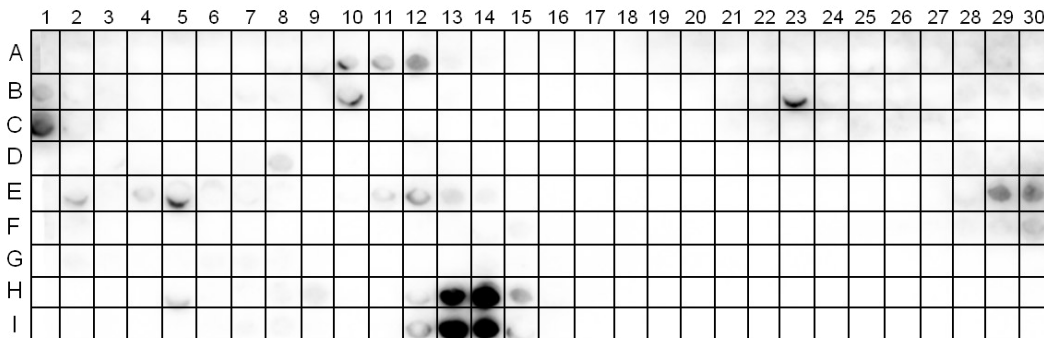


**Abbildung 8.6: Akkumulation löslicher Zucker in Wildtyp- und  $\lambda\kappa$  Knockout-Pflanzen (5% Glukose)**

Je 100 Keimlinge wurden für 14 Tage in Flüssigkultur angezogen. Nach sieben Tagen Wachstum auf Standard-MS8 Medium fand ein Mediumwechsel statt. Die Keimlinge wurden für weitere sieben Tage entweder auf Kontrolle oder 5% Glukose kultiviert. Signifikant gegenüber Wildtyp gemäß ANOVA-Tests (\*\*\*=  $p < 0,001$ , \*\*=  $p < 0,01$ ).

## 8.6 Peptid-Spot Binde-Assays

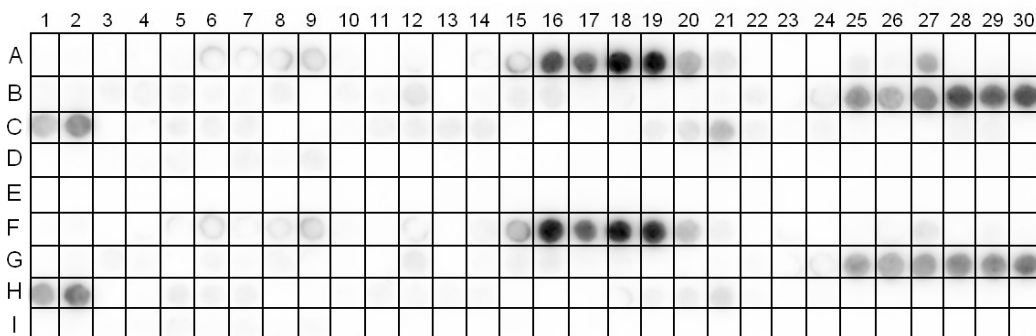
### 8.6.1 Peptid-Spot Binde-Assay von *AtSOS1* C-terminus und 14-3-3 $\omega$



**Abbildung 8.7: Peptid-Spots von *AtSOS1* C-terminus (14-3-3  $\omega$ )**

Dargestellt sind Peptid-Spots gebunden von (10xHis)-gelabelten *At*14-3-3  $\omega$ . Die Spots korrespondieren mit den angegebenen Aminosäuresequenzen des *AtSOS1* C-terminus.

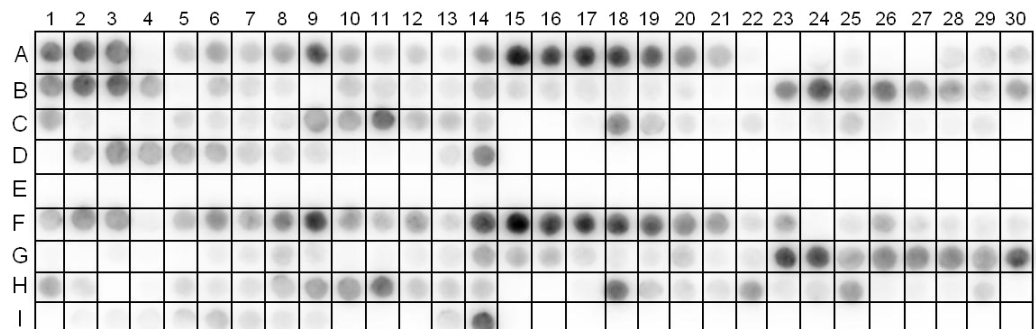
### 8.6.2 Peptid-Spot Binde-Assay der *AtTST1* Loopregion und *At*14-3-3 $\kappa$



**Abbildung 8.8: Peptid-Spots des *AtTST1* Loops (14-3-3  $\kappa$ )**

Dargestellt sind Peptid-Spots gebunden von (10xHis)-gelabelten *At*14-3-3  $\kappa$ . Die Spots korrespondieren mit den angegebenen Aminosäuresequenzen des *AtTST1*.

### 8.6.3 Peptid-Spot Binde-Assay der *AtTST1* Loopregion und *At*14-3-3 $\lambda$



**Abbildung 8.9: Peptid-Spots des *AtTST1* Loops (14-3-3  $\lambda$ )**

Dargestellt sind Peptid-Spots gebunden von (10xHis)-gelabelten *At*14-3-3  $\lambda$ . Die Spots korrespondieren mit den angegebenen Aminosäuresequenzen des *AtTST1*.

## 8.7 Untersuchung der Eluatfraktionen aus den Pulldown-Assays

**Tabelle 8.1: Putative Interaktionspartner des rekombinanten AtSOS1 C-terminus unter Kontrollbedingungen, identifiziert mittels Massenspektrometrie**

Gene number	Predicted protein function
AT3G23810	SAHH2 (Adenosylhomocysteinase 2); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-homocysteine from S-adenosyl-L-homocysteine
AT4G20890	TUBB9 (Tubulin beta-9 chain); Structural constituent of cytoskeleton, functions in microtubule-based process
AT5G62690	TUBB 2 (Tubulin beta-2 chain); Structural constituent of cytoskeleton, functions in microtubule-based process
AT5G19770	TUBA3 (Tubulin alpha-3 chain); Structural constituent of cytoskeleton, functions in microtubule-based process
AT1G20010	TUBB5 (Tubulin beta-5 chain); Structural constituent of cytoskeleton, functions in microtubule-based process
AT1G78300.1	<b>14-3-3-like protein G-Box Factor 14 omega</b> , General Regulatory Factor 2, involved in brassinosteroid mediated signaling pathway, located in Golgi apparatus, cytoplasm, cytosol, plasma membrane, vacuolar membrane, vacuole, functions in protein phosphorylated amino acid binding
AT1G35160.2	14-3-3-like protein GF14 phi, General Regulatory Factor 4, involved in brassinosteroid mediated signaling pathway, located in Golgi apparatus, cytoplasm, cytosol, nuclear envelope, nucleus, plasma membrane, functions in protein phosphorylated amino acid binding
AT2G36530	ENO2 (Bifunctional enolase 2/transcriptional activator); Multifunctional enzyme that acts as an enolase involved in the metabolism and as a positive regulator of cold-responsive gene transcription, involved in a subpathway that synthesizes pyruvate from D-glyceraldehyde 3-phosphate. This subpathway is part of the pathway glycolysis, which is itself part of Carbohydrate degradation
AT3G55610	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase P5CS plays a key role in proline biosynthesis, leading to osmoregulation in plants
AT5G65430.3	<b>14-3-3-like protein GF14 kappa</b> , General Regulatory Factor 8, involved in brassinosteroid mediated signalling pathway, located in chloroplast, cytoplasm, nucleus, plant-type cell wall, plasma membrane, functions in protein phosphorylated amino acid binding
AT1G02500	SAM1 (S-adenosylmethionine synthase 1); Catalyzes the formation of S-adenosyl-methionine from methionine and ATP. This protein is involved in a subpathway that synthesizes S-adenosyl-L-methionine from L-methionine. This subpathway is part of the pathway S-adenosyl-L-methionine biosynthesis, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT5G16050	<b>14-3-3-like protein GF14 epsilon</b> , General Regulatory Factor 5, involved in the response to cadmium ion, located in Golgi apparatus, cell wall, chloroplast, stroma, cytoplasm, cytosol, mitochondrion, nuclear envelope, plasma membrane, involved in brassinosteroid mediated signaling pathway, functions in protein phosphorylated amino acid binding
AT3G02520.1	14-3-3-like protein GF14 nu, General Regulatory Factor 7, involved in brassinosteroid mediated signaling pathway, functions in protein phosphorylated amino acid binding
ATMG01190	ATPA (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial); Functions in ATP hydrolysis coupled proton transport
AT2G16950	TRN1 (Transportin-1); Functions in intracellular protein transport, nuclear protein import as nuclear transport receptor
AT2G36880	METK3 (S-adenosylmethionine synthase 3); Protein is involved in a subpathway that synthesizes S-adenosyl-L-methionine from L-methionine. This subpathway is part of the

	pathway S-adenosyl-L-methionine biosynthesis, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT5G35360	CAC2 (Biotin carboxylase, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes malonyl-CoA from acetyl-CoA
AT1G12840	VHA-C (V-type proton ATPase subunit C); Subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase. Subunit C is necessary for the assembly of the catalytic sector of the enzyme and is likely to have a specific function in its catalytic activity. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. ATP hydrolysis coupled proton transport
AT1G76550	PFP-alpha2 (Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha 2); Protein is involved in a subpathway that synthesizes D-glyceraldehyde 3-phosphate and glyceraldehyde phosphate from D-glucose This subpathway is part of the pathway glycolysis, which is itself part of Carbohydrate degradation
AT1G22300.1	14-3-3-like protein GF14 epsilon, General Regulatory Factor 10, involved in the response to ABA, located in chloroplast, stroma, cytoplasm, cytosol, mitochondrion, plasma membrane, plasmodesma, involved in brassinosteroid mediated signaling pathway, functions in protein phosphorylated amino acid binding
AT2G05710	ACO2 (Aconitate hydratase 2, mitochondrial); Protein is involved in a subpathway that synthesizes isocitrate from oxaloacetate. This subpathway is part of the pathway tricarboxylic acid cycle, which is itself part of Carbohydrate metabolism
AT5G15450	CLPB3 (Chaperone protein, chloroplastic); Molecular chaperone essential for chloroplast development and seedling viability
AT1G53240	MDH1 (Malate dehydrogenase 1, mitochondrial)
AT1G09795	ATP phosphoribosyltransferase 2, chloroplastic; Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-histidine from 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate. This subpathway is part of the pathway L-histidine biosynthesis, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT5G08280	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic; Protein is involved in a subpathway that synthesizes coproporphyrinogen-III from 5-aminolevulinic acid. This subpathway is part of the pathway protoporphyrin-IX biosynthesis, which is itself part of Porphyrin-containing compound metabolism
AT1G18500	IPMS1 (2-isopropylmalate synthase 1, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-leucine from 3-methyl-2-oxobutanoate. This subpathway is part of the pathway L-leucine biosynthesis, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT2G42590.3	14-3-3-like protein GF14 mu, General Regulatory Factor 9, involved in post-embryonic root development, located in chloroplast, stroma, cytoplasm, cytosol, nucleus, plasma membrane, functions in calcium ion binding, protein phosphorylated amino acid binding
AT2G25450	GSL-OH (Probable 2-oxoacid dependent dioxygenase); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity
AT2G45300	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, chloroplastic; Protein is involved in a subpathway that synthesizes chorismate from D-erythrose 4-phosphate and phosphoenolpyruvate.
AT2G20580	RPN2A (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A); functions in ubiquitin binding
AT1G32060	Phosphoribulokinase, chloroplastic; Protein is involved in the pathway Calvin cycle, which is part of Carbohydrate biosynthesis
AT3G20050	CCT1 (T-complex protein 1 subunit alpha); molecular chaperone, functions in ATP binding
AT4G21210	RP1 (Pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein, chloroplastic); Bifunctional serine/threonine kinase and phosphorylase involved in the dark/light-mediated regulation of PDK by catalyzing its phosphorylation/dephosphorylation
AT1G05010	ACO4 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 4); Protein is involved in a subpathway that synthesizes ethylene from S-adenosyl-L-methionine; part of Alkene biosynthesis

AT5G55280	FtsZ1 (Cell division protein homolog 1, chloroplastic); Exhibits GTPase activity
AT5G20630	GER3 (Germin-like protein subfamily 3 member 3)
AT3G14790	RHM3 (Probable rhamnose biosynthetic enzyme 3); Involved in Carbohydrate biosynthesis
AT5G17990	PAT1 (Anthranilate phosphoribosyltransferase, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-tryptophan from chorismate
AT5G49460	ACLB-2 (ATP-citrate synthase beta chain protein 2); Primary enzyme responsible for the synthesis of cytosolic acetyl-CoA, used for the elongation of fatty acids and biosynthesis of isoprenoids, flavonoids and malonated derivatives
AT2G40490	UPD2 (Uroporphyrinogen decarboxylase 2, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes coproporphyrinogen-III from 5-aminolevulinic acid
AT1G06680	OEE2 (Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic); May be involved in the regulation of photosystem II
AT1G17050	SPS2 (Solanesyl diphosphate synthase 2, chloroplastic); Involved in isoprenoid biosynthetic pathway
AT2G30110	UBA1 (Ubiquitin-activating enzyme E1-1); Involved in the pathway protein ubiquitination, which is part of Protein modification
AT4G23100	GSH1 (Glutamate--cysteine ligase, chloroplastic); protein is involved in a subpathway that synthesizes glutathione from L-cysteine and L-glutamate
AT1G57720	Probable elongation factor 1-gamma 2, translation elongation factor activity
AT1G64520	RPN12A (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A); Acts as a regulatory subunit of the 26S proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated protein
AT4G23460	Beta-adaptin-like protein C; Subunit of clathrin-associated adaptor protein complex
AT4G29120	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1, mitochondrial; Protein is involved in the pathway L-valine degradation, which is part of Amino-acid degradation
AT1G76080	CDSP32 (Thioredoxin-like protein, chloroplastic); Probable thiol-disulfide oxidoreductase involved in resistance to oxidative stress
AT5G01410	PDX1.3 (Pyridoxal biosynthesis protein); Protein is involved in the pathway pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis, which is part of Cofactor biosynthesis
AT5G58290	RPT3 (26S protease regulatory subunit 6B homolog); Protein is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated protein
AT3G14390	LYSA1 (Diaminopimelate decarboxylase 1, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-lysine from DL-2,6-diaminopimelate. This subpathway is part of the pathway L-lysine biosynthesis via DAP pathway, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT1G03630	PORC (Protochlorophyllide reductase C, chloroplastic); Protein is involved in the pathway chlorophyll biosynthesis, which is part of Porphyrin-containing compound metabolism
AT4G24450	GWD2 (Alpha-glucan water dikinase 2); Mediates the incorporation of phosphate into alpha-glucan
AT1G12410	CLPR2 (ATP-dependent protease proteolytic subunit-related protein 2, chloroplastic); Required for chloroplast development and integrity
AT5G22800	EMB86 (Probable alanine--tRNA ligase, chloroplastic); Catalyzes the attachment of alanine to tRNA(Ala)
AT5G03940	FFC (Signal recognition particle 54 kDa protein, chloroplastic); Involved in cotranslational and post-translational sorting of thylakoid proteins
AT1G01470	LEA14 (late embryogenesis abundant protein 14); Probable desiccation-related protein

AT3G10920	MSD1 (Superoxide dismutase [Mn] 1, mitochondrial); Destroys superoxide anion radicals
AT5G45930	CHLI2 (Magnesium-chelatase subunit ChII-2, chloroplastic); Protein is involved in the pathway chlorophyll biosynthesis, which is part of Porphyrin-containing compound metabolism.
AT5G37830	OXP1 (5-oxoprolinase); Acts in glutathione degradation pathway
AT3G19170	PreP1 (Presequence protease 1, chloroplastic/mitochondrial); ATP-independent protease that degrades both mitochondrial and chloroplastic transit peptides after their cleavage
AT5G62790	DXR (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic); Protein is involved in step 1 of the subpathway that synthesizes isopentenyl diphosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
AT4G33510	DHS2 (Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2, chloroplastic); Protein is involved in step 1 of the subpathway that synthesizes chorismate from D-erythrose 4-phosphate and phosphoenolpyruvate.
AT4G31490	Coatomer subunit beta-2; Coatomer complex is required for budding from Golgi membranes
AT1G79870	HPR2 (Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A); Catalyzes the NADPH-dependent reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate into glycolate and glycerate
AT3G59970	MTHFR1 (Methylenetetrahydrofolate reductase 1); Protein is involved in the pathway tetrahydrofolate interconversion, which is part of One-carbon metabolism
AT3G25800	PP2AA2 (Serine/threonine-protein phosphatase 2A, 65 kDa regulatory subunit A beta isoform); Subunit serves a scaffolding molecule to coordinate the assembly of the catalytic domain and a variable regulatory domain
AT2G24270	ALDH11A3 (NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); Important as a means of generating NADPH for biosynthetic processes
AT1G47128	RD21a (Cysteine proteinase); Cysteine protease that plays a role in immunity, senescence, biotic and abiotic stresses
AT2G46520	CAS (Exportin-2); Mediates importin-alpha re-export from the nucleus to the cytoplasm
AT1G80460	GLPK (Glycerol kinase); Key enzyme in the regulation of glycerol uptake and metabolism
AT5G26570	GWD3 (Phosphoglucan, water dikinase, chloroplastic); Mediates the incorporation of phosphate into phospho-alpha-glucan, mostly at the C3 position of the glucose unit, required for starch degradation
AT5G28840	GDP-mannose 3,5-epimerase; protein is involved in a subpathway that synthesizes L-ascorbate from GDP-alpha-D-mannose
AT2G25080	GPX1 (Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 1, chloroplastic); Protects cells and enzymes from oxidative damage by catalyzing the reduction of hydrogen peroxide
AT3G22890	APS1 (ATP sulfurylase 1, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes sulfite from sulfate
AT4G26900	HISN4 (Imidazole glycerol phosphate synthase hisHF, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-histidine from 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate. This subpathway is part of the pathway L-histidine biosynthesis, which is itself part of Amino-acid biosynthesis
AT5G52920	PKP2 (Plastidial pyruvate kinase 2); Required for plastidial pyruvate kinase activity
AT3G14990	DJ1A (Protein DJ-1 homolog A); Involved in oxidate stress response
AT2G27530	RPL10AB (60S ribosomal protein L10a-2)
AT2G35500	SKL2 (Probable inactive shikimate kinase like 2, chloroplastic)
AT1G02930	GSTF6 (Glutathione S-transferase F6); May be involved in the conjugation of reduced glutathione to endogenous and exogenous hydrophobic electrophiles

AT5G54160	OMT1 (Flavone 3'-O-methyltransferase 1); Protein is involved in the pathway quercetin degradation, which is part of Flavonoid metabolism
AT5G40390	RFS5 (Probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 5); Transglucosidase operating by a ping-pong reaction mechanism
AT2G29450	GSTU5 (Glutathione S-transferase U5); May be involved in the conjugation of reduced glutathione to endogenous and exogenous hydrophobic electrophiles
AT1G07320	RPL4 (50S ribosomal protein L4, chloroplastic); Protein binds directly and specifically to 23S rRNA
ATCG00380	rps4 (30S ribosomal protein S4, chloroplastic); One of the primary rRNA binding proteins
AT5G36160	TAT (Tyrosine aminotransferase); Protein is involved in step 2 of the subpathway that synthesizes acetoacetate and fumarate from L-phenylalanine. This subpathway is part of the pathway L-phenylalanine degradation, which is itself part of Amino-acid degradation
AT5G66570	OEE1 (Oxygen-evolving enhancer protein 1-1, chloroplastic); Stabilizes the manganese cluster which is the primary site of water splitting
AT1G14030	LSMT-L ([Fructose-bisphosphate aldolase]-lysine N-methyltransferase, chloroplastic); Protein-lysine methyltransferase methylating chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate aldolases
AT4G04040	PFP-beta2 (Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta 2); Catalyzes the phosphorylation of D-fructose 6-phosphate
ATCG00830 ATCG01310	rpl2-A (50S ribosomal protein L2, chloroplastic); Structural constituent of ribosome
AT1G58080	ATP-PRTase 1 (ATP phosphoribosyltransferase 1, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-histidine from 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate
AT4G04020	PAP1 (Probable plastid-lipid-associated protein 1, chloroplastic); Probably involved in light/cold stress-related jasmonate biosynthesis
AT4G19710	AKHSDH2 (Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2, chloroplastic)
AT5G42740	PGIC (Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes D-glyceraldehyde 3-phosphate and glyceraldehyde phosphate from D-glucose
AT5G53460	GLT1 (Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic); Involved in glutamate biosynthesis
AT3G58140	Phenylalanine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial; Is responsible for the charging of tRNA(Phe) with Phenylalanine in mitochondrial translation
AT1G17650	GLYR2 (Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2, chloroplastic); Catalyzes the NADPH-dependent reduction of glyoxylate to glycolate
AT4G34490	CAP1 (Cyclase-associated protein 1); Actin monomer binding protein
AT1G68590	30S ribosomal protein 3-1, chloroplastic; probably a ribosomal protein
AT1G24020	MLP423 (MLP-like protein 423); Involved in response to biotic stimulus
AT2G43090	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 3; Plays an essential role in leucine biosynthesis
AT2G19940	Probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, chloroplastic
AT3G58500	PP2A3 (Serine/threonine-protein phosphatase PP2A-3 catalytic subunit); Phosphoprotein phosphatase activity
AT1G47340	F-box protein
AT2G20890	THF1 (Protein Thylakoid formation 1, chloroplastic); Involved in the process of vesicle-mediated thylakoid membrane biogenesis
AT3G19980	FYPP3 (Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 3);



	Dephosphorylates phosphorylated phytochromes
AT5G48300	APS1 (Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic); Protein plays a role in synthesis of starch
AT5G65620	OOP (Organellar oligopeptidase A, chloroplastic/mitochondrial); Protein plays a role in the degradation of transit peptides
AT3G04880	DRT102 (DNA-damage-repair/toleration protein); Involved in response to cold
AT2G43910	HOL1 (Thiocyanate methyltransferase 1); Involved in glucosinolate metabolism
AT5G27470	Serine--tRNA ligase; Catalyzes the attachment of serine to tRNA(Ser)
AT3G29360	UGD2 (UDP-glucose 6-dehydrogenase 2); Protein is involved in a subpathway that synthesizes UDP-alpha-D-glucuronate from UDP-alpha-D-glucose
AT3G54900	GRXS14 (Monothiol glutaredoxin-S14, chloroplastic); Probably involved in the regulation of the redox state of proteins
AT2G17790	VPS35A (Vacuolar protein sorting-associated protein 35A); Protein plays a role in vesicular protein sorting
AT3G10670	ABCI6 (ABC transporter I family member 6, chloroplastic); ATPase activity coupled to transmembrane transport of substances
AT4G24820	RPN7 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 homolog); Acts as a regulatory subunit of the 26S proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins
AT5G05780	RPN8A (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A); Acts as a regulatory subunit of the 26S proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins
AT3G54640	TSA1 (Tryptophan synthase alpha chain, chloroplastic); Protein is involved in step 5 of the subpathway that synthesizes L-tryptophan from chorismate
AT3G13330	PA200 (Proteasome activator subunit 4); Component of the proteasome
AT2G47390	GEP (Probable glutamyl endopeptidase, chloroplastic); Serine-type protease
AT1G36160	ACC1 (Acetyl-CoA carboxylase 1); Protein is involved in a subpathway that synthesizes malonyl-CoA from acetyl-CoA. This subpathway is part of the pathway malonyl-CoA biosynthesis, which is itself part of Lipid metabolism
AT1G16460	RDH2 (Thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase 2); Catalyzes the transfer from a sulfur ion to cyanide or another thiol compound
AT5G59880	ADF3 (Actin-depolymerizing factor 3); Actin-depolymerizing protein
AT5G47200	RABD2b (Ras-related protein); Regulator of membrane traffic from the Golgi apparatus towards the ER
AT3G53580	DAPF (Diaminopimelate epimerase, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that synthesizes DL-2,6-diaminopimelate from LL-2,6-diaminopimelate
AT4G13430	IIL1 (3-isopropylmalate dehydratase large subunit); Protein is involved in a subpathway that synthesizes L-leucine from 3-methyl-2-oxobutanoate
AT3G02360	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 3; Protein is involved in a subpathway that synthesizes D-ribulose 5-phosphate from D-glucose 6-phosphate
AT3G28300	UPF0496 protein; Integral component of membrane
AT3G48990	4CL8 (4-coumarate--CoA ligase-isomerase 8); Required for oxalate degradation
AT4G12060	Clp protease-related protein, chloroplastic; Protein histidine kinase binding
AT5G64050	GluRS (Glutamate--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial); Catalyzes the attachment of glutamate to tRNA(Glu)
AT1G80380	GLYK (D-glycerate 3-kinase, chloroplastic); Protein is involved in a subpathway that

	synthesizes 3-phospho-D-glycerate from glycine
AT5G22580	Stress-response A/B barrel domain-containing protein; Involved in stress response
AT3G43300	BIG5 (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 5); Plays a role in vesicular protein sorting
AT1G72550	Probable phenylalanine-tRNA ligase beta subunit; Phenylalanine tRNA ligase activity
AT3G63170	FAP1 (Fatty-acid-binding protein 1)
AT1G30530	UGT78D1 (UDP-glycosyltransferase 78D1); UDP-glycosyltransferase activity
AT1G49970	CLPR1 (ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit-related protein 1, chloroplastic); Required for chloroplast development and differentiation
AT4G32520	SHM3 (Serine hydroxymethyltransferase 3, chloroplastic); Protein is involved in the pathway tetrahydrofolate interconversion, which is part of One-carbon metabolism
AT1G43670	FBPase (Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic)

**Tabelle 8.2: Putative Interaktionspartner des rekombinanten AtSOS1 C-terminus unter Salzstressbedingungen, identifiziert mittels Massenspektrometrie**

Gene number	Predicted protein function
AT3G17170	RCF3 (Regulator of fatty-acid composition 3); Functions in structural constituent of ribosome, rRNA binding, involved in translation, ribosome biogenesis, located in ribosome, chloroplast, expressed in 21 plant structures, expressed during 13 growth stages
AT2G06850.1	XTH4 (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 4); Cell wall biogenesis, cellular glucan metabolic process, response to auxin, response to low light intensity stimulus, response to mechanical stimulus, unidimensional cell growth, xyloglucan metabolic process
AT4G17170	RABB1c (Ras-related protein); Involved in intracellular vesicle trafficking and protein transport
AT2G15430	NRPB3 (DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 3)
AT5G41210	GSTT1 (Glutathione S-transferase T1); May be involved in the conjugation of glutathione to exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
AT1G12920 AT3G26618	ERF1-2, ERF1-3 (Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-2;Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3); Direct the termination of nascent peptide synthesis
AT5G20920	EIF2 BETA (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta)
AT5G25460	Uncharacterized protein
AT3G44110	ATJ3 (Chaperone protein dnaJ 3); Photoperiodism, flowering, positive regulation of flower development, protein folding, regulation of ATPase activity, response to salt stress
AT4G24800	ECIP1 (EIN2 C-terminus interacting protein 1); Response to ethylene, response to salt stress
AT5G60790	ABCF1 (ABC transporter F family member 1)
AT1G24510	CCT5 (T-complex protein 1 subunit epsilon); Molecular chaperone
AT1G20200 AT1G75990	RPN3A, RPN3B (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 homolog A, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 homolog B); Act as a regulatory subunit of the 26S proteasome
AT2G21620	RD2 (response to desiccation 2); Involved in response to stress
AT5G46790	PYL1 (Abscisic acid receptor); Required for ABA-mediated responses
AT4G17870	PYR1 (Abscisic acid receptor); functions in abscisic acid-activated signaling pathway, negative regulation of catalytic activity, regulation of protein serine/threonine phosphatase activity
AT1G32070	Acetyltransferase NSI
AT3G48530	KING1 (SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1); Regulatory subunit of the probable trimeric SNF1-related protein kinase complex
AT3G63250	HMT2 (Homocysteine S-methyltransferase 2); Catalyzes methyl transfer from S-methylmethionine to adenosyl-L-homocysteine
AT1G10360	GSTU18 (Glutathione S-transferase U18); May be involved in the conjugation of glutathione to exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
AT1G02090	FUS5, CSN7 (COP9 signalosome complex subunit 7)
AT4G13180	Uncharacterized protein

AT3G19980 AT1G50370	FYPP3, FYPP1 (Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 3; Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 1); Dephosphorylate phosphorylated phytochromes
AT3G55620	EIF6-2 (Eukaryotic translation initiation factor 6-2); Binds to the 60S ribosomal subunit
AT5G64460	Phosphoglycerate mutase-like protein 1; May play a role in carbohydrate metabolism
AT5G16070	TCP-1/cpn60 (T-complex protein 1 subunit zeta 2); Chaperonin family protein, functions in unfolded protein binding, ATP binding, involved in protein folding, cellular protein metabolic process
AT3G15610	Uncharacterized protein
AT3G54540	ABCF4 (ABC transporter F family member 4); Involved in transport, ATP binding
AT3G50860	AP-3 complex subunit sigma; Involved in intracellular protein transport
AT3G50840	BTB/POZ domain-containing protein; Protein is involved in the pathway protein ubiquitination, which is part of Protein modification
AT2G05710	ACO3 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 3); Involved in citrate metabolic process, glyoxylate cycle, isocitrate metabolic process, response to abscisic acid, response to cadmium ion, response to oxidative stress, response to salt stress, tricarboxylic acid cycle
AT4G19003	Vacuolar protein sorting-associated protein 25; Involved in vesicle-mediated transport
AT3G46460	UBC13 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13); Functions in ubiquitin protein ligase binding
AT1G51710 AT3G21280	UBP6, UBP7 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7); Involved in the processing of ubiquitinated proteins
AT4G11420	TIF3A1 (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A)
AT1G77670	Putative aminotransferase
AT3G62120	Proline--tRNA ligase; Catalyzes the attachment of proline to tRNA(Pro)
AT2G42520 AT3G58570	RH37, RH52 (DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37; DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52)
AT3G58510	RH11 (DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 11)
AT4G04910	NSF Vesicle-fusing ATPase; Involved in vesicle-mediated transport
AT4G26110	NAP1;1 (Nucleosome assembly protein 1;1); May modulate chromatin structure by regulation of nucleosome assembly/disassembly
AT2G44160	MTHFR2 (Methylenetetrahydrofolate reductase 2); Protein is involved in the pathway tetrahydrofolate interconversion, which is part of One-carbon metabolism
AT5G53620	Uncharacterized protein
AT4G04950	GRXS17 (Monothiol glutaredoxin-S17); Electron carrier activity
AT1G17890	GER2 (Putative GDP-L-fucose synthase 2); Protein is involved in a subpathway that synthesizes GDP-L-fucose from GDP-alpha-D-mannose
AT1G07110	FKFBP (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase); Involved in fructose 2,6-bisphosphate metabolic process, regulation of carbon utilization
AT1G80410	Tetratricopeptide repeat-containing protein
AT3G13460 AT5G61020.1	ECT2, ECT3 (Evolutionarily conserved C-terminal region 3 protein; Evolutionarily conserved C-terminal region 2 protein)

AT2G40840	DPE2 (4-alpha-glucanotransferase); Inactivated in response to cold stress
AT4G38680	CSP2 (Cold shock protein 2); Chaperone that binds to RNA, single- (ssDNA) and double-stranded (dsDNA) DNA, and unwinds nucleic acid duplex. Contributes to enhancement of cold and freezing
AT1G35670 AT4G09570	CPK11, CPK4 (Calcium-dependent protein kinase 11; Calcium-dependent protein kinase 4) May play a role in signal transduction pathways that involve calcium as a second messenger
AT4G23650	<b>CPK3 (Calcium-dependent protein kinase 3)</b>
AT5G28900	Probable serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit gamma; Serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit beta
AT5G35970	DNA-helicase like protein
AT5G27650	Uncharacterized protein
AT5G03406	Histidyl-tRNA synthetase-like protein
AT5G06060	Tropinone reductase homolog; Oxidoreductase activity
AT4G09150	T-complex protein 11
AT3G57890	Tubulin binding cofactor C domain-containing protein; Involved in cell morphogenesis
AT3G62530	E-Z type HEAT repeat-containing protein
AT3G20820	Leucine-rich repeat-containing protein
AT3G22850	Aluminum induced protein with YGL and LRDR motif
AT3G18500	CCR4-3 (Carbon catabolite repressor protein 4 homolog 3); Exonucleolytic cleavage of poly(A) to 5'-AMP.
AT2G18740 AT4G30330	Putative small nuclear ribonucleoprotein; Small nuclear ribonucleoprotein homolog; Involved in mRNA splicing
AT1G72880	Nucleotidase activity; Putative uncharacterized protein
AT3G53710 AT2G37550	AGD6, AGD7 (ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 6; Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 7)
AT5G38930	Germin-like protein subfamily 1 member 10; May play a role in plant defense
AT5G12190	Splicing factor 3B subunit 6-like protein; May be necessary for the splicing of pre-mRNA
AT2G46280	TRIP-1, TIF3I1 (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I); Involved in protein synthesis
AT1G15950	CCR1 (Cinnamoyl-CoA reductase 1); Involved in the latter stages of lignin biosynthesis

## 8.8 Beladungsmuster der Zellulosemembranen für Peptid-Spot Binde-Assays

**Tabelle 8.3: Beladungsmuster der Zellulosemembran mit Peptid-Spots des AtSOS1 C-terminus**

Spot Nummer	SOS1 C-terminus Sequenz
A1	FVLRLLRMDILPAPK
A2	RLLRMDILPAPKKRI
A3	RMDILPAPKKRILEY
A4	ILPAPKKRILEYTKY
A5	APKKRILEYTKYEML
A6	KRILEYTKYEMLNKA
A7	LEYTKYEMLNKALRA
A8	TKYEMLNKALRAFQD
A9	EMLNKALRAFQDLGD
A10	NKALRAFQDLGDDEE
A11	LRAFQDLGDDEELGP
A12	FQDLGDDEELGPADW
A13	LGDDEELGPADWPTV
A14	DEELGPADWPTVESY
A15	LGPADWPTVESYISS
A16	ADWPTVESYISSLKG
A17	PTVESYISSLKGSEG
A18	ESYISSLKGSEGELV
A19	ISSLKGSEGELVHHP
A20	LKGSEGELVHHPHNG
A21	SEGELVHHPHNGSKI
A22	ELVHHPHNGSKIGSL
A23	HHPHNGSKIGSLDPK
A24	HNGSKIGSLDPKSLK
A25	SKIGSLDPKSLKDIR
A26	GSLDPKSLKDIRMRF
A27	DPKSLKDIRMRLNG
A28	SLKDIRMRLNGVQA
A29	DIRMRLNGVQATYW
A30	MRFLNGVQATYWEML
B1	LNGVQATYWEMLDEG
B2	VQATYWEMLDEGRIS
B3	TYWEMLDEGRISEVT
B4	EMLDEGRISEVTANI
B5	DEGRISEVTANILMQ
B6	RISEVTANILMQSVD
B7	EVTANILMQSVDEAL

B8	ANILMQSVDEALDQV
B9	LMQSVDEALDQVSTT
B10	SVDEALDQVSTTLCD
B11	EALDQVSTTLCDWRG
B12	DQVSTTLCDWRGLKP
B13	STTLCDWRGLKPHVN
B14	LCDWRGLKPHVFNPN
B15	WRGLKPHVFNPNYYN
B16	LKPHVFNPNYYNFLH
B17	HVNFPNYYNFLHSKV
B18	FPNYYNFLHSKVVPR
B19	YYNFLHSKVVPRKLV
B20	FLHSKVVPRKLVTYF
B21	SKVVPRKLVTYFAVE
B22	VPRKLVTYFAVERLE
B23	KLVTYFAVERLESAC
B24	TYFAVERLESACYIS
B25	AVERLESACYISAAF
B26	RLESACYISAAFLRA
B27	SACYISAAFLRAHTI
B28	YISAAFLRAHTIARQ
B29	AAFLRAHTIARQQLY
B30	LRAHTIARQQLYDFL
C1	HTIARQQLYDFLGES
C2	ARQQLYDFLGESNIG
C3	QLYDFLGESNIGSIV
C4	DFLGESNIGSIVINE
C5	GESNIGSIVINESEK
C6	NIGSIVINESEKEGE
C7	SIVINESEKEGEEAK
C8	INESEKEGEEAKKFL
C9	SEKEGEEAKKFLEKV
C10	EGEEAKKFLEKVRSS
C11	EAKKFLEKVRSSFPQ
C12	KFLEKVRSSFPQVLR
C13	EKVRSSFPQVLRVVK
C14	RSSFPQVLRVVKTKQ
C15	FPQVLRVVKTKQVTY
C16	VLRVVKTKQVTYSVL
C17	VVKTKQVTYSVLNHL
C18	TKQVTYSVLNHLGTY
C19	VTYSVLNHLGTYIEN

C20	SVLNHLLGYIENLEK
C21	NHLLGYIENLEKVGL
C22	LGYIENLEKVGLLEE
C23	IENLEKVGLLEEKEI
C24	LEKVGLLEEKEIAHL
C25	VGLLEEKEIAHLHDA
C26	LEEKEIAHLHDAVQT
C27	KEIAHLHDAVQTGLK
C28	AHLHDAVQTGLKLL
C29	HDAVQTGLKLLRNP
C30	VQTGLKLLRNPIV
D1	GLKLLRNPIVKLP
D2	KLLRNPIVKLPKLS
D3	RNPIVKLPKLSDMI
D4	PIVKLPKLSDMITSH
D5	KLPKLSDMITSHPLS
D6	KLSDMITSHPLSVAL
D7	DMITSHPLSVALPPA
D8	TSHPLSVALPPAFCE
D9	PLSVALPPAFCEPLK
D10	VALPPAFCEPLKHSK
D11	PPAFCEPLKHSKKEP
D12	FCEPLKHSKKEPMKL
D13	PLKHSKKEPMKLRGV
D14	HSKKEPMKLRGVTLY
D15	KEPMKLRGVTLYKEG
D16	MKLRGVTLYKEGSKP
D17	RGVTLYKEGSKPTGV
D18	TYKEGSKPTGVWLI
D19	KEGSKPTGVWLIFDG
D20	SKPTGVWLIFDGIVK
D21	TGVWLIFDGIVKWKS
D22	WLIFDGIVKWKSKIL
D23	FDGIVKWKSKILSNN
D24	IVKWKSKILSNNHSL
D25	WWSKILSNNHSLHPT
D26	KILSNNHSLHPTFSH
D27	SNNHSLHPTFSHGST
D28	HSLHPTFSHGSTLGL
D29	HPTFSHGSTLGLYEV
D30	FSHGSTLGLYEVLTG
E1	GSTLGLYEVLTGKPY
E2	LGLYEVLTGKPYLCD
E3	YEVLTGKPYLCDLIT

E4	LTGKPYLCDLITDSM
E5	KPYLCDLITDSMVLC
E6	LCDLITDSMVLCFFI
E7	LITDSMVLCFFIDSE
E8	DSMVLCFFIDSEKIL
E9	VLCFFIDSEKILSLQ
E10	FFIDSEKILSLQSDS
E11	DSEKILSLQSDSTID
E12	KILSLQSDSTIDDFL
E13	SLQSDSTIDDFLWQE
E14	SDSTIDDFLWQESAL
E15	TIDDFLWQESALVLL
E16	DFLWQESALVLLKLL
E17	WQESALVLLKLLRPQ
E18	SALVLLKLLRPQIFE
E19	VLLKLLRPQIFESVA
E20	KLLRPQIFESVAMQE
E21	RPQIFESVAMQELRA
E22	IFESVAMQELRALVS
E23	SVAMQELRALVSTES
E24	MQELRALVSTESSKL
E25	LRALVSTESSKLTTY
E26	LVSTESSKLTTYVTG
E27	TESSKLTTYVTGESI
E28	SKLTTYVTGESIEID
E29	TTYVTGESIEIDCNS
E30	VTGESIEIDCNSIGL
F1	ESIEIDCNSIGLLE
F2	EIDCNSIGLLEGFV
F3	CNSIGLLEGFVKPV
F4	IGLLEGFVKPVGIK
F5	LLEGFVKPVGIKEEL
F6	GFVKPVGIKEELISS
F7	KPVGIKEELISSPAA
F8	GIKEELISSPAALSP
F9	EELISSPAALSPSNG
F10	ISSPAALSPSNGNQS
F11	PAALSPSNGNQS FHN
F12	LSPSNGNQS FHN SSE
F13	SNGNQS FHN SSE ASG
F14	NQS FHN SSE ASG IMR
F15	FHN SSE ASG IMR VSF
F16	SSE ASG IMR VSF SQ
F17	ASG IMR VSF SQ ATQ

F18	IMRVFSQQATQYIV
F19	VSFSQQATQYIVETR
F20	SQQATQYIVETRARA
F21	ATQYIVETRARAIIF
F22	YIVETRARAIIFNIG
F23	ETRARAIIFNIGAFG
F24	ARAIIFNIGAFGADR
F25	IIFNIGAFGADRTLH
F26	NIGAFGADRTLHRRP
F27	AFGADRTLHRRPSSL
F28	ADRTLHRRPSSLTPP
F29	TLHRRPSSLTPPRSS
F30	RRPSSLTPPRSSSSD
G1	SSLTPPRSSSDQLQ
G2	TPPRSSSDQLQRSF
G3	RSSSDQLQRSFRKE
G4	SSDQLQRSFRKEHRG
G5	QLQRSFRKEHRGLMS
G6	RSFRKEHRGLMSWPE
G7	RKEHRGLMSWPENIY
G8	HRGLMSWPENIYAKQ
G9	LMSWPENIYAKQQQE
G10	WPENIYAKQQQEINK
G11	NIYAKQQQEINKTTL
G12	AKQQQEINKTTLSLS
G13	QQEINKTTLSLSERA
G14	INKTTLSLSERAMQL
G15	TTLSSLERAMQLSIF
G16	SLSERAMYQSIFGSM
G17	ERAMYQSIFGSMVNV
G18	MYQSIFGSMVNVYRR
G19	SIFGSMVNVYRRSVS
G20	GSMVNVYRRSVSFGG
G21	VNVYRRSVSFGGIYN
G22	YRRSVSFGGIYNNKL
G23	SVSFGGIYNNKLQDN
G24	FGGIYNNKLQDNLLY
G25	IYNNKLQDNLLYKKL
G26	NKLQDNLLYKKLPLN
G27	QDNLLYKKLPLNPAQ
G28	LLYKKLPLNPAQGLV
G29	KKLPLNPAQGLVSAK
G30	PLNPAQGLVSAKSES
H1	PAQGLVSAKSESSIV

H2	GLVSAKSESSIVTKK
H3	SAKSESSIVTKKQLE
H4	SESSIVTKKQLETRK
H5	SIVTKKQLETRKHAC
H6	TKKQLETRKHACQLP
H7	QLETRKHACQLPLKG
H8	TRKHACQLPLKGESS
H9	HACQLPLKGESSTRQ
H10	QLPLKGESSTRQNTM
H11	LKGESSTRQNTMVES
H12	ESSTRQNTMVESSEDE
H13	TRQNTMVESSEDEEDE
H14	NTMVESSEDEEDEDEG
H15	VESSDEEDEDEGIVV
H16	SDEEDEDEGIVVRID
H17	EDEDEGIVVRIDSPS
H18	DEGIVVRIDSPSKIV
H19	IVVRIDSPSKIVFRN
H20	VRIDSPSKIVFRNDL
H21	-
H22	-
H23	-
H24	-
H25	-
H26	-
H27	-
H28	-
H29	-
H30	-
I1	-
I2	-
I3	-
I4	-
I5	IVTKKQLETRKHACQ
I6	KKQLETRKHACQLPL
I7	LETRKHACQLPLKGE
I8	RKHACQLPLKGESST
I9	ACQLPLKGESSTRQN
I10	LPLKGESSTRQNTMV
I11	KGESSTRQNTMVESSE
I12	SSTRQNTMVESSEDEE
I13	RQNTMVESSEDEEDEDE
I14	TMVESSEDEEDEDEGI
I15	ESSDEEDEDEGIVVR



I16	DEEDEDEGIVVRIDS
I17	DEDEGIVVRIDSPDK
I18	EGIVVRIDSPDKIVF
I19	VVRIDSPDKIVFRND
I20	VRIDSPDKIVFRNDL
I21	-
I22	-
I23	-

I24	-
I25	-
I26	-
I27	-
I28	-
I29	-
I30	-

**Tabelle 8.4: Beladungsmuster der Zellulosemembran mit Peptid-Spots des AtTST1 Loops**

Spot Nummer	TST1 Loop Sequenz
A1	LPESPRWLVS KGRMDEAKRV
A2	SPRWLVS KGRMDEAKRVLQQ
A3	WLVS KGRMDEAKRVLQQLCG
A4	SKGRMDEAKRVLQQLCGRED
A5	RMDEAKRVLQQLCGREDVTD
A6	EAKRVLQQLCGREDVTDEMA
A7	RVLQQLCGREDVTDEMALLV
A8	QQLCGREDVTDEMALLVEGL
A9	CGREDVTDEMALLVEGLDIG
A10	EDVTDEMALLVEGLDIGGEK
A11	TDEMALLVEGLDIGGEKTME
A12	MALLVEGLDIGGEKTMEDLL
A13	LVEGLDIGGEKTMEDLLVTL
A14	GLDIGGEKTMEDLLVTLEDH
A15	IGGEKTMEDLLVTLEDHEGD
A16	EKTMEDLLVTLEDHEGDDTL
A17	MEDLLVTLEDHEGDDTLETV
A18	LLVTLEDHEGDDTLETVDED
A19	TLEDHEGDDTLETVDEDGQM
A20	DHEGDDTLETVDEDGQMRLY
A21	GDDTLETVDEDGQMRLYGTH
A22	TLETVDEDGQMRLYGTHENQ
A23	TVDEDGQMRLYGTHENQSYL
A24	EDGQMRLYGTHENQSYLARP
A25	QMRLYGTHENQSYLARPVPE
A26	LYGTHENQSYLARPVPEQNS
A27	THENQSYLARPVPEQNSSLG
A28	NQSYLARPVPEQNSSLGLRS

A29	YLARPVPEQNSSLGLRSRHG
A30	RPVPEQNSSLGLRSRHGSLA
B1	PEQNSSLGLRSRHGSLANQS
B2	NSSLGLRSRHGSLANQSMIL
B3	LSLRSRHGSLANQSMILKDP
B4	RSRHGSLANQSMILKDPLVN
B5	HGSLANQSMILKDPLVNLFG
B6	LANQSMILKDPLVNLFGSLH
B7	QSMILKDPLVNLFGSLHEKM
B8	ILKDPLVNLFGSLHEKMPEA
B9	DPLVNLFGSLHEKMPEAGGN
B10	VNLFGSLHEKMPEAGGNTRS
B11	FGSLHEKMPEAGGNTRSGIF
B12	LHEKMPEAGGNTRSGIFPHF
B13	KMPEAGGNTRSGIFPHFGSM
B14	EAGGNTRSGIFPHFGSMFST
B15	GNTRSGIFPHFGSMFSTTAD
B16	RSGIFPHFGSMFSTTADAPH
B17	IFPHFGSMFSTTADAPHGKP
B18	HFGSMFSTTADAPHGKPAHW
B19	SMFSTTADAPHGKPAHWEKD
B20	STTADAPHGKPAHWEKDIES
B21	ADAPHGKPAHWEKDIESHYN
B22	PHGKPAHWEKDIESHYNKDN
B23	KPAHWEKDIESHYNKDNDY
B24	HWEKDIESHYNKDNDYATD
B25	KDIESHYNKDNDYATDDGA
B26	ESHYNKDNDYATDDGAGDD
B27	YNKDNDYATDDGAGDDDDSD
B28	DNDDYATDDGAGDDDDSDND
B29	DYATDDGAGDDDDSDNDLRS
B30	TDDGAGDDDDSDNDLRSPLM
C1	GAGDDDDSDNDLRSPLMSRQ

C2	DDDDSDNDLRSPLMSRQTTS
C3	DSDNDLRSPLMSRQTTSMDK
C4	NDLRSPLMSRQTTSMDKDMI
C5	RSPLMSRQTTSMDKDMIPHP
C6	LMSRQTTSMDKDMIPHPTSG
C7	RQTTSMDKDMIPHPTSGSTL
C8	TSMDKDMIPHPTSGSTLSMR
C9	DKDMIPHPTSGSTLSMRRHS
C10	MIPHPTSGSTLSMRRHSTLM
C11	HPTSGSTLSMRRHSTLMQGN
C12	SGSTLSMRRHSTLMQNGES
C13	TLSMRRHSTLMQNGESSMG
C14	MRRHSTLMQNGESSMGIGG
C15	HSTLMQNGESSMGIGGGWH
C16	LMQNGESSMGIGGGWHMGY
C17	NGESSMGIGGGWHMGYRYE
C18	ESSMGIGGGWHMGYRYENDE
C19	MGIGGGWHMGYRYENDEYKR
C20	GGGWHMGYRYENDEYKRYYL
C21	WHMGYRYENDEYKRYYLKED
C22	GYRYENDEYKRYYLKEDGAE
C23	YENDEYKRYYLKEDGAESRR
C24	DEYKRYYLKEDGAESRRGSI
C25	KRYYLKEDGAESRRGSIISI
C26	YLKEDGAESRRGSIISIPGG
C27	EDGAESRRGSIISIPGGPDG
C28	AESRRGSIISIPGGPDGGGS
C29	RRGSIISIPGGPDGGGSYIH
C30	SIISIPGGPDGGGSYIHASA
D1	SIPGGPDGGGSYIHASALVS
D2	GGPDGGGSYIHASALVSRV
D3	DGGGSYIHASALVSRVSLGP
D4	GSYIHASALVSRVSLGPKSV
D5	IHASALVSRVSLGPKSVHGS
D6	SALVSRVSLGPKSVHGSAMV
D7	VSRVSLGPKSVHGSAMVPPE
D8	SVLGPKSVHGSAMVPPEKIA
D9	GPKSVHGSAMVPPEKIAASG
D10	SVHGSAMVPPEKIAASGPLW
D11	GSAMVPPEKIAASGPLWSAL
D12	MVPPEKIAASGPLWSALLEP
D13	PEKIAASGPLWSALLEPGVK
D14	IAASGPLWSALLEPGVKVKR
D15	-

D16	-
D17	-
D18	-
D19	-
D20	-
D21	-
D22	-
D23	-
D24	-
D25	-
D26	-
D27	-
D28	-
D29	-
D30	-
E1	-
E2	-
E3	-
E4	-
E5	-
E6	-
E7	-
E8	-
E9	-
E10	-
E11	-
E12	-
E13	-
E14	-
E15	-
E16	-
E17	-
E18	-
E19	-
E20	-
E21	-
E22	-
E23	-
E24	-
E25	-
E26	-
E27	-
E28	-
E29	-

E30	-
F1	LPESPRWLVSJKGRMDEAKRV
F2	SPRWLVSKGRMDEAKRVLQQ
F3	WLVSJKGRMDEAKRVLQQLCG
F4	SKGRMDEAKRVLQQLCGRED
F5	RMDEAKRVLQQLCGREDVTD
F6	EAKRVLQQLCGREDVTDEMA
F7	RVLQQLCGREDVTDEMALLV
F8	QQLCGREDVTDEMALLVEGL
F9	CGREDVTDEMALLVEGLDIG
F10	EDVTDEMALLVEGLDIGGEK
F11	TDEMALLVEGLDIGGEKTME
F12	MALLVEGLDIGGEKTMEDLL
F13	LVEGLDIGGEKTMEDLLVTL
F14	GLDIGGEKTMEDLLVTLEDH
F15	IGGEKTMEDLLVTLEDHEGD
F16	EKTMEDLLVTLEDHEGDDTL
F17	MEDLLVTLEDHEGDDTLETV
F18	LLVTLEDHEGDDTLETVDED
F19	TLEDHEGDDTLETVDEDGQM
F20	DHEGDDTLETVDEDGQMRLY
F21	GDDTLETVDEDGQMRLYGTH
F22	TLETVDEDGQMRLYGTHENQ
F23	TVDEDGQMRLYGTHENQDYL
F24	EDGQMRLYGTHENQDYLARP
F25	QMRLYGTHENQDYLARPVPE
F26	LYGTHENQDYLARPVPEQN
F27	THENQDYLARPVPEQNDSL
F28	NQDYLARPVPEQNDSLGLR
F29	YLARPVPEQNDSLGLRDRHG
F30	RPVPEQNDSLGLRDRHGD
G1	PEQNDSLGLRDRHGDLANQS
G2	NSSLGLRDRHGDLANQSMIL
G3	LSLRDRHGDLANQSMILKDP
G4	RDRHGDLANQSMILKDPLVN
G5	HGDLANQSMILKDPLVNLFG
G6	LANQSMILKDPLVNLFGDLH
G7	QSMILKDPLVNLFGDLHEKM
G8	ILKDPLVNLFGDLHEKMPEA
G9	DPLVNLFGDLHEKMPEAGGN
G10	VNLFGDLHEKMPEAGGNTRS
G11	FGDLHEKMPEAGGNTRSGIF
G12	LHEKMPEAGGNTRSGIFPHF
G13	KMPEAGGNTRSGIFPHFGSM

G14	EAGNTRSGIFPHFGSMFST
G15	GNTRSGIFPHFGSMFSTTAD
G16	RSGIFPHFGSMFSTTADAPH
G17	IFPHFGSMFSTTADAPHGKP
G18	HFGSMFSTTADAPHGKPAHW
G19	SMFSTTADAPHGKPAHWEKD
G20	STTADAPHGKPAHWEKDIES
G21	ADAPHGKPAHWEKDIESHYN
G22	PHGKPAHWEKDIESHYNKDN
G23	KPAHWEKDIESHYNKDNDDY
G24	HWEKDIESHYNKDNDDYATD
G25	KDIESHYNKDNDDYATDDGA
G26	ESHYNKDNDDYATDDGAGDD
G27	YNKDNDDYATDDGAGDDDD
G28	DNDDYATDDGAGDDDD
G29	DYATDDGAGDDDD
G30	TDDGAGDDDD
H1	GAGDDDD
H2	DDDD
H3	DD
H4	NDLRSPLMSRQTTSMDKMI
H5	RSPLMSRQTTSMDKMIHPH
H6	LMSRQTTSMDKMIHPHPTSG
H7	RQTTSMDKMIHPHPTSGSTL
H8	TSMDKMIHPHPTSGSTLSMR
H9	DKMIHPHPTSGSTLSMRRHS
H10	MIPHPTSGSTLSMRRHSTLM
H11	HPTSGSTLSMRRHSTLMQGN
H12	SGSTLSMRRHSTLMQNGES
H13	TLSMRRHSTLMQNGESSMG
H14	MRRHSTLMQNGESSMGIGG
H15	HSTLMQNGESSMGIGGGWH
H16	LMQNGESSMGIGGGWHMGY
H17	GNGESSMGIGGGWHMGYRYE
H18	ESSMGIGGGWHMGYRYENDE
H19	MGIGGGWHMGYRYENDEYKR
H20	GGGWHMGYRYENDEYKRYL
H21	WHMGYRYENDEYKRYLKD
H22	GYRYENDEYKRYLKDGAE
H23	YENDEYKRYLKDGAESRR
H24	DEYKRYLKDGAESRRGSI
H25	KRYLKDGAESRRGSIISI
H26	YLKDGAESRRGSIISIPGG
H27	EDGAESRRGSIISIPGGPDG

H28	AESRRGSIISIPGGPDGGGS
H29	RRGSIISIPGGPDGGGSYIH
H30	SIISIPGGPDGGGSYIHASA
I1	SIPGGPDGGGSYIHASALVS
I2	GGPDGGGSYIHASALVRSV
I3	DGGGSYIHASALVRSVLGP
I4	GSYIHASALVRSVLGPKSV
I5	IHASALVRSVLGPKSVHGS
I6	SALVRSVLGPKSVHGSAMV
I7	VRSVLGPKSVHGSAMVPPE
I8	SVLGPKSVHGSAMVPPEKIA
I9	GPKSVHGSAMVPPEKIAASG
I10	SVHGSAMVPPEKIAASGPLW
I11	GSAMVPPEKIAASGPLWSAL
I12	MVPPEKIAASGPLWSALLEP
I13	PEKIAASGPLWSALLEPGVK
I14	IAASGPLWSALLEPGVKVKR
I15	-

I16	-
I17	-
I18	-
I19	-
I20	-
I21	-
I22	-
I23	-
I24	-
I25	-
I26	-
I27	-
I28	-
I29	-
I30	-

**Poster und Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen und Meetings**

Vortrag: „Investigations on the necessity and function of the C-terminal tail of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger SOS1” - Fourth Joint Symposium des IRTG 1830, September 2015, Bad Dürkheim, Deutschland

Vortrag: „Characterization of an Arabidopsis mutant overexpressing the SOS1 C-terminus” - 2. Kolloquium des DFG-geförderten Internationalen Graduiertenkollegs IRTG 1830, Oktober 2014, Orscholz, Deutschland

Poster: „AtSOS1: a Sodium/Proton antiporter from *Arabidopsis thaliana*” - CSMB meeting, April 2014, Banff, Kanada

Vortrag: „AtSOS1: a Sodium/Proton antiporter from *Arabidopsis thaliana*” - Third Joint Symposium des IRTG 1830, April 2014, Banff, Kanada

Poster: „Salt stress signaling: Approaches to shed further light on the corresponding network” - Second Joint Symposium des IRTG 1830, August 2013, Bad Münster, Deutschland

Poster: „Salt stress signaling: Approaches to shed further light on the corresponding network“ - SPS conference, Juli 2013, Paris, Frankreich

Poster: „Salt stress signaling: Shedding further light on the SOS network“ - International Workshop on Plant Membrane Biology, März 2013, Kurashiki, Japan

Vortrag: „SOS1: A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*” - 1. Kolloquium des DFG-geförderten Internationalen Graduiertenkollegs IRTG 1830, März 2013, Freinsheim, Deutschland

Poster: „SOS1: A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*” - First Joint Symposium des IRTG 1830, August 2012, Jasper, Kanada

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und die Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Deitmer für die Erstellung des Zweitgutachtens und bei Prof. Dr. Matthias Hahn für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission herzlich bedanken.

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Larry Fliegel und seiner gesamten Arbeitsgruppe, sowie bei allen anderen Doktoranden und Freunden, die ich in Edmonton kennen gelernt habe und die meine Zeit in Kanada unvergesslich gemacht haben.

Bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der AG Neuhaus möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei fachlichen sowie persönlichen Fragen bedanken. Dabei möchte ich besonders Irina, Sabrina, Kathrin, Jaccy, Lisa, Garvin, Chris und Torsten danken. Bei Christa, Ruth und Ute möchte ich mich für die Hilfe bei allen allgemeinen und organisatorischen Fragestellungen bedanken. Maike und Wolfgang danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei den IC-Messungen. Bei Gabi und Malika bedanke ich mich für die tolle Organisation rund ums IRTG und die Aufenthalte in Kanada. Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank natürlich Maria für die tolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die super Betreuung und eine sehr schöne Zeit in Kaiserslautern und darüber hinaus.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Praktikanten, Hiwis und Bachelor-Studenten, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und mir viele Stunden des Mörserns abgenommen haben. Dieser Dank gilt vor allem Crissi und Andi.

Außerdem möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des IRTG 1830 für die tolle Zeit während unserer gemeinsamen Konferenzen, Seminare und Workshops bedanken.

Ich danke meinen Freunden und Verwandten zu Hause in Würzburg und überall sonst, die mich immer bereitwillig auf andere Gedanken gebracht haben. Besonderer Dank gilt dabei meinem Bruder und Franz, die immer ein offenes Ohr für mich haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Ich danke Stephan für seine Unterstützung (und Ablenkung) gegen Ende meiner Arbeit.

Und zum Schluss bedanke ich mich besonders bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und es noch tun und die immer an mich geglaubt haben.

## **Lebenslauf**

**Name:** Kerstin Duscha

### **Schullaufbahn:**

09.1993-07.1997 Grundschule Greußenheim  
09.1997-06.2006 Friedrich-Koenig-Gymnasium Würzburg

### **Studium:**

10.2006-12.2011 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
03.2011-12.2011 Diplomarbeit in der Abteilung Biotechnologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Benz  
Thema: Charakterisierung der Bindeeigenschaften von Protective Antigen von *Bacillus anthracis*  
02.2010-07.2010 Auslandsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. Cesare Montecucco, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova, Italien

### **Promotion:**

06.2012-12.2016 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus  
Thema: Regulation von Zucker- und Ionentransport in *Arabidopsis thaliana* mit besonderer Berücksichtigung von Transportern und regulatorischen Proteinen  
06.2012-06.2015 Mitglied in der DFG-geförderten International Research and Training Group 1830: Membrane Proteins

### **Forschungsaufenthalte:**

01.2014-04.2014 Forschungsaufenthalte im Labor von Prof. Dr. Larry Fliegel,  
07.2015-09.2015 Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Kanada

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

Kaiserslautern, im September 2016

---

Kerstin Duscha