

**Die Rolle der vakuolären NHX-Transporter bei  
der Auslösung der Biosynthese von  
Benzophenanthridin-Alkaloiden in  
*Eschscholzia californica***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Sophie Weigl

geboren am 26.06.1982 in Halle (Saale)

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Werner Roos
2. Prof. Dr. Karin Breunig
3. Prof. Dr. Karin Schumacher

Datum der Verteidigung: 08.04.2015

## **Veröffentlichungen:**

**Weigl, S., Brandt, W., Langhammer, R. and Roos, W.** The vacuolar proton-cation exchanger EcNHX1 generates pH-signals for the expression of secondary metabolism in *Eschscholzia californica*. (in preparation)

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

*(Galileo Galilei)*

	Inhalt
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 NHX-Antiporter sind essentielle Komponenten der pflanzlichen Vakuole	1
1.2 Pflanzliche Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter: Evolution, Struktur und Funktion	2
1.2.1 CPA1-Familie	4
1.2.2 CPA2-Familie	6
1.3 Intrazelluläre Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter der Pflanze (NHX)	7
1.3.1 Expression und Lokalisation in pflanzlichen Organen	7
1.3.2 Topologie	8
1.3.3 Struktur-Funktions-Analyse	10
1.3.4 Modulation von NHX-Antiportern durch Protein-Protein-Interaktion	14
1.3.5 Heterologe Expression von pflanzlichen NHX-Antiportern in Hefezellen	14
1.3.6 Zelluläre Funktionen von NHX-Antiportern	17
1.3.6.1 K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -Homöostase und Salzstress	17
1.3.6.2 Regulation des zellulären pH	19
1.3.6.3 Funktionen der NHX-Antiporter beim Vesikeltransfer und protein targeting	20
1.4 Intrazelluläre pH-shifts als Signale zur Auslösung des Sekundärstoffwechsels in <i>Eschscholzia californica</i>	21
1.4.1 Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LPC)	24
1.5 Zielstellung der vorliegenden Arbeit	26

<b>2. Material und Methoden</b>	27
2.1 Chemikalien	27
2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	27
2.3 Kitsysteme	27
2.4 Oligonukleotide	27
2.5 Enzyme und Polymerasen	27
2.6 Plasmide und Mikroorganismen	28
2.7 Zellkultivierung	28
2.7.1 Pflanzenzellen ( <i>Eschscholzia californica</i> )	28
2.7.2 Hefezellen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	29
2.7.3 Nährmedien	29
2.8 Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1 Gewinnung genomischer DNA	30
2.8.2 Gewinnung von Gesamt-RNA	30
2.8.3 Gewinnung von mRNA	30
2.8.4 Synthese von cDNA	31
2.8.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.8.6 <b>R</b> apid <b>A</b> mplification of <b>c</b> DNA <b>E</b> nds (RACE)	32
2.8.6.1 nested RACE-PCR	33
2.8.7 Semiquantitative RT-PCR	34
2.8.8 Kontroll-PCR (Flanken)	35
2.8.9 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen	35
2.8.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	35
2.8.11 Extraktion von DNA aus Reaktionsansätzen	35
2.8.12 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	35
2.8.13 Klonierung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	35
2.8.13.1 pDrive-Vektor-Klonierung	35

2.8.13.2 pJET1.2/blunt-Vektor-Klonierung	36
2.8.13.3 pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> -Vektor-Klonierung	36
2.8.13.4 In-Fusion <sup>®</sup> HD Klonierung in den pBlueScript II-Vektor	36
2.8.14 Gateway-Klonierung	37
2.8.15 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	37
2.8.16 Ligation	38
2.8.17 DNA-Sequenzierung	38
2.8.18 Herstellung kompetenter Zellen	39
2.8.18.1 <i>E.coli</i>	39
2.8.18.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.8.19 Transformation von Zellen	40
2.8.19.1 Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i>	40
2.8.19.2 Transformation von Hefezellen	40
2.8.19.3 Biolistische Transformation von Pflanzenzellen	40
2.8.20 Selektion transformierter Zellen	41
2.8.20.1 <i>E.coli</i>	41
2.8.20.2 Hefezellen	42
2.8.20.3 Pflanzenzellen ( <i>Eschscholzia californica</i> )	42
2.8.21 Plasmid Präparationen	43
2.8.21.1 Mini-Plasmid Präparation durch alkalische Lyse	43
2.8.21.2 Plasmidpräparation mit Kit-Systemen	43
2.8.22 Gene silencing	44
2.8.22.1 Destination-Vektor	44
2.8.22.2 RNAi-vermittelnde Zielsequenzen	44
2.8.22.3 RNAi-vermittelnde Expressionsvektoren	44
2.8.23 Heterologe Genexpression in Hefe	45
2.8.23.1 Hefestämme	45

	Inhalt
2.8.23.2 Klonierung der EcNHX1-4 ORF's	45
2.8.23.3 Klonierung der Expressionsvektoren	46
2.8.23.4 Hefe-Transformanten	46
2.9 Biochemische Methoden	47
2.9.1 Extraktion von Membranprotein aus Hefezellen	47
2.9.2 Extraktion von Tonoplastenprotein aus pflanzlicher Zellkultur	47
2.9.3 Proteinbestimmung	48
2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.9.5 Western Blot	49
2.9.6 Ponceau-Färbung	49
2.9.7 Immuno-Detektion	50
2.9.8 Antikörper	50
2.9.9 Alkaloid-Messung	51
2.10 Methodenentwicklung	52
2.10.1 Messung des vakuolären pH durch Fluoreszenzspektroskopie	52
2.10.1.1 5-Carboxyfluoreszein (5-CF)	53
2.10.2 Verfahren der fluorimetrischen pH-Messung	54
2.10.2.1 Beladen der Zellen mit 5-Carboxyfluoreszein	54
2.10.2.2 Ratiometrische Messung des pH-shift (excitation ratioing)	55
2.10.2.3 Kalibrierung	55
2.10.2.4 Effektoren und wirksame Konzentrationen	56
2.10.2.5 Berechnung des pH-shift	57
2.10.3 Permeabilisierung der Plasmamembran zum Nachweis vakuolärer Protonenfluxe	57
2.10.3.1 Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran	58
2.10.4 Die Messung des vakuolären pH-Wertes in Hefezellen	59
2.10.5 Variabilität der Messwerte	61

<b>3. Ergebnisse</b>	63
3.1 Charakteristika des Protonentransports an der Vakuole von Zellen aus <i>Eschscholzia californica</i>	63
3.2 Identifizierung vakuolärer Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter (NHX1-4) in <i>Eschscholzia californica</i>	66
3.3 Charakterisierung der vakuolären Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter (EcNHX1-4)	69
3.3.1 Konservierte Domänen	69
3.3.2 Vergleich der EcNHX1-4 Transporter mit ihren pflanzlichen Homologen	70
3.3.3 Topologie und Funktion	72
3.3.4 Die Expression der NHX-Gene in <i>Eschscholzia californica</i>	75
3.4 Silencing der NHX-Gene von <i>Eschscholzia californica</i> durch RNAi	76
3.4.1 DNA-Sequenzen für das silencing von NHX-Genen	76
3.4.2 Selektion der RNA-silencing Mutanten	78
3.4.3 Charakterisierung der RNA-silencing Mutanten	80
3.4.3.1 Ausmaß des NHX-silencing	80
3.4.3.2 Wirkung des RNAi-basierten silencing auf die Aktivität der NHX-Transporter	82
3.5 Der Signaltransfer zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in Zellkulturen mit RNAi-vermitteltem silencing der vakuolären NHX-Antiporter	84
3.5.1 Elicitor-ausgelöste Alkaloid-Produktion	84
3.5.2 Messung des Elicitor-ausgelösten H <sup>+</sup> -Efflux in NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	85
3.5.3 LPC-vermittelter H <sup>+</sup> -Efflux in NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	87
3.6 Heterologe Expression von EcNHX-Antiporter in Hefezellen	89
3.6.1 Ausgangspunkte	89
3.6.2 Nachweis der heterologen Expression von EcNHX-Transportern in rekombinaten Stämmen der $\Delta nhx$ -Nullmutante	90
3.6.2.1 Nachweis der NHX-Transkripte von <i>Eschscholzia californica</i> im Transkriptom rekombinanter Hefestämme	90

3.6.2.2 Nachweis der EcNHX-Proteine in rekombinanten Hefestämmen	91
3.6.2.3 Funktionstest der rekombinanten NHX-Proteine aus <i>Eschschozia californica</i> in rekombinanten Hefestämmen	92
3.6.3 Reaktion der rekombinanten EcNHX-Antiporter auf LPC	94
3.7 Struktur der LPC-Bindedomäne (3D modelling)	98
<b>4. Diskussion</b>	101
4.1 Die NHX-Antiporter von <i>Eschschozia californica</i> und ihre Rolle im pH-ausgelösten Signaltransfer	101
4.2 Die NHX-Antiporter von <i>Eschschozia californica</i> und ihre Evolution	102
4.3 Weiterführende Aspekte	103
<b>5. Zusammenfassung</b>	105
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	107
<b>7. Anhang</b>	118
7.1 Auflistung der:	118
7.1.1 Geräte	118
7.1.2 Verbrauchsmaterialien	119
7.1.3 Software	119
7.1.4 Kitsysteme	119
7.2 Zusammensetzung von Nährmedien	120
7.3 Oligonukleotide zur Anwendung in:	122
7.3.1 Standard- und RACE-PCR	122
7.3.2 semiquantitative RT-PCR	124
7.3.3 Kontroll-PCR (Flanken)	125
7.3.4 Kolonie-PCR	125
7.3.5 In- Fusion <sup>®</sup> HD Klonierung	126
7.3.6 Klonierung der EcNHX2-4 ORF's	126
7.4 Puffer und Marker zur Anwendung in:	127
7.4.1 DNA-Elektrophorese	127

	Inhalt
7.4.2 Extraktion von Membranproteinen aus Hefe	128
7.4.3 Extraktion von Tonoplastenprotein aus Pflanzenzellen	128
7.4.4 SDS-PAGE	129
7.4.5 Immuno-Detektion	130
7.5 Reaktionsansätze:	130
7.5.1 Kontroll-PCR (Flanken)	130
7.5.2 In-Fusion <sup>®</sup> HD-Klonierung	130
7.5.3 Klonierung der EcNHX2-4 ORF's	131
7.6 Vektorkarten:	132
7.6.1 Destination-Vektor	132
7.6.2 Hefe-Expressionsvektor	133
7.7 Verwendete Spezies in Chanroj et al., 2012:	134
7.7.1 Abbildung 1	134
7.7.1 Abbildung 2	137
7.8 Konservierte Domänen	142
7.9 Vergleich der EcNHX1-4 Transporter mit ihren pflanzlichen Homologen	143
7.10 Wachstum der transgenen Zellstämme	148
7.11 Nachweis von NHX-Proteinen in <i>Eschscholzia californica</i>	149

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b>Abb.1:</b> Übersicht zur Evolution der CPA1- und CPA2-Familie aus Vorläuferproteinen von Bakterien und Cyanobakterien, auf Basis der zentralen Domäne pfam00999 (aus Chanroj et al., 2012)	3
<b>Abb.2:</b> Die Diversifizierung der CPA1-Gene in drei Kladen während der Evolution der Landpflanzen (aus Chanroj et al., 2012)	5
<b>Abb.3:</b> Topologie-Modell für AtNHX1 (aus Yamaguchi et al., 2003)	9
<b>Abb.4a:</b> Membran-Topologie von NHE1 (vorgeschlagen von Landau et al., 2007)	11
<b>Abb.4b:</b> Die Anordnung der für den Kationen-Austausch entscheidenden Transmembran-Helices in der inaktiven Konformation von NHE1	11
<b>Abb.4c:</b> Der Mechanismus des Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauschs in NHE1	12
<b>Abb.4d:</b> Modell zum alternierenden Austausch des Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporters (NapA)	13
<b>Abb.5:</b> Colokalisation von Pflanzen- und Hefe NHX1-Proteinen (aus Hernández et al., 2009)	16
<b>Abb.6:</b> Blüten-Phenotypen von <i>Ipomoea nil</i> (aus Fukada-Tanaka et al., 2000)	20
<b>Abb.7:</b> Signalwege zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in <i>Eschscholzia californica</i> (aus Roos et al., 2008)	21
<b>Abb.8:</b> Elicitor-ausgelöste Änderungen der intrazellulären pH-Verteilung in <i>Eschscholzia californica</i> (aus Roos et al., 1998)	22
<b>Abb.9:</b> ATP- und LPC-ausgelöste pH-Änderungen von <i>in situ</i> Vakuolen (aus Viehweger et al., 2002)	23
<b>Abb.10:</b> Einfluss von LPC auf den Na <sup>+</sup> -abhängigen H <sup>+</sup> -Efflux an <i>in situ</i> Vakuolen von <i>Eschscholzia californica</i> (aus Viehweger et al., 2002).	25
<b>Abb.11:</b> Die Wirkung von EIPA auf den LPC-ausgelösten Efflux vakuolärer Protonen (aus Viehweger et al., 2002)	25
<b>Abb.12:</b> Nachweis von Histon H1 in cDNA rekombinanter Hefestämme	34
<b>Abb.13:</b> Vorgehensweise bei der Flanken-übergreifende PCR zum Nachweis der Transformation von Zellen aus <i>Eschscholzia californica</i>	34
<b>Abb.14:</b> Prinzip der LR-Reaktion nach dem Gateway®Technology-Handbuch (Invitrogen)	37
<b>Abb.15:</b> Kalibrierung der spektrometrischen Bestimmung von Protein-Konzentrationen mit bovinem Serumalbumin (BSA)	48
<b>Abb.16:</b> Kalibriergeraden zur fluorimetrischen Bestimmung von Benzophenanthridin- und Dihydrobenzophenanthridin-Alkaloiden	52

<b>Abb.17:</b> pH-Abhängigkeit des Exzitations- und Emissionsspektrums von Fluoreszein (siehe Diagramme unten) unter Berücksichtigung seiner fluoreszenzaktiven Dissoziationszustände des Mono- und Dianions (siehe Strukturformeln oben)	54
<b>Abb.18:</b> Nachweis der Farbstoffakkumulation von 5-Carboxyfluoreszein (5-CF) in Vakuolen von <i>Eschscholzia californica</i>	55
<b>Abb.19:</b> Kalibrierkurve für 5-Carboxyfluoreszein in permeablen Zellen von <i>Eschscholzia californica</i>	56
<b>Abb.20:</b> Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran von Zellen aus <i>Eschscholzia californica</i>	59
<b>Abb.21:</b> Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran von Hefezellen	60
<b>Abb.22:</b> Kalibrierung der pH-abhängigen Fluoreszenz von 5-Carboxyfluoreszein in Hefezellen	61
<b>Abb.23:</b> Aktivierung vakuolärer Protonenpumpen (V-ATPasen) durch MgATP	64
<b>Abb.24:</b> Wirkung von LPC und Amilorid auf den Na <sup>+</sup> -abhängigen Protonenefflux an der Vakuole	65
<b>Abb.25:</b> Ableitung NHX-spezifischer Primer für die Suche nach vakuolären NHX-Antiportern in <i>Eschscholzia californica</i>	67
<b>Abb.26:</b> Suche nach NHX-spezifischen Sequenzen in <i>Eschscholzia californica</i>	68
<b>Abb.27:</b> Die pfam00999 Domäne in NHX-Proteinsequenzen von <i>Eschscholzia californica</i>	69
<b>Abb.28:</b> Radialer Familien-Stammbaum	71
<b>Abb.29:</b> Hydropathie-Plots von AtNHX1 im Vergleich zu EcNHX1-4	73
<b>Abb.30:</b> Topologie-Modell aus Yamaguchi et al, 2003 für AtNHX1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in Anwendung auf <i>Eschscholzia californica</i>	74
<b>Abb.31:</b> mRNA-Expression von EcNHX1-4 in Zellkultur von <i>Eschscholzia californica</i>	75
<b>Abb.32:</b> mRNA-Expression der EcNHX1-4 Gene unter Salzstress	76
<b>Abb.33:</b> DNA-Sequenzen für des gene silencing und ihre targets in <i>Eschscholzia californica</i>	77
<b>Abb.34:</b> Nachweis der rechten und linken Vektor-Flanke im Genom transgener Kulturen von <i>Eschscholzia californica</i>	79
<b>Abb.35:</b> Relative mRNA-Expression der EcNHX1-4 Gene in NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	81

<b>Abb.36:</b> Funktionstest der vakuolären NHX-Transporter in NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	83
<b>Abb.37:</b> Elicitor-ausgelöste Alkaloid-Produktion in NHX-silencing Transformanten von <i>Eschscholzia californica</i>	84
<b>Abb.38:</b> Elicitor-ausgelöster Efflux vakuolärer Protonen in intakten Zellen von <i>Eschscholzia californica</i>	85
<b>Abb.39:</b> Elicitor-ausgelöster H <sup>+</sup> -Efflux in NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	86
<b>Abb.40:</b> Wirkung von LPC auf <i>in situ</i> Valuolen von <i>Eschscholzia californica</i>	87
<b>Abb.41:</b> LPC-vermittelter Efflux vakuolärer Protonen in transgenen Zellstämmen von <i>Eschscholzia californica</i>	88
<b>Abb.42:</b> Funktionstest des genuinen NHX-Transporters von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
<b>Abb.43:</b> Expression der EcNHX1-4 Transkripte in rekombinanten Hefestämmen (rH1-4)	91
<b>Abb.44:</b> Western blot zum Nachweis der EcNHX1-4 Proteine nach heterologer Expression in Hefe	91
<b>Abb.45:</b> Funktionstest der vakuolären Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter aus <i>Eschscholzia californica</i> in rekombinanten Hefestämmen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
<b>Abb.46:</b> LPC-vermittelter Protonenefflux in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94
<b>Abb.47:</b> Na <sup>+</sup> -Abhängigkeit des LPC-vermittelten Protonenefflux in Hefe	95
<b>Abb.48:</b> Stimulation der rekombinanten NHX-Transporter aus <i>Eschscholzia californica</i> durch LPC in Hefe	97
<b>Abb.49:</b> Vergleich der potentiellen LPC-Bindedomäne unter den vier NHX-Proteinsequenzen von <i>Eschscholzia californica</i>	99
<b>Abb.50:</b> Vergleich der potentiellen LPC-Bindedomäne unter den vier NHX-Proteinsequenzen von <i>Eschscholzia californica</i>	100
<b>Abb.51:</b> Docking-Modell von LPC in NHX-Transportern von <i>Eschscholzia californica</i>	104
<b>Abb.52:</b> DNA-Größenmarker	127
<b>Abb.53:</b> Protein-Gößenmarker	129
<b>Abb.54:</b> Vektorkarte des RNAi-vermittelnden pK7GWIWG2(II)-Vektors	132
<b>Abb.55:</b> Vektorkarte des p416GAL1-Expressionsvektors für die heterologe Genexpression in Hefe	133

<b>Abb.56:</b> Systematik der Angiospermen (Angiosperm Phylogeny Group (APG III), 2003)	143
<b>Abb.57:</b> Vergleich von NHX-Aminosäuresequenzen aus <i>Eschscholzia californica</i> und anderer Pflanzenfamilien der Angiospermen	145
<b>Abb.58:</b> Wachstumsraten der NHX-silencing Mutanten von <i>Eschscholzia californica</i>	148
<b>Abb.59:</b> Western Blot zur Detektion von NHX-Proteinen in Zellkultur und Geweben der Ganzpflanze von <i>Eschscholzia californica</i>	149

## Tabellenverzeichnis

	Seite
<b>Tab.1:</b> Standard-PCR Programme	31
<b>Tab.2:</b> Liste der rekombinanten Hefestämme zur Expression von NHX-Proteinen aus <i>Eschscholzia californica</i>	47
<b>Tab.3:</b> Liste der in der Standard-PCR verwendeten Primer	70
<b>Tab.4:</b> Liste der in der RACE-PCR verwendeten Primer	124
<b>Tab.5:</b> Liste der in der RT-PCR verwendeten Primer	124
<b>Tab.6:</b> Liste der in der Kontroll-PCR verwendeten Primer	125
<b>Tab.7:</b> Liste der vektorspezifischen Primer zur Anwendung in der Kolonie-PCR	125
<b>Tab.8:</b> Liste der in der In-Fusion <sup>®</sup> HD Klonierung verwendeten Primer	126
<b>Tab.9:</b> Liste der Primer zur Klonierung der für EcNHX2-4 codierenden Sequenzen	126
<b>Tab.10:</b> Tab.1 aus dem supplemental data von Chanroj et al., 2012 wurde hier in die Abschnitte I-IV unterteilt (aus <a href="http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract">http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract</a> )	134
<b>Tab.11:</b> Tab.2 aus dem supplemental data von Chanroj et al., 2012 wurde hier in die Abschnitte I-V unterteilt (aus <a href="http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract">http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract</a> )	137
<b>Tab.12:</b> Liste der in den NHX-Aminosäuresequenzen von <i>Eschscholzia californica</i> identifizierten konservierten Domänen (Stand 2014)	142
<b>Tab.13:</b> Liste im Familien-Stammbaum verwendeter Spezies	144

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A-Überhang</b>	Adenin-Überhang
<b>ABA</b>	Abscisinsäure (abscisic acid)
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>At</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>As</b>	Aminosäuren
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAPTA</b>	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>cDNA</b>	copy Desoxyribonukleinsäure
<b>5-CF</b>	5-Carboxyfluoreszein
<b>CFDA-AM</b>	5-Carboxyfluoreszeindiacetat-Acetoxymethylester
<b>CHAPS</b>	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
<b>CNGCs</b>	Cyclic nucleotide-gated channels
<b>CPA</b>	Kationen/Protonen-Antiporter (cation/proton antiporter)
<b>D</b>	Asparaginsäure (Asp)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilliertes Wasser
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E</b>	Glutaminsäure (Glu)
<b>Ec</b>	<i>Eschscholzia californica</i>
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECL</b>	enhances chemiluminescence
<b>EIPA</b>	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>et al.</b>	und andere
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
<b>GLR</b>	putative glutamate activated channels
<b>K</b>	Lysin (Lys)
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>KEA</b>	K <sup>+</sup> - Efflux Antiporter
<b>Kef</b>	<i>Kef</i> -type K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
<b>KLH</b>	keyhole limpet hemocyanin (Schlitzschnecken-Hämocyanin)
<b>HKT</b>	plant high-affinity K <sup>+</sup> transporter
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase ( Meerrettich-Peroxidase)
<b>LB</b>	Luria-Bertani-Medium

<b>LPC</b>	Lysophosphatidylcholin
<b>m</b>	Masse
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>MYB</b>	<b>myeloblastosis</b>
<b>NADH</b>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
<b>NHE</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger) in Säugetieren
<b>NHX</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger) in Pflanzen und Pilzen
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>4-OMT</b>	3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'O-Methyltransferase
<b>ORF</b>	offener Leserahmen (open reading frame)
<b>Pfu</b>	Pyrococcus furiosus
<b>P-APMSF</b>	4-Amidinophenylmethansulfonylfluorid
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>Q</b>	Glutamin (Gln)
<b>RACE</b>	rapid amplification of cDNA ends
<b>RNAi</b>	Ribonukleinsäuren-Interferenz (ribonucleic acid)
<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>S</b>	Serin (Ser)
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SG</b>	Sammelgel
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>T</b>	Threonin (Thr)
<b>TBST</b>	tris buffered saline + 0,3% Tween
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TG</b>	Trenngel
<b>TGN</b>	Trans Golgi Network
<b>TM</b>	Transmembran
<b>TRIS</b>	tris-hydroxymethyl-aminomethan
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>U-Überhang</b>	Uracil-Überhang
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volumen
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>XGAL</b>	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktosid
<b>YNB</b>	yeast nitrogen base
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 NHX-Antiporter sind essentielle Komponenten der pflanzlichen Vakuole

Die Regulation der Homöostase von  $K^+$  und  $Na^+$  ist von essentieller Bedeutung für lebende Zellen und ihre Anpassung an eine sich verändernde Umgebung. Prokaryoten werden dieser Aufgabe durch eine Vielfalt von Transportern an der Plasmamembran gerecht (Chanroj et al., 2012). Doch mit der Entwicklung der Eukaryoten und dem Sprung des Lebens an das Land änderten sich die Ansprüche an Ionenhomöostase und Wasserhaushalt dramatisch. Ein Großteil der Ionenporter eukaryotischer Zellen sind an Endomembranen, d.h. an Organellen wie der Vakuole und Vesikeln des Exo- und Endocytose-Apparats lokalisiert (Chanroj et al., 2012). Durch Ionenpumpen erzeugte Konzentrationsgradienten können dabei Ionenfluxe über Kanäle, Symporter oder Antiporter antreiben bzw. koppeln. Damit können innerhalb der Zelle erhebliche lokale Unterschiede bezüglich pH-Wert und der Ionenverteilung entstehen.,

Die große Zentralvakuole ist ein charakteristisches Organell ausdifferenzierter Pflanzenzellen und nimmt den überwiegenden Teil des Zellvolumens ein. Zu ihren essentiellen Funktionen gehört die Aufrechterhaltung eines erheblichen Protonengradienten gegenüber dem pH-neutralen Zytosol. Der vakuoläre pH liegt meist im Bereich von 5–6, kann aber wie in Citrus-Früchten, extreme Werte von bis zu 2 annehmen (Muller und Taiz, 2002).

Der Protonengradient zwischen Vakuole und Zytosol ist das bestimmende Element bei der Homöostase des zytoplasmatischen pH in der Pflanzenzelle. Zugleich stellt er eine sekundäre Energiequelle dar, welche zahlreiche physiologische Funktionen der Vakuole ermöglicht. Hierzu gehören die Akkumulation und Speicherung von anorganischen Ionen, organischen Säuren, Aminosäuren und Peptiden, sowie von verschiedenen Sekundärstoffen (Zhang et al., 2014). Die Etablierung und Aufrechterhaltung des Protonengradienten erfolgt durch zwei Klassen von Ionenpumpen, von denen die V-ATPase (ATP-getriebene  $H^+$ -Pumpe am Tonoplasten) eine dominierende Rolle spielt. Mit geringerer Effizienz werden Protonen durch die V-Pyrophosphatase in die Vakuole transportiert. Die Aktivitäten beider Transportsysteme sind koordiniert, so dass der Protonengradient nach Ausfall der V-ATPase durch die Aktivität der  $H^+$ -Pyrophosphatase weitgehend aufrechterhalten wird (Viehweger, 2003).

Eine Vielzahl von Co-Transportern (u.a. NHX-Transporter) verknüpft den Efflux akkumulierter Protonen mit der Aufnahme zytoplasmatischer Ionen. Diese Funktion ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Alkali-Kationen ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ) in der Pflanzenzelle. Denn zahlreiche Lebensvorgänge benötigen eine präzise eingestellte

zytoplasmatische  $K^+$ -Konzentration wie z.B. die ribosomale Proteinsynthese. Aber auch die vakuoläre Speicherung von  $Na^+$ -Ionen ist zu nennen, die unter ökologischen Gesichtspunkten vor allem, in Zusammenarbeit mit den  $Na^+$ -Transportern der Plasmamembran, das Ausmaß der Salztoleranz einer Pflanzenspezies bestimmt (Apse und Blumwald, 2007).

## 1.2 Pflanzliche $Na^+/H^+$ -Antiporter: Evolution, Struktur und Funktion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit  $Na^+/H^+$ -Antiportern der NHX-Familie am Tonoplasten von *Eschscholzia californica*. Diese Transportproteine gehören zur Superfamilie der Kation/Proton-Austauscher (CPA), deren Homologe in allen Organismenreichen vorkommen und den Austausch von  $Na^+$ ,  $K^+$  oder  $Li^+$  gegen  $H^+$  katalysieren. Sie besitzen ein gemeinsames Strukturelement, die pfam00999-Domäne (ca. 400 As), (Chanroj et al., 2012).

Die Sequenzähnlichkeit der den Kation-Austausch katalysierenden Domäne weist auf bakterielle Vorläufer der CPA-Superfamilie hin. Aus diesen entwickelten sich die CPA1-Familie mit den NHX- und NhaP-Transportern und die CPA2-Familie, welche die NHA, KEA und CHX-Transporter umfasst. Einen guten Überblick über die Phylogenie der CPA-Superfamilie in Bakterien, Pilzen, niederen und höheren Pflanzen gibt Abb. 1.

**Die CPA1-Transporter** sind wahrscheinlich aus einem bakteriellen NahP-Gen evolviert. Es handelt sich um Proteine mit 10, seltener 12 transmembranalen Helices. Sequenz-, Lokalisations- und Funktionsdaten liegen aus einer Vielzahl von Organismen vor (siehe Kap.1.2.1)

**Die CPA2-Transporter** umfassen die Hauptgruppen CHX (endosomale  $K^+$ -Antiporter) und KEA (vermutlich plastidäre  $Na^+$ ,  $K^+$ -/ $H^+$ -Antiporter). Sie wurden meist im Zuge von Genomprojekten gefunden und stehen erst am Anfang physiologischer Untersuchungen (siehe Kap.1.2.2).

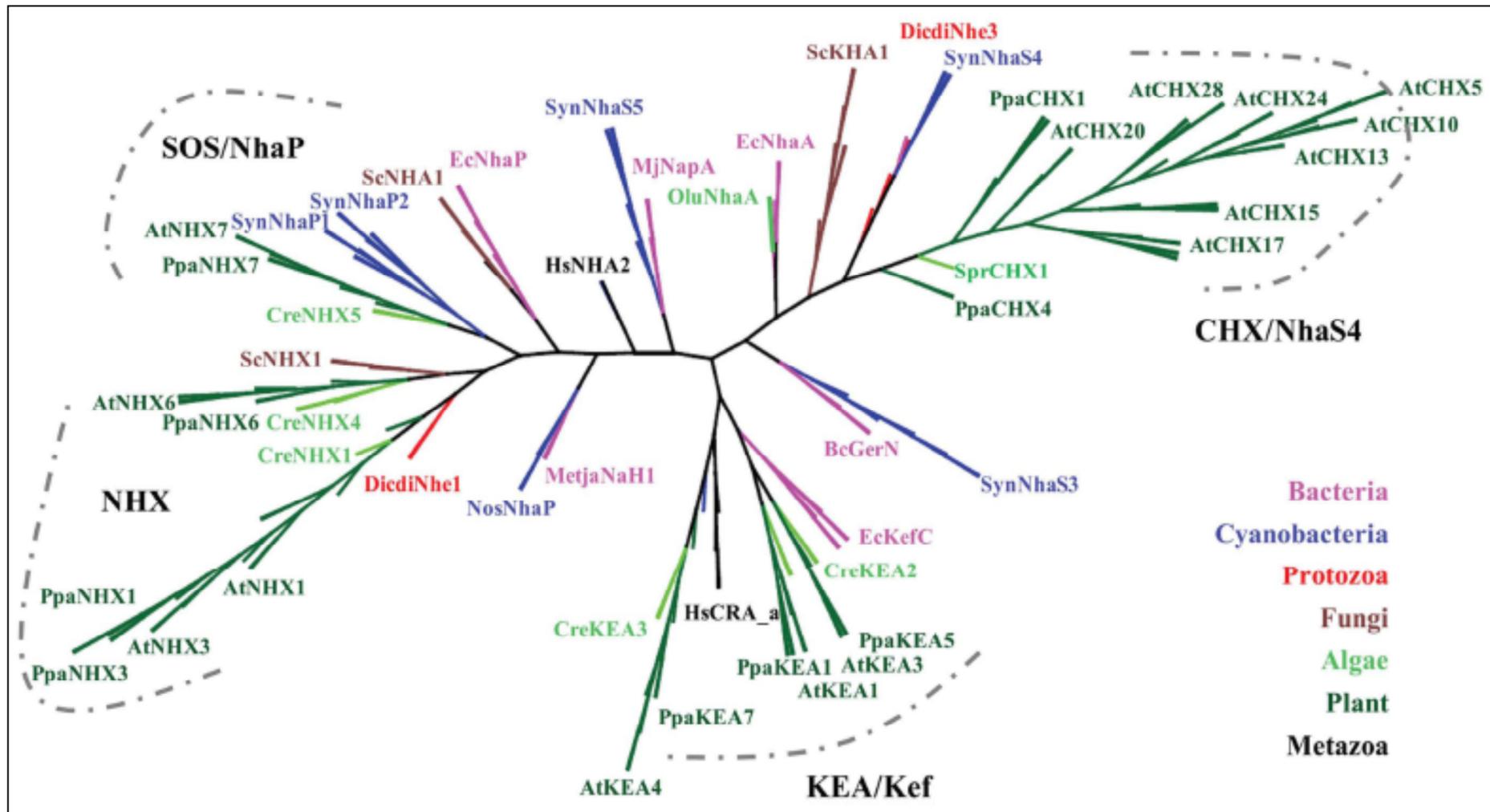


Abbildung 1: Übersicht zur Evolution der CPA1- und CPA2-Familie aus Vorläuferproteinen von Bakterien und Cyanobakterien, auf der Basis der zentralen Domäne pfam00999 (aus Chanroj et al., 2012)

Die pfam00999 Domänen diverser Organismen wurden mit Hilfe der maximum likelihood-Methode verglichen. Dazu wurden ausschließlich Transmembrandomänen von 400 Aminosäuren Länge ausgewählt, die mit der Sequenz AtCHX17 (33-426 As) homolog sind. NhaP- und NhaA-Gene von Bakterien sind die Vorläufer der eukaryotischen CPA1- (NhaP und NHX) und CPA2- (KEA und CHX) Familien. Verwendete Organismen: *Manihot esculenta* (Mes), *Ricinus communis* (Rco), *Populus trichocarpa* (Ptr), *Medicago truncatula* (Mtr), *Glycine max* (Gma), *Cucumis sativus* (Csa), *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Arabidopsis lyrata* (Aly), *Carica papaya* (Cpa), *Eucalyptus grandis* (Egr), *Vitis vinifera* (VVi), *Mimulus gittatus* (Mgi), *Sorghum bicolor* (Sbi), *Zea mays* (Zma), *Oryza sativa* (Osa), *Brachypodium distachyon* (Bdi), *Selaginella moellendorffii* (Smo oder club moss), *Physcomitrella patens* (Ppa oder moss), *Volvox carteri* (Vca), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre). Liste der Spezies siehe Anhang 7.7.1.

### 1.2.1 CPA1-Familie

Die CPA1-Gene rezenter Pflanzen und einzelliger Algen tragen konservierte Sequenzbereiche, welche auf eine Diversifizierung innerhalb dieser Genfamilie zu Beginn der Evolution der Landpflanzen hinweisen. Mit der Entstehung der ersten Eukaryoten entwickelten sich offenbar NhaP-Transporter an der Plasmamembran und NHX-Transporter an den Endomembranen (Chanroj et al., 2012). In rezenten Spezies sind drei große Kladen der CPA1-Antiporter unterscheidbar (Abb.2):

- a) Transporter der Plasmamembran (**SOS1** oder AtNHX7), welche die deutlichsten Hinweise auf ihre prokaryotische Herkunft zeigen,
- b) Transporter an endosomalen Membranen wie dem Golgi- und dem Trans-Golgi-Netzwerk (**AtNHX5 und 6**) und
- c) die vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (**AtNHX1-4**), welche nur in Pflanzen vorkommen. Es handelt sich um Membranproteine mit 10-12 Transmembran-Helices.

Diese Untergruppen der CPA1-Familie sollen nun kurz vorgestellt werden:

#### NhaP/SOS-Zweig

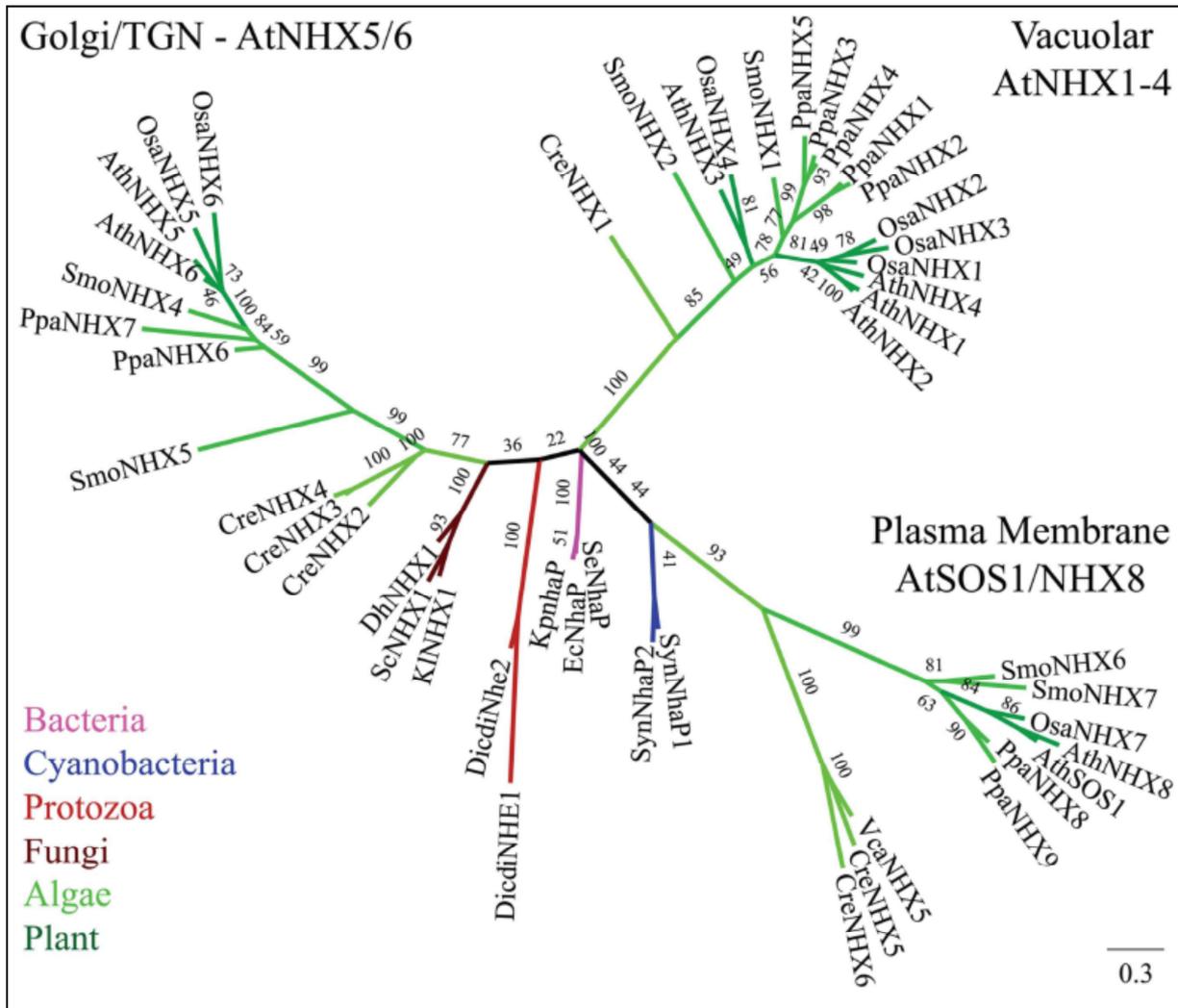
Zu den CPA1-Transportern der Plasmamembran zählen die bakteriellen NhaP- und die pflanzlichen SOS-Transporter. Sie katalysieren ausschließlich den elektroneutralen Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{H}^+$  (Qiu et al., 2003). Sie fördern die Extrusion von  $\text{Na}^+$  über die Plasmamembran unter Salzstress (An et al., 2007; Olias et al., 2009) und haben einen wesentlichen Anteil an der Salztoleranz einer Pflanze (Shi et al., 2000, 2002b). Zudem sind sie am Schutz von Zellen vor Schäden durch oxidativen Stress beteiligt, indem der lange C-Terminus mit dem Protein „radical-induced cell death“ (RCD1) interagiert (Katiyar-Agarwal et al., 2006). Die biochemischen Hintergründe sind noch unklar.

#### NHX-Zweig

Zu den intrazellulären CPA1-Transportern zählen die pflanzlichen NHX-, und der ScNHX1-Transporter (VPS44) aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die NHX-Transporter kommen im gesamten Pflanzenreich vor, von einzelligen Algen, über Moose, bis hin zu höheren Pflanzen. In gut untersuchten Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa* und *Populus euphratica* sind jeweils 6 NHX Vertreter bekannt. In *Arabidopsis thaliana* lassen sich diese in zwei Gruppen unterteilen (Pardo et al., 2006): AtNHX1-4 sind am Tonoplasten lokalisiert (Apse et al., 1999; Hamada et al., 2001; Xia et al., 2002; Vasekina et al., 2005; Fukuda et al., 2004a; Yoshida et al., 2005) und entstanden

wahrscheinlich mit den ersten kontraktilen Vakuolen der Protozoen wie Nhe1 und Nhe2 aus *Dictyostelium discoideum* (Chanroj et al., 2012). Sie besitzen untereinander eine Sequenzhomologie von ca. 70 %. Die AtNHX5-6 Vertreter liegen in Endomembranen des Golgi-/Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) und stimmen nur zu 20-25 % mit den Sequenzen der AtNHX1-4 Gruppe überein (Pardo et al., 2006; Vera-Estrella et al., 2005; Brett et al., 2005a). Abb.2 verdeutlicht die phylogenetische Unterteilung der CPA1-Familie in drei Kladen



**Abbildung 2: Die Diversifizierung der CPA1-Gene in drei Kladen während der Evolution der Landpflanzen (aus Chanroj et al., 2012)**

Die um den C-Terminus verkürzten Sequenzen (z.B. AtNHX1, 1–448 As) wurden mit der maximum likelihood-Methode verglichen und die erhaltene Phylogenie mit einem bootstrap-Wert von 500 getestet. (Details in Chanroj et al., 2012). NHX-Transporter einzelliger Algen (Cre), Moose (Ppa) und Farne (Smo) sind in allen drei Kladen vertreten. d.h. in NhaP/SOS1, endosomalen AtNHX5/6 und AtNHX1-4. Die AtNHX1-4 Klade kommt ausschließlich in pflanzlichen Vakuolen vor. Organismen: *Selaginella moellendorffii* (Smo oder club moss), *Physcomitrella patens* (Ppa oder moss), *Volvox carteri* (Vca), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre), *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Oryza sativa* (Osa), *Escherichia coli* str. K12 (Ec), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Salmonella enterica* (Se), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn), *Debaryomyces hansenii* (Dh), *Kluyveromyces lactis* (Kl), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Dictyostelium discoideum* AX4 (Dicdi). (Liste der Spezies siehe Anhang 7.7.2)

## 1.2.2 CPA2-Familie

### NHA-Zweig

Laut Abb.1 kommen die NHA-Transporter in Bakterien, Pilzen, Algen und Amoeben vor. In frühen Landpflanzen und Blütenpflanzen sind sie dagegen nicht bekannt. Sie stammen vermutlich von einem frühen bakteriellen NhaP-Transporter ab (Brett et al., 2005; Chanroj et al., 2012) und sind an der Plasmamembran lokalisiert (Kinclova et al., 2001). In Hefe katalysieren sie den Austausch von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  (Banuelos et al., 1998; Sychrova et al., 1999; Ohgaki et al., 2005), wobei ihr Transport-Modus innerhalb einer Familie stark variieren kann (Saier et al., 2000). In *E.coli* erfolgt beispielsweise ein elektrogener Austausch von einem Kation gegen zwei Protonen (Padan et al., 2008). Sie sind ähnlich wie der NhaP-Transporter an der Zellaktivität und Salztoleranz einer Zelle beteiligt, werden aber nicht bei pH 6 sondern, erst bei externen pH-Werten  $> 7$  aktiv (Taglicht et al., 1991).

### KEA-Familie

Die bakteriellen Vorläufer der KEA-Transporter sind die  $\text{K}^+$ -Kanäle KefB und KefC. Sie sind dimere Moleküle bei denen die pfam00999-Domäne für den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch über ein flexibles Verbindungsstück mit einer C-terminalen NAD(H)-Bindestelle, auch KTN-Domäne genannt, verbunden ist. Diese Domäne enthält das für „Rossmann fold“-Proteine typische Glycin-Motiv, welches an der Bindung von NAD beteiligt ist. Über sie wird Metaboliten-abhängig der  $\text{K}^+$ -Efflux kontrolliert (Jiang et al., 2001; Roosild et al., 2002; Choe et al., 2002). Phylogenetische Untersuchungen von Chanroj et al., 2012 (siehe Abb.1) unterstützen die Annahme, dass sich mit Beginn der primären und sekundären Endosymbiose in Cyanobakterien und Archaeplastiden die KEA-Transporter in zwei Gruppen teilten. In höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* werden die 6 Vertreter in AtKEA1-3 mit kompletter KTN-Domäne und AtKEA4-6 welche die KTN-Domäne gar nicht aufweisen, unterschieden. Ihre Rolle und Funktion in höheren Pflanzen ist weitestgehend ungeklärt. Es gibt allerdings Hinweise, dass sie an der Ionen-Homöostase in Chloroplasten beteiligt sind (Zybailov et al., 1994; Tsunekawa et al., 2009; Vothknecht et al., 2001).

### CHX-Transporter

Auf Basis von Sequenzhomologien wurden bisher 28 CHX-Vertreter in Pflanzen identifiziert, welche in 8 Gruppen unterteilt werden können (Chanroj et al., 2012). Die CHX-Transporter diversifizierten sich erst in höheren Pflanzen, wobei die Monocotylen mit 16 Vertretern nur 5 Gruppen, die Dicotylen mit  $> 26$  Vertretern aber 8 Gruppen aufweisen (Chanroj et al., 2012). Phylogenetische Analysen kommen zu der Annahme, dass die Vorläufer der Gene AtCHX16-

20 von *Arabidopsis thaliana* den Ausgangspunkt der Diversifizierung darstellen (Chanroj et al., 2012). Mit Expressionsanalysen konnten CHX-Transporter in epidermalem Gewebe von Blättern und Wurzeln, Schließzellen und Pollen nachgewiesen werden (Cellier et al., 2004; Chanroj et al., 2011; Padmanaban et al., 2007; Sze et al., 2004). Bis auf ihre Funktion als  $K^+/H^+$ -Transporter an dynamischen Endomembranen (Chanroj et al., 2012), ist ihre Rolle in der Physiologie der Pflanze bisher unklar.

### 1.3 Intrazelluläre $Na^+/H^+$ -Antiporter der Pflanze (NHX)

Wie bereits erwähnt, sind NHX-Antiporter typische Transporter der intrazellulären Membranen in der Pflanzenzelle. Die am Tonoplasten lokalisierten Isoformen (z.B. AtNHX1-4) zeigen eine etwa gleiche Affinität zu  $Na^+$  oder  $K^+$ ; die an den Membranen des Golgi-Systems befindlichen Transporter (z.B. AtNHX5-6) bevorzugen dagegen  $K^+$ . Während die vakuolären NHX-Transporter gut untersuchte Funktionen in der Regulation und Nutzbarmachung der  $H^+$  und  $Na^+$ -Gradienten im Zytosol besitzen, regulieren die Golgi-lokalisierten Isoformen diese Parameter in den Endo- bzw. Exocytose-Vesikeln und beeinflussen damit wahrscheinlich die vom Vesikeltransfer abhängigen Zellfunktionen wie Proteinsortierung und Pathogenabwehr. Im Folgenden sollen ausgewählte Eigenschaften der NHX-Antiporter detaillierter dargestellt werden.

#### 1.3.1 Expression und Lokalisation in pflanzlichen Organen

In der am besten untersuchten Spezies *Arabidopsis thaliana* wurden die Antiporter AtNHX1/2/5 und 6 mit Hilfe von Promotor-GUS-Analysen in allen Pflanzengewebe außer der Wurzelspitze nachgewiesen, wobei besonders hohe Konzentrationen in Schließzellen, Blütengeweben, Blattgefäßen und Blütenstielen auftraten (Shi, et al., 2002a; Apse et al., 2003). AtNHX4 zeigt eine deutliche Gewebsspezifität d.h. Präferenz für reife Pollen und Samen (Winter et al., 2007). Ähnliche Beobachtungen wurden für InNHX1 in der Prunkwinde (*Ipomoea nil*) gemacht, dessen Aktivität in den Blütenblättern die Blütenfarbe bestimmt (Ohnishi, et al., 2005). VvNHX1 der Weinrebe (*Vitis vinifera*) oder LeNHX4 der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) kommen vor allem in den Früchten vor und sind durch  $K^+$ -Akkumulation und Zellexpansion an ihrer Reifung beteiligt (Hanana et al., 2007).

Die Expression aller oder zumindest der Mehrzahl der vakuolären NHX-Isoformen wird durch Salzstress, d.h. Gabe von NaCl (Quintero et al., 2000; Kagami et al., 2005; Venema et al., 2003), KCl (Fukuda et al., 2004a; Wu et al., 2004; Gaxiola et al., 1999; Fukuda et al.,

1999; Fukada et al., 2004b), oder hyperosmotischen Stress in Form von Zuckeralkoholen wie Mannitol (Fukuda et al., 2004a; Yokoi et al., 2002; Fukada et al., 1999; Fukada et al., 2004b) induziert. Hierzu liegen umfangreiche Daten aus Blättern (Hamada et al., 2001; Quintero et al., 2000; Kagami et al., 2005; Venema et al., 2003; Fukada et al., 1999; Brini, et al., 2005; Zaharan et al., 2007), Wurzeln (Fukada et al., 1999; Fukada et al., 2004b; Brini et al., 2005; Zaharan et al., 2007; Zörb et al., 2004; Shi et al 2002a) oder Stängeln (Chauhan et al., 2000) vor. In neuerer Zeit wurden diese durch Microarray-Analysen präzisiert (Winter et al., 2007). Promotorstudien zu BvNHX1 aus *Beta vulgaris* lassen vermuten, dass die Salzstress-induzierte Expression dieses Antiporter, welche einen MYB-Transkriptionsfaktor benötigt, nicht durch das Stresshormon ABA reguliert wird (Adler et al., 2010). Für einige Isoformen in *Arabidopsis thaliana* gibt es jedoch Hinweise auf eine ABA-induzierte Expression werden (Yokoi et al., 2002; Venema et al., 2003).

### 1.3.2 Topologie

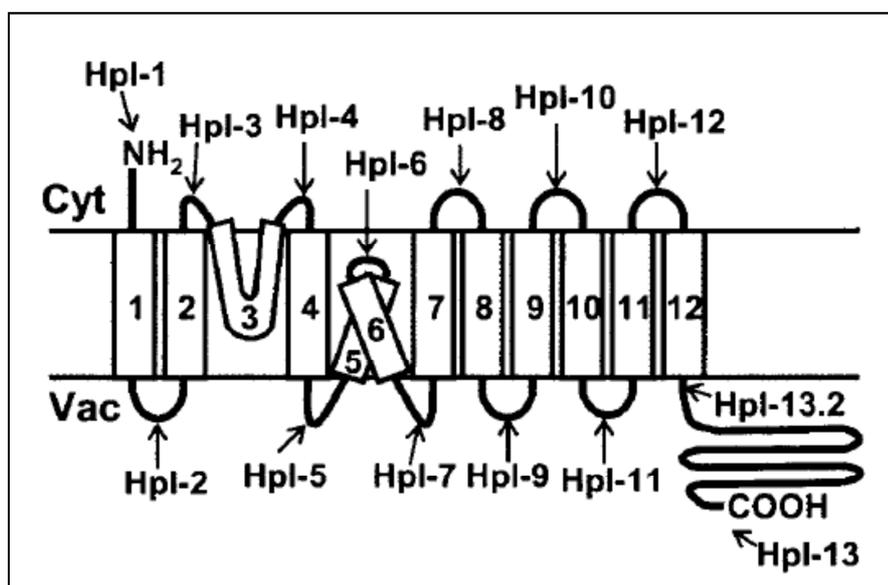
Der erste mit molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden charakterisierte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus Pflanzen war AtNHX1 aus *Arabidopsis thaliana*. Seitdem wurden auch für NHX-Antiporter aus weiteren Pflanzen molekulare Details bekannt. Anhand von Hydropathie-Plots zeichnet sich für alle NHX-Transporter ein spezifisches Muster ab. Die Antiporter bestehen aus einer N-terminalen, innerhalb der CPA1-Familie konservierten pfam00999 Domäne, die aus 12 hydrophoben Bereichen besteht und Träger des Ionen-Austausch-Prozesses ist (siehe Abb.3) und einem hydrophilen C-Terminus, der im Gegensatz dazu sehr divergent und voraussichtlich an der Regulation des Ionentransports beteiligt ist.

Anhand von Insertions-Mutagenese-Studien, bei denen 3xHA-Epitope in die hydrophilen Loops zwischen den Transmembran-Segmenten (TM) inkloniert wurden, entwickelten Yamaguchi et al., 2003 ein Topologie-Modell für AtNHX1, nach dem 9 von 12 der im Hydropathie-Plot postulierten hydrophoben Domänen echte Transmembran-Helices sind und TM3, 5 und 6 membranassoziiert vorliegen (Abb. 3). Der N-Terminus ist zum Zytoplasma und der C-Terminus ins Vakuolenlumen gerichtet ist.

Die **hydrophobe Domäne Nr.3** enthält die für NHE- (tierische NHX-Homologen) und NHX-Transporter spezifische Sequenz der Amilorid-Bindestelle. Amilorid ist ein Inhibitor der  $\text{Na}^+$ -Kanäle (NHE) epithelialer Zellen der menschlichen Niere und wird in der Humanmedizin als „kaliumsparendes“ Diuretikum zur Therapie von Herz-Kreislauf Erkrankungen eingesetzt. Es bindet an das Motif mit dem Konsensus FF(I/L)(Y/F)LFLLPPI (Pardo et al., 2006), welches

über lange Evolutionszeiträume nur wenig verändert wurde. Dies erklärt, warum Amilorid effizienter Hemmstoff sowohl der vakuolären NHX-Antiporter (NHX1-4) in Pflanzen (Apse et al., 1999) als auch der Transporter NHE1-5 an der Plasmamembran tierischer Zellen (Brett et al., 2005a). Die intrazellulären NHE-Transporter (NHE6/7/9) bzw. die NHX-Transporter an Golgi/TGN (NHX5-6) weichen nur in einer Aminosäure von dem Konsensus-Motif ab und zeigen im Vergleich nur 20-40 % Sensitivität gegenüber Amilorid (Brett et al., 2005a). Das gilt auch für den ScNHX1-Transporter von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die **hydrophoben Domänen 5 und 6** sind an der Kationen-Bindung und dem Ionen-Transport beteiligt. Während die Transmembran-Domänen 1 und 2, sowie 10, 11, 12 in derselben Richtung wie die vergleichbaren Domänen der NHE-Transporter orientiert sind, verlaufen die den Ionentransport katalysierenden Domänen (TM4/7/8) in entgegengesetzter Richtung. Dies erklärt die unterschiedliche Funktionsweise: während die NHE-Antiporter durch eine zytoplasmatische Azidifizierung aktiviert werden und der  $\text{Na}^+$ -Einstrom an einen Ausstrom von  $\text{H}^+$  aus dem Zytoplasma gekoppelt ist, bewirken vakuoläre NHX-Transporter einen an die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme gekoppelten Ausstrom vakuolärer Protonen, d.h. eine Azidifizierung des Zytoplasmas.



**Abbildung 3: Topologie-Modell für AtNHX1 (aus Yamaguchi et al., 2003)**

Kästen bezeichnen die putativen Transmembrandomänen (1-12), Pfeile kennzeichnen die jeweilige Insertionsposition der 3xHA-tags (Hpl-1- 13.2); Vac: Vakuolenlumen; Cyt: Zytoplasma.

### 1.3.3 Struktur-Funktions-Analyse

Obwohl gesicherte topologische Daten vorhanden sind (s.o.) ist der molekulare Mechanismus des Proton-Kation-Austauschs an pflanzlichen Antiportern bisher nicht detailliert untersucht worden. Der Hauptgrund ist das Fehlen einer hochaufgelösten 3D-Struktur des Membranenzym, vor allem der katalytischen Domäne. In jüngster Zeit wurde ein 3D-Homologie-Modell eines NHX-Antiporters aus *Leptochloa fusca* vorgeschlagen, das nicht auf Röntgen-Strukturdaten, sondern auf der Peptidsequenz und davon abgeleiteten *in silico* Vorhersagen basiert (Panahi et al., 2012), jedoch nicht die erforderlichen Details bietet.

Ein für Mechanismus-Studien geeignetes Strukturmodell eines CPA1-Transporters existiert bisher nur für den humanen Antiporter HsNHE1 und wurde auf Grundlage der Kristallstruktur des bakteriellen Homologen NhaA aus *E.coli* erstellt (Abb.4a). Da beide Transporter nur etwa 12 % Sequenzhomologie aufweisen, war ein umfangreicher Vergleich mit evolutionär konservierten Helixsegmenten und Aminosäuren an strategischen Positionen erforderlich, um das Modell zu validieren. Es wurde auch durch Inhibitor-Bindungsstudien nach zielgerichteter Mutagenese unterstützt (Landau et al. 2007). Das resultierende Modell ist in Abb. 4b/c dargestellt.

Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch findet innerhalb einer Pore statt, die aus 5 Transmembran-Helices (TM) gebildet wird (siehe Abb. 4b). Die Interaktion zweier Helices (TM4 und 11) führt zu periodischen Konformationsänderungen, wodurch die im Inneren der Pore liegende Kationen-Bindestelle wechselseitig für die Innenseite der Plasmamembran (Zytoplasma) und die Aussenseite (Periplasma) zugänglich wird. Damit werden gegenläufige Fluxes von  $\text{H}^+$  und  $\text{Na}^+$  in Richtung ihrer chemischen Gradienten möglich (siehe Abb. 4c). Die zentrale Bindestelle enthält 5 hoch konservierte Aminosäuren an Stelle P168, P167 und E262, D267, S351, welche **P88**, **P89**, **E179**, **D185**, **S271** in NHX1 von *Arabidopsis thaliana* entsprechen (Rodríguez-Rosales et al., 2009) Die Konformationsänderung beginnt mit der Attraktion eines Protons durch einen anionischen Rest und wird periodisch aufrechterhalten, solange der zelluläre pH auf der zytoplasmatischen Seite niedrig genug bleibt.

Hinweise auf einen ähnlichen Mechanismus des Kationen-Austauschs in NHX-Antiportern (Sato et al., 2005; Wakabayashi et al., 2000) bieten Mutagenese-Studien und die durch sie identifizierten konservierten Aminosäuren mit essentiellen Funktionen in Kationen-Bindung und Translokation wie z.B. die anionischen Aminosäuren im H10- loop (zwischen TM 9 und TM 10) von ScNHX1, wovon besonders die konservierte Position E355 (ScNHX1), E391

(NHE1) und **E311** (AtNHX1) hervorzuheben ist, da sie in allen NHE- und NHX-Isoformen vorkommt (Hernández et al., 2009; Mukherjee et al., 2006).

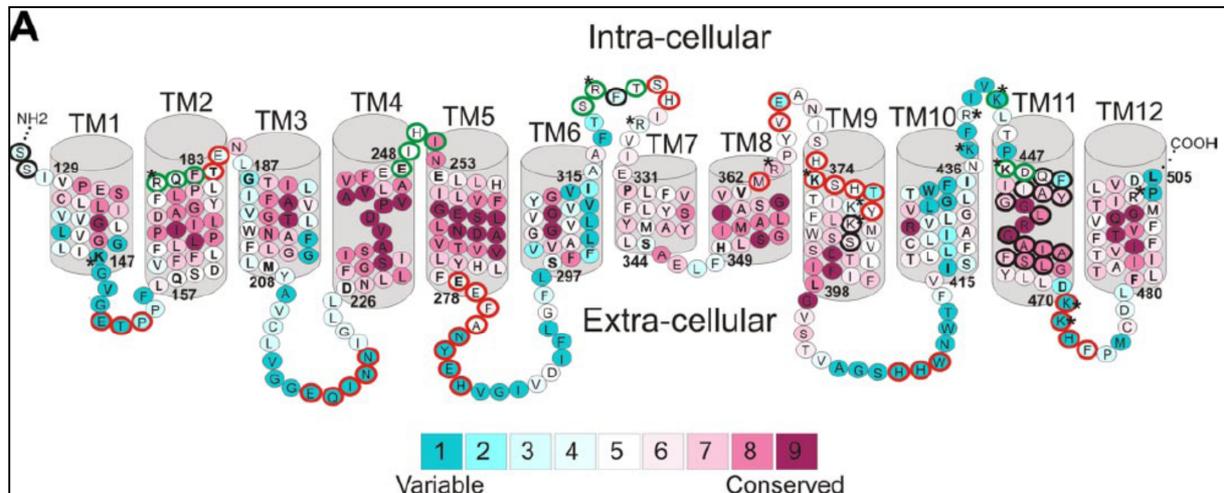


Abbildung 4a: Membran-Topologie von NHE1 (vorgeschlagen von Landau et al., 2007)

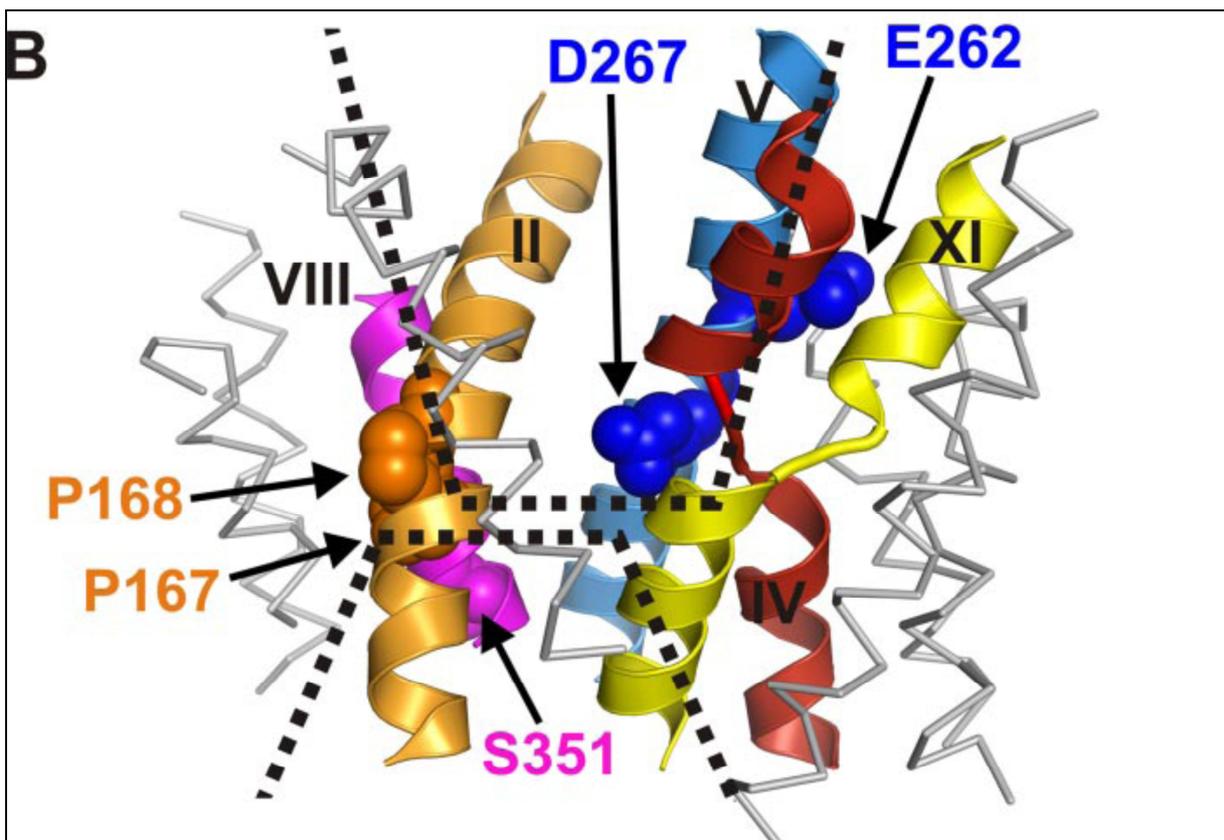


Abbildung 4b: Die Anordnung der für den Kationen-Austausch entscheidenden Transmembran-Helices in der inaktiven Konformation von NHE1

E262 und D267 sind essentielle Bindestellen für Kationen; deren Transportweg ist durch schwarz gepunktete Trichter dargestellt. Die Interaktion von Helix IV mit Helix XI bewirkt einen Konformationswechsel, der auch die Rotation von Helix VIII und Exposition von S351 zur Aussenseite einschließt (siehe. Abb. 4c). Intrazelluläre Seite (oben), extrazelluläre Seite (unten). Modifiziert nach Landau et al., 2007.

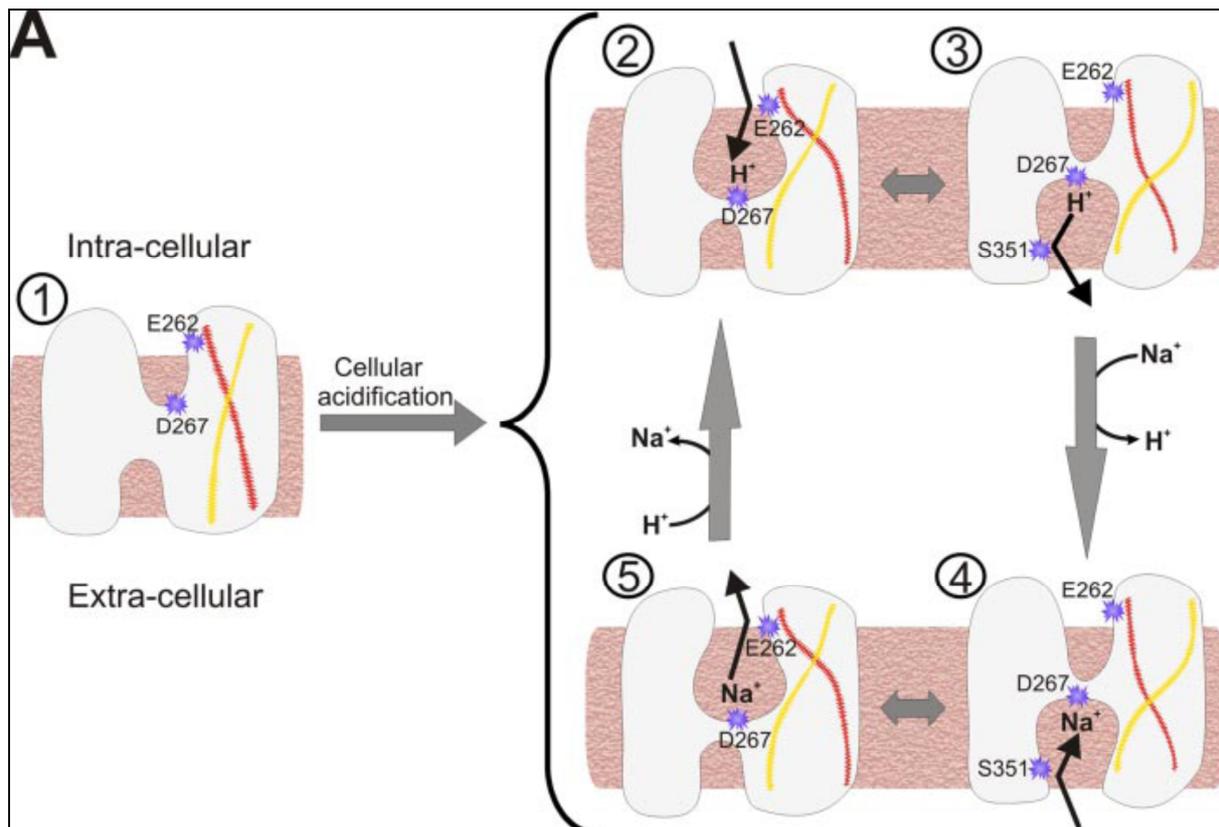


Abbildung 4c: Der Mechanismus des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschs in NHE1

Die inaktive Konformation (**Stadium 1**) wird durch Bindung eines Protons an E262 aktiviert, damit wird ein Übergang zu Konformationen 2 möglich, gefolgt von einem dynamischen Gleichgewicht zwischen den Konformationen 2, 3, 4 und 5. In Stadium 2 und 5 ist die Kation-Bindestelle für das Zytoplasma, in Stadium 3 und 4 für die Aussenseite (hier Periplasma) zugänglich.

**Stadium 2:** niedriger pH erlaubt den Eintritt von  $\text{H}^+$  in die zytoplasmatische Bindestelle, nach E262 wird D267 protoniert.

**Stadium 3:** die in 2 ausgelösten Konformationsänderungen erlauben den Übergang des  $\text{H}^+$  zur extrazellulären Seite.

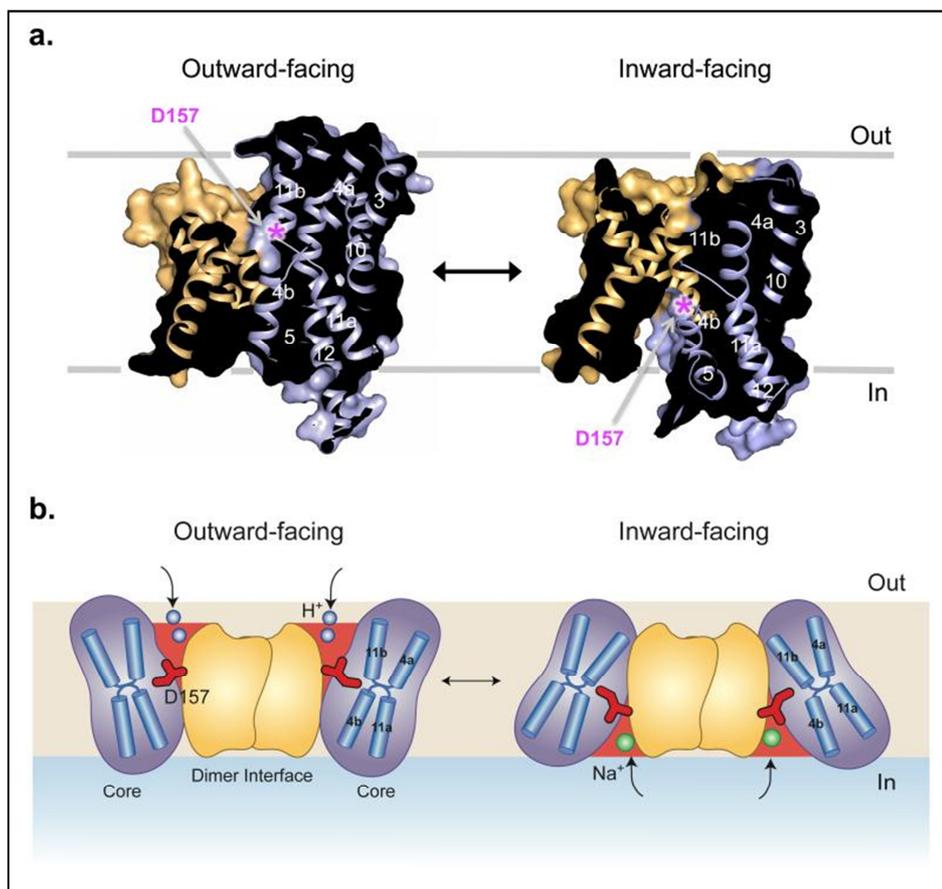
**Stadium 4:** getrieben durch die jeweiligen Konzentrationsgradienten kommt es zum Austausch von  $\text{H}^+$  gegen  $\text{Na}^+$  an der extrazellulären Seite, vermutlich via S351. **Stadium 5:** das Umklappen in die vorherige Konformation 2 erlaubt den Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{H}^+$  an der Innenseite, wenn die Konzentrationsgradienten dies erlauben.

Alle Konformationsänderungen werden durch periodische Interaktion von Helix IV und XI möglich (Salzbrücke E-K), welche jeweils im rechten Teil der Skizzen rot und gelb symbolisiert sind. (Landau et al., 2007).

Viele sekundär-aktive Transporter sind dafür bekannt, Oligomere zu bilden (Padan, 2008; Veenhoff et al., 2002). Auch der NhaA-Transporter von *E.coli* liegt in der bakteriellen Plasmamembran als Homodimer vorliegt (Gerchman et al., 2001; Hilger et al., 2005). Das Monomer (experimentell erzwungen durch Mutation der interagierenden Domäne) war zwar unter Stressbedingungen (0.1 mol/l LiCl bei pH 7 oder 0.6 mol/l NaCl bei pH 8.3) voll funktionstüchtig und verlieh einer Deletionsmutante ohne Nha-Antiporter Salztoleranz, jedoch war unter extremen Stressbedingungen (0.1 mol/l LiCl oder 0.7 mol/l NaCl beides bei pH 8.5) das native Nha-Homodimer deutlich effizienter als die Monomer-Mutante (Rimon et al., 2007). Hilger et al., 2007 postulierten ein Modell für das NhaA-Homodimer, wonach es sich aus zwei antiparallel gerichteten Monomeren über Kontakt der N-terminalen  $\beta$ -Faltblätter auf Seiten des Periplasmas zusammensetzt. Eine ähnliche Funktionsweise wurde ebenfalls für

den humanen NHE1-Transporter vorgeschlagen (Hisamitsu et al., 2006). Demnach ist die Dimerisierung von entscheidender Bedeutung für dessen Funktion. Aufgrund der Homologie des aktiven Zentrums von NHX- und NHE-Transportern und der Bedeutung der Dimere für die Funktion und Stressanpassung ist auch für NHX-Antiporter die Existenz als funktionelle Dimere wahrscheinlich, auch wenn hierzu keine konkreten Daten vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde als template für ein 3D-Modell der NHX-Antiporter von *Eschscholzia californica* (siehe Kap.3.7) auf die Struktur des NapA-Transporters von *Thermus thermophilus* zurückgegriffen (Lee et al., 2013). Dabei handelt es sich wie bei NhaA von *E.coli* um einen als Dimer funktionierenden monovalenten Kationen/Protonen-Antiporter der CPA2-Familie. Sein Vorteil liegt in der gut aufgelösten Kristallstruktur des aktiven Zustands bei pH 7.8 (siehe Abb.4d).



**Abbildung 4d: Modell zum alternierenden Austausch des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters (NapA)**

**A:** Oberflächen-Struktur eines NapA-Monomers im auswärts-gerichteten (links) und einwärts-gerichteten Zustand (rechts)

**B:** Schematische Darstellung des Transportmechanismus durch Konformationsänderungen der Core-Domänen gegen die Dimerisations-Domäne. Die Bindung von Protonen (blau) an die zum externen Medium gerichtete Seite der Core-Domäne führt zum Konformationswechsel und zum Austausch von H<sup>+</sup> gegen Na<sup>+</sup> (grün) ins Zellinnere. Daraufhin wechselt die Core-Domäne wieder in ihren Ausgangszustand. Die für die Kationen-Bindung kritische Aminosäure D157 ist rot gekennzeichnet. (Lee et al., 2013)

### 1.3.4 Modulation von NHX-Antiportern durch Protein-Protein-Interaktion

Mutagenese-Studien an AtNHX1 zeigten, dass der Verlust des C-Terminus nicht zum Aktivitätsverlust der Transporter, sondern zu einer veränderten Kationen-Selektivität führt (Yamaguchi et al., 2003). Die Aktivität des Austauschers wird aber auch durch Interaktionen des C-Terminus mit Proteinen im Lumen der Vakuole beeinflusst. Aus Untersuchungen von rekombinantem AtNHX1 in Hefe ist bekannt, dass der C-Terminus Angriffspunkt für ein Calmodulin-bindendes Protein AtCaM15 in der Vakuole ist (Yamaguchi et al., 2005). Diese Bindung verschiebt die Na<sup>+</sup>-Spezifität in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup> und pH zugunsten von K<sup>+</sup>.

Aus dem SOS-Signalweg ist bekannt, dass der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter der Plasmamembran (SOS1) aus Pflanzen unter Salzstress durch SOS2 und SOS3-Proteine aktiviert wird (Batelli et al., 2007). SOS3 ist ein myristoyliertes Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein, welches die Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Serin/Threonin Protein Kinase SOS2 stimuliert. Dies führt zum Anstieg von SOS1-Transkripten aber auch zur verstärkten Aktivität vorhandener SOS1-Transporter durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ähnliche Interaktionen scheinen mit NHX-Transportern der Vakuole abzulaufen. In *sos2*-knockout Mutanten wurde ein Aktivitätsverlust der Amilorid-sensitiven NHX-Transporter festgestellt, der durch Zugabe von SOS2-Protein, aber nicht durch anti-AtNHX1-Antikörper, kompensiert werden konnte (Qiu et al., 2004). Die Ergebnisse sprechen für eine direkte Interaktion von NHX und SOS2. Diese geschieht neben der direkten Interaktion von V-ATPase-Untereinheiten mit SOS2, die durch Erniedrigung der V-ATPase-bedingten Azidifizierung der Vakuolen von *sos2*-knockout Mutanten belegt wurde (Batelli et al., 2007).

Für den ScNHX1-Antiporter in den Endosomen der Hefe ist eine Wechselwirkung des C-Terminus mit einem GTPase-aktivierenden Gyp6-Protein bekannt (Ali et al., 2004). Gyp6 ist ein negativ Regulator des retrograden Vesikelverkehrs von der Vakuole zum Golgi/TGN, indem es die NHX-Aktivität hemmt und dadurch eine Ansäuerung der endosomalen/provakuolären Kompartimente bewirkt. Wird Gyp6 durch Bindung der GTPase GTP-Ypt6 an ScNHX1 verdrängt, kommt es infolge der Aktivierung des NHX-Transporters zum Anstieg des endosomalen pH und zum verstärkten Vesikeltransfer Richtung Golgi/TGN.

### 1.3.5 Heterologe Expression von pflanzlichen NHX-Antiportern in Hefezellen

In *Saccharomyces cerevisiae* ist im Unterschied zu höheren Pflanzen nur ein einziger NHX-Transporter bekannt (ScNHX1 bzw. VPS44). Damit bieten Hefezellen einen geeigneten genetischen Hintergrund für die Expression pflanzlicher NHX-Gene. Hinzu kommen weitere

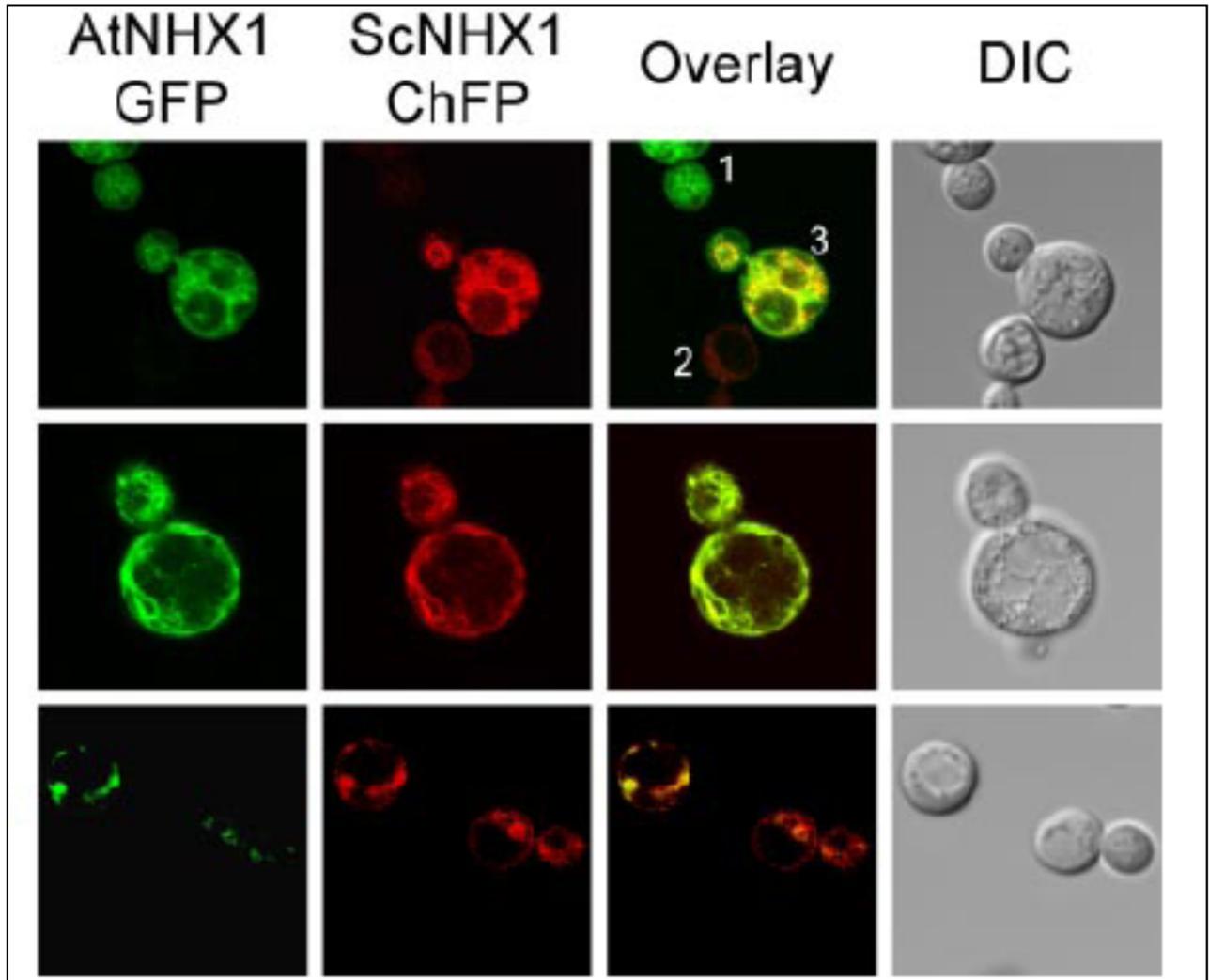
günstige Voraussetzungen wie die vollständige Kenntnis des Hefe-Genoms und die relative einfache Transformierbarkeit der Zellen. Mehrere NHX-Antiporter pflanzlichen Ursprungs u.a. AtNHX1, OsNHX1, TrNHX1, AgNHX1 wurden erfolgreich in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, wobei meist die funktionelle Komplementierung einer  $\Delta nhx1$ -Nullmutante nachgewiesen wurde (Gaxiola et al., 1999; Quintero et al., 2000; Yokoi et al., 2002; Fukuda et al., 2004a; Tang et al., 2010; Hamada et al., 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode mit Erfolg angewendet (siehe Kap.3.6).

Die heterologe Expression in Hefezellen birgt ein interessantes Problem: es wurde gezeigt, dass das pflanzliche NHX-Protein die gleiche intrazelluläre Lokalisation erreicht wie das genuine Homologon, (ScNHX1) der Hefe (siehe Abb.5). Während aber das targeting von ScNHX1 (wie auch von tierischen intrazellulären NHE-Transportern) zu den endosomalen Kompartimenten in bekannter Weise mit Hilfe eines N-terminalen, abspaltbaren Signalpeptids erfolgt (Wells et al., 2001), weisen die pflanzlichen NHX-Antiporter keine Signalpeptidsequenz auf. Es ist bekannt, dass bei Membranproteinen die erste hydrophobe Transmembran-Domäne die spezifische Funktion der Signalsequenz übernehmen kann (High et al., 1992). Die hydrophoben Sequenzen werden spezifisch vom Translokationsapparat erkannt und mit Hilfe eines Translokators in die ER-Membran integriert (Zheng et al., 1996). Für pflanzliche NHX1-Proteine ist bisher unklar, welche internen Sequenzbereiche für das targeting zur Vakuole verantwortlich sind. Eine Beteiligung der Transmembran-Domänen TM1 und 2 wird vermutet (Sato et al., 2005).

Studien zum Einfluss des Signalpeptids der Hefe auf das targeting von rekombinantem AtNHX1 ergaben, dass die  $\Delta nhx1$ -Nullmutante hinsichtlich ihrer  $\text{Na}^+$ -Empfindlichkeit durch ein Hybridprotein aus AtNHX1 plus Signalpeptid ebenso komplementiert wurde wie durch die Expression des AtNHX1-Proteins allein. Ein Vorteil des Signalpeptids zeigte sich nur in der verminderten Empfindlichkeit gegenüber dem toxischen Kation Hygromycin (Darley et al., 2000). Das Signalpeptid ist also für die Translokation des pflanzlichen NHX-Proteins zum erwarteten Bestimmungsort in der Hefezelle nicht zwingend notwendig.

Ein weiterer Unterschied besteht in der posttranslationalen Modifikationen des ScNHX1-Proteins in Hefezellen, insbesondere durch N-Glykosylierung am C-Terminus (Wells et al., 2001), wogegen das NHX-Protein in der Pflanze nicht in dieser Weise verändert wird. Posttranslationale Modifikationen könnten daher in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte, pflanzliche NHX-Transporter in "ungewöhnlicher" Weise verändern. Allerdings zeigten Untersuchungen an heterolog exprimiertem AtNHX1, dass dessen nachweisbare

Glykosylierung in der Hefezelle keinen Einfluss auf seine Transportfunktion hatte (Yamaguchi et al., 2003).



**Abbildung 5: Colokalisation von Pflanzen- und Hefe NHX1-Proteinen (aus Hernandez et al., 2009).**

Wildtyp-Hefezellen wurden mit Plasmiden co-transformiert, welche für GFP-Konstrukte von AtNHX1 oder ChFP-Konstrukte von ScNHX1 codieren. Beim Wachstum in Gegenwart von 300 mM NaCl wurden die Reporterproteine exprimiert und unabhängig voneinander, d .h. in derselben Probe, durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. **Obere Zeile:** (1) exprimiert AtNHX1-GFP, (2) exprimiert ScNHX1-ChFP, (3) exprimiert beide Konstrukte; **Mittlere Zeile:** Die Reporterproteine zeigen deutliche Colokalisation in den Endosomen; **Untere Zeile:** Bei geringer Fluoreszenzintensität wird die Lokalisation beider Proteine in den späten endosomalen bzw. provakuolären Vesikeln sichtbar.

### 1.3.6 Zelluläre Funktionen von NHX-Antiportern

#### 1.3.6.1 $K^+/Na^+$ -Homöostase und Salzstress

Unter typisch physiologischen Bedingungen halten Pflanzen ein hohes  $K^+/Na^+$ -Verhältnis im Zytoplasma aufrecht, mit  $K^+$ -Konzentrationen von 100-200 mM und  $Na^+$ -Konzentrationen von 1-10 mM (Higinbotham et al., 1973). Derartige  $K^+$ -Konzentrationen sind eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf vieler biochemischer Prozesse.  $K^+$  bereits für etwa 50 Enzyme als essentieller Aktivator nachgewiesen (Bhandal et al., 1988). Die Verdrängung von  $K^+$  durch  $Na^+$  aufgrund eines steigenden  $Na^+$ -Gehalts im Aussenmedium verursacht erhebliche Störungen, insbesondere der Protein-Biosynthese (Blaha et al., 2000; Wyn Jones et al., 1979) und stellt daher ein potentielles Risiko für Pflanzenzellen dar. Die Versalzung von Böden führt infolge dessen bei Nutzpflanzen zur erheblichen Verringerung der Produktivität und stellt damit ein agrarwirtschaftliches Problem globalen Ausmaßes dar.

Die passive Aufnahme von  $Na^+$  erfolgt sehr wahrscheinlich durch nicht-selektive Kationenkanäle der Plasmamembran. Dabei lassen sich  $Ca^{2+}$ -abhängige Kanäle wie CNGCs und GLRs (Amtman et al., 1999; Tyerman et al., 1999; White et al., 1999; Davenport et al., 2000; Demidchik et al., 2002) von  $Ca^{2+}$ -insensitiven Kationen-Kanälen wie HKT1 unterscheiden (Tyerman et al., 1999; Rubio et al., 1995; Uozumi et al., 2000; Rus et al., 2001; Zhu et al., 2002). Wie bei allen Kationen wird der Influx durch die elektrochemische Potentialdifferenz an der Plasmamembran von ca. -140 mV begünstigt und durch die Konzentrationsdifferenz zwischen Zytosol und Aussenmedium getrieben (Higinbotham et al., 1973). Um den Anstieg des zytoplasmatischen  $Na^+$  zu verhindern, stehen der Pflanzenzelle 2 Strategien zur Verfügung:

1. Die aktive  $Na^+$ -Ausscheidung über die SOS-Antiporter der Plasmamembran und 2. die  $Na^+$ -Speicherung in der Vakuole über NHX-Antiporter des Tonoplasten. ATP-abhängige  $Na^+$ -Pumpen wie in Tieren oder Pilzen sind in Pflanzen nicht bekannt (Garcia-deblás et al., 2001).

Viele Daten sprechen dafür, dass die von NHX-Antiportern bewirkte Verschiebung von  $Na^+$  in die Vakuole den größeren Anteil an der  $Na^+$ -Entgiftung leistet (Nui et al., 1995; Blumwald et al., 2000; Munns et al., 2008; Maathuis et al., 1999). Sie basiert auf der Triebkraft des großen  $H^+$ -Reservoirs der Vakuole, welches durch Protonenpumpen wie V-ATPase und V-PPase ständig aufrechterhalten wird.

Die Bedeutung der NHX-Transporter für die Ionen-Homöostase unter Salzstress, d.h. nach  $Na^+$ -Exposition  $\gg$  100 mM, wird vor allem durch die erhöhte Expression von NHX-Genen

(Yokoi et al., 2002; Wu et al., 2004) und die erhöhte Antiport-Kapazität (Gabarino et al., 1989; Wilson et al., 1995; Ballesteros et al., 1997) in einer Vielzahl von Pflanzen erkennbar und ist mit einem Anstieg der Aktivität primärer Protonenpumpen assoziiert (Hasegawa et al., 2000; Maeshima et al., 2000).

Die Überexpression von NHX-Genen führte in einer Reihe verschiedener Pflanzenspezies zur Generierung transgener salztoleranter Pflanzen (Tester et al., 2003; Yamaguchi et al., 2005) wie z.B. in Baumwolle (Wu et al., 2004), Soja (Li et al., 2006), Tomate (Zhang and Blumwald, 2001), Raps (Zhang et al., 2001), Rübe (Lui et al., 2008), Reis (Verma et al., 2007), Weizen (Xue et al., 2004), *Arabidopsis thaliana* (Apse et al., 1999), *Atriplex gmelini* (Ohta et al., 2002), *Aeluropus littoralis* (Zhang et al., 2008). Dabei spielt neben der Entfernung von  $\text{Na}^+$  aus dem Zytoplasma auch die Erhöhung des osmotischen Potentials in der Vakuole eine Rolle, da diese zur Verminderung des mit Salzstress verbundenen osmotischen Stress beiträgt, und damit die Aufrechterhaltung der Wasseraufnahme aus dem Boden ermöglicht.

Eine erhebliche Anzahl von Pflanzen sind Halophyten, d.h. sie sind von vornherein besser an steigende oder stark wechselnde Salzgehalte angepasst als die unter normalem Salzgehalt lebenden Pflanzen (Glycophyten). Diese Unterschiede in der Salztoleranz liegen jedoch weniger in der Struktur und Effizienz der NHX-Transporter, sondern vielmehr in der effektiveren Regulation ihrer Genexpression (Adler et al., 2010)). Hinzu kommen erhebliche, auch morphologisch begründete Unterschiede im  $\text{Na}^+$ -Management der Halophyten, wie ein breiterer Caspary-Streifen, die Abgabe von  $\text{Na}^+$  über das Xylem an wenig stoffwechselaktive Pflanzenteile, wie verholzte Wurzeln (Yeo et al., 1977), Stämme (Johansen et al., 1983; Drew et al., 1987; Shone et al., 1969; Wolf et al., 1991; Blom-Zandstra et al., 1998); Internodien (Wolf et al., 1991), abstoßbare Blätter oder die Exkretion über Salzdrüsen (Tester et al., 2003).

In Abwesenheit von Salzstress erfüllen die NHX-Transporter im Rahmen ihrer Kationen-Selektivität eher die Rolle eines  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (Venema et al., 2002; Zhang et al., 2001), d.h. sie dienen der Akkumulation des grossen  $\text{K}^+$ -Pools in der Vakuole. Dieser ist unter Normalbedingungen das überwiegende Osmotikum der Pflanzenzelle und wird zur Aufrechterhaltung des Zellurgors und zum Vorantreiben der Zellexpansion benötigt (Chanroj et al., 2012). Der  $\text{K}^+$ -Efflux aus dem vakuolären Reservoir in das Zytoplasma wird bei Bedarf über  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Symporter realisiert (Walker et al., 1996). In diesem Sinn ist Kalium für die

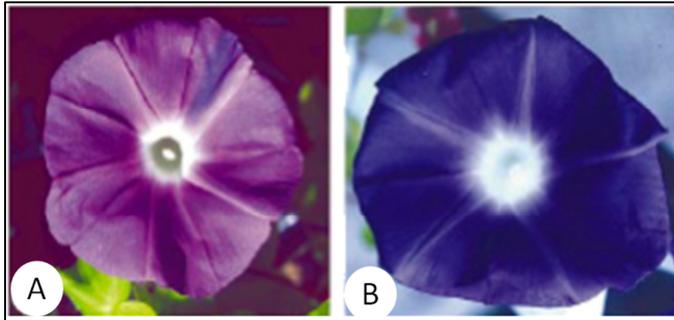
Stabilität der Pflanze und das Zellwachstum vor allem in Blüten (Yoshida et al., 2005) und Früchten (Hanana et al., 2007) von Bedeutung.

Einige experimentelle Befunde sollen dies beispielhaft belegen: die Überexpression von AtNHX1 in Tomate führte, trotz des steigenden Gesamtgehaltes an  $K^+$  durch verstärkte  $K^+$ -Akkumulation in der Vakuole, zu niedrigen zyttoplasmatischen  $K^+$ -Konzentration und einem scheinbaren  $K^+$ -Mangel (Pardo et al., 2006; Leidi et al., 2005). Der knockout von AtNHX1 hingegen führte zu einem vakuolären  $K^+$ -Mangel, der infolge niedrigen Turgors und ausbleibender Zellexpansion, in kleinen, welken Blättern resultierte (Apse et al., 2003). NHX-Transporter kommen zudem gehäuft an Vakuolen von Schließzellen vor, wo sie durch ihre Fähigkeit zur  $K^+$ -Akkumulation an den schnellen Turgorwechseln der Spaltöffnungen beteiligt sind (Apse et al., 2003; Shi, et al., 2002; Leidi et al., 2005).

### 1.3.6.2 Regulation des zellulären pH

Die Bedeutung des vakuolären Protonenpools für die Homöostase des zyttoplasmatischen pH und die zentrale Funktion der Protonenpumpen des Tonoplasten in diesem Prozess wurde bereits eingangs erwähnt. Dabei beschränkte sich die Rolle der NHX-Antiporter bisher vor allem auf die Akkumulation von  $K^+$  und/oder  $Na^+$  unter Ausnutzung des vakuolären Protonengradienten. 2000 entdeckte eine japanische Arbeitsgruppe, dass die mutative Zerstörung eines NHX1-Gens in *Ipomoea nil* zu Veränderungen der Blütenfarbe führt, bzw. der mit der Blütenöffnung einhergehende Farbübergang von purpurrot nach blau unterbleibt (Fukada-Tanaka et al., 2000). Dieser Farbwechsel spiegelt einen selektiven durch NHX1-vermittelten Anstieg des vakuolären pH-Wertes wider, der die Dissoziation des purpurfarbenen Anthocyanins in seine anionische blaue Form bewirkt (siehe Abb.6). Die NHX1-Antiporter, werden ca 12 h vor Blütenöffnung in den Blütenblättern verstärkt exprimiert. Das besondere an InNHX1 ist, dass er nicht durch NaCl induzierbar ist und kaum in Blatt, Stiel oder Wurzel vorkommt. Damit unterscheidet er sich deutlich von den anderen NHX-Genen, die auf eine NaCl-Behandlung mit einem Expressionsanstieg reagieren. Mit InNHX1 konnte erstmals einem NHX-Transporter eine spezifische Funktion in der pH-Kontrolle zugeordnet werden (Ohnishi et al. 2005). In der nahe verwandten Art *Ipomoea tricolor* wurde deutlich gemacht, dass die Kopplung von  $K^+$  und  $H^+$ -Fluxen zur Synchronisation von Blütenöffnung und Farbwechsel der Blütenblätter führt (Yoshida et al., 2005; Fukada-Tanaka et al., 2000): der ItNHX1-Antiporter initiiert 6 h vor vollständiger Öffnung der Blüte einen  $K^+$ -Einstrom, der zum Streckungswachstum der epidermalen Blüenzellen und somit zur Blütenöffnung führt. Zeitgleich bedingt der an den  $K^+$ -Einstrom

gekoppelte  $H^+$ -Ausstrom aus der Vakuole einen Anstieg des vakuolären pH-Wertes von 6,6 auf 7,7 wodurch die anionische Form des Hauptpigments, heavenly blue anthocyanine (HBA) in die anionische Form übergeht (Yoshida et al., 2009).



**Abbildung 6:**  
Blüten-Phenotypen von *Ipomoea nil* (aus Fukada-Tanaka et al., 2000)

**A:** Insertionsmutante  $\Delta lnNHX1$  (*pr-m*), besitzt einen um 0,7 Einheiten niedrigeren vakuolären pH als der Wildtyp bzw. die Revertante (*Pr-r*).

**B:** Revertante (*Pr-r*) die auf Blütenöffnung mit einem durch vakuolären pH-Anstieg bedingten Farbwechsel von purpur zu blau reagiert, während *pr-m* (A) die Purpurfarbe der Knospe beibehält.

### 1.3.6.3 Funktionen der NHX-Antiporter beim Vesikeltransfer und protein targeting

Die pflanzliche Vakuole entsteht in einem Prozess der Zelldifferenzierung aus provakuolären Vesikeln. Die Vakuole ausdifferenzierter Zellen bleibt über die Fusion und Abschnürung von Endo- und Exozytose-Vesikeln eng mit dem endosomalen System verbunden. Dieses System ist am besten in Hefezellen untersucht. Dort wurde gezeigt, dass der pH-Gradient zwischen dem Lumen derartiger Vesikel und dem Zytosol eine essentielle Voraussetzung für deren Bildung und Funktionsfähigkeit darstellt. Der ScNHX1-Transporter der Hefe steuert über den luminalen pH-Wert der späten endosomalen und provakuolären Kompartimente den zellulären Vesikelverkehr und die Proteinsortierung. Sein Verlust führt aufgrund der gestörten Vesikelfreisetzung zur Bildung vergrößerter Kompartimente („class E“), zu Störungen der vakuolären Biogenese und zur Fehlsortierung vakuolärer Proteinen wie der Carboxypeptidase Y an die Plasmamembran. Die  $\Delta nhx1$ -Nullmutante der Hefe zeigt daher einen gegen Hygromycin B, NaCl und KCl sensitiven Phänotyp (Gaxiola et al., 1999), der sowohl durch die Zugabe schwacher Basen (Mukherjee et al., 2006), als auch durch die heterologe Expression von NHX-Transportern der AtNHX1-4 und AtNHX5-6 Gruppe kompensiert werden kann (Quintero et al., 2000; Yokoi et al., 2002; Venema et al., 2003). Von entscheidender Bedeutung scheint dabei die Katalyse des  $K^+/H^+$ -Antiports zu sein (Brett et al., 2005b; Mukherjee et al., 2006).

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen pH-Regulation und Vesikelverkehr wird für die pflanzlichen NHX-Transporter angenommen. Dies gilt nicht nur für die Antiporter der Gruppe AtNHX5-6 (Rodríguez-Rosales et al., 2008), sondern auch der Gruppe AtNHX1-4. Zellen der T-DNA-Insertionsmutante von AtNHX1 zeigten ebenfalls stark fragmentierte Vakuolen und im RNA-Array deutliche Expressionsunterschiede bei zahlreichen Proteinen des vesikulären Proteinverkehrs (Sottosanto et al., 2004).

### 1.4 Intrazelluläre pH-shifts als Signale zur Auslösung des Sekundärstoffwechsels in *Eschscholzia californica*

In Zellkulturen des Kalifornischen Goldmohns (*Eschscholzia californica*) wurden in den letzten Jahren zahlreiche Belege für einen Signalweg zur Einschaltung des Sekundärstoffwechsels zusammengetragen, bei dem intrazelluläre Protonenfluxe ein zentrales Element darstellen. Dabei ergaben sich starke Hinweise für die Beteiligung vakuolärer NHX-Antiporter an der Entstehung dieser pH-Signale. Diese Daten sind der Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation.

Es wurde beobachtet, dass kultivierte Zellen von *Eschscholzia californica* auf den Kontakt mit einem Glycoprotein-Elicitor aus Pilzen mit der Überproduktion von zytotoxischen Benzophenanthridin-Alkaloiden reagieren. Während hohe Elicitor-Dosen auch die ubiquitär verbreitete hypersensitive Reaktion auslösen (u.a. Anstieg von Jasmonat, Bildung von ROS, externe Alkalisierung, Polyphenolsynthese, Zelltod), kann mit niedrigen Elicitor-Konzentrationen selektiv der Signalweg zur Expression der zur Alkaloid-Biosynthese benötigten Enzyme initiiert werden (siehe Abb.7).

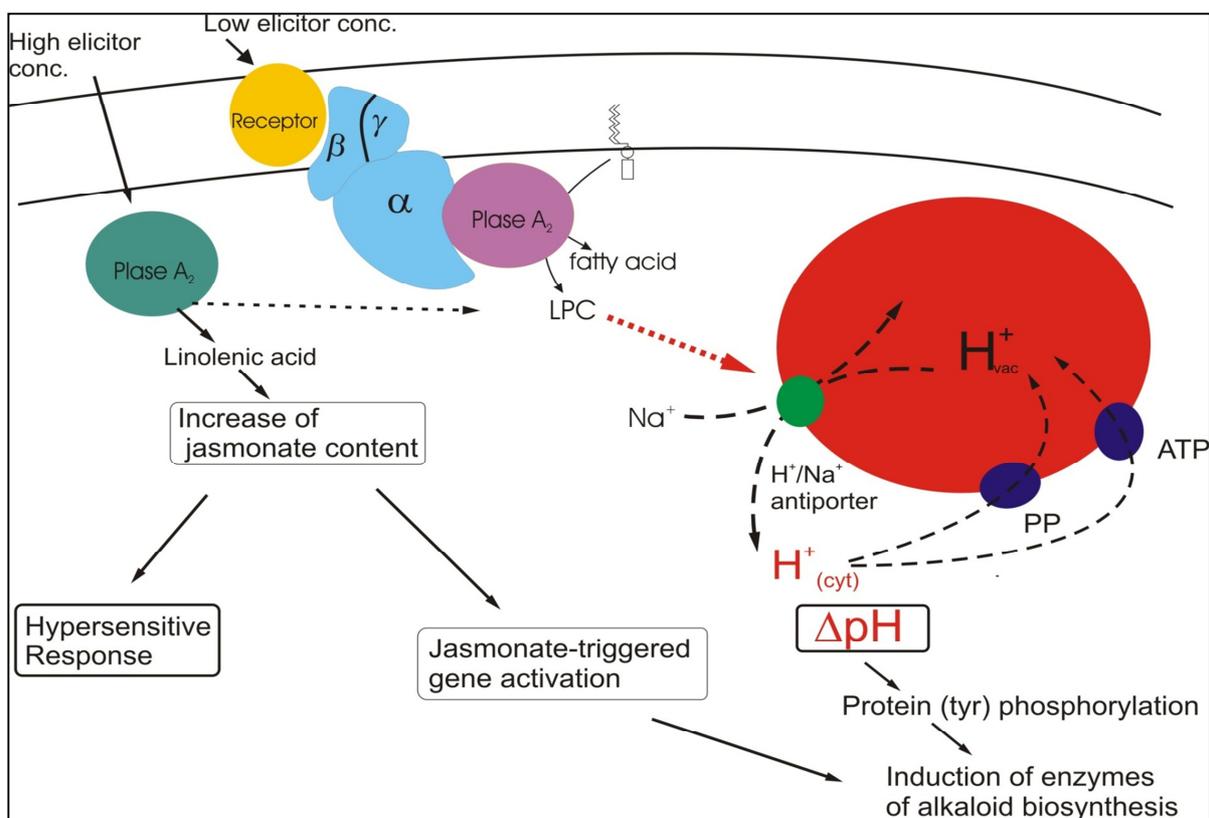
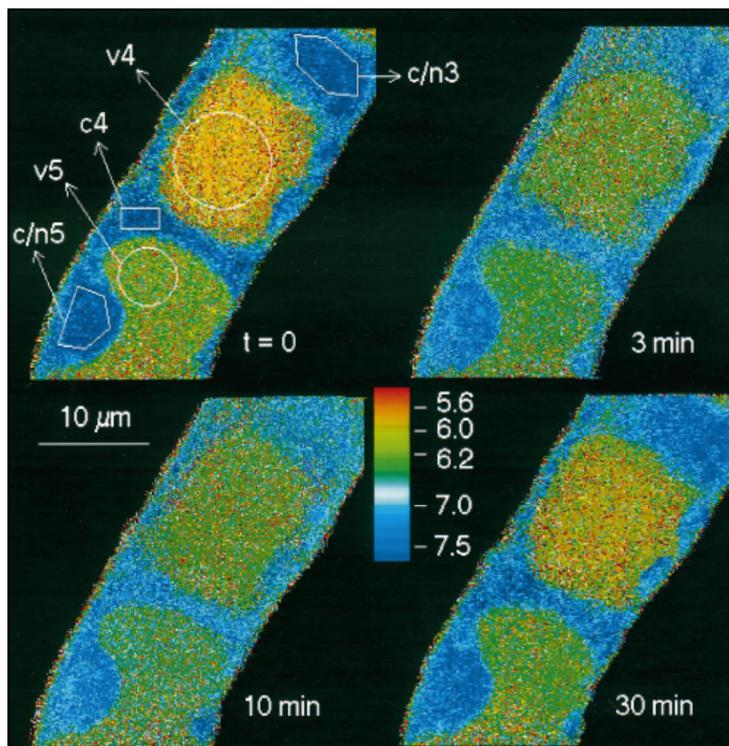


Abbildung 7: Signalwege zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in *Eschscholzia californica* (aus Roos et al., 2008)

Die Erklärung des Schemas erfolgt im nachfolgenden Text..

**Der Signalweg** zur selektiven Auslösung der Alkaloid-Biosynthese umfasst im Wesentlichen die drei folgenden Stufen, welche durch konfokale Mikroskopie in derselben Zelle nachgewiesen werden konnten (Viehweger et al., 2006):

1. Der Elicitor aktiviert in der Plasmamembran das Enzym **Phospholipase A2**, welches im Komplex mit einem G-Protein und einem Cyclophilin vorliegt. Diese Proteine modulieren die Aktivierbarkeit durch den Elicitor und die verfügbare Aktivität des Enzyms (Roos et al. 1998, Heinze et al. 2007, 2013, 2014).
2. Durch die Aktivität der Phospholipase A2 entsteht **Lysophosphatidylcholin (LPC)** welches an der Vakuole einen Efflux von Protonen auslöst, der zur **transienten Ansäuerung** des Zytoplasmas führt. Die parallel verlaufenden pH-shifts in Vakuole und Zytoplasma konnten durch konfokale pH-Topografie quantifiziert werden (siehe Abb.8). Extern zugesetztes LPC war außerdem imstande an *in situ* Vakuolen einen transienten Efflux von  $H^+$  auszulösen, siehe Abb.9 (Roos et al., 1998; Viehweger et al., 2002, Viehweger et al., 2006).

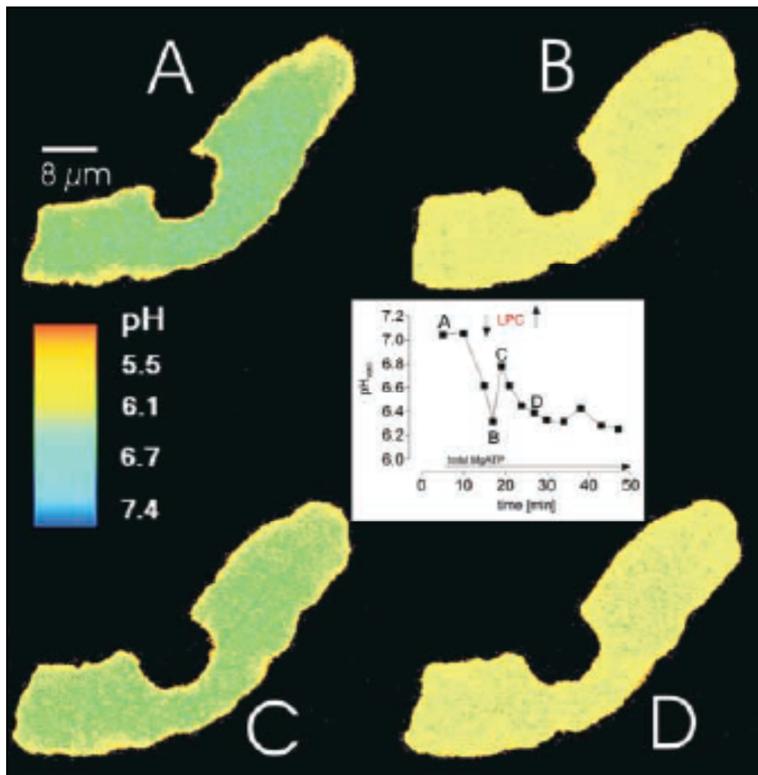


**Abbildung 8:**

**Elicitor-ausgelöste Änderungen der intrazellulären pH-Verteilung in *Eschscholzia californica* (aus Roos et al., 1998)**

Die Bilder zeigen konfokale pH-Karten eines Zelfadens aus Suspensionskultur. Der lokale pH wurde durch fluorescence ratioing mit dem Indikator SNARF ermittelt und farbkodiert dargestellt (Skala). Nach  $t=0$  wurde begonnen, die Zellsuspension unter dem Mikroskop mit niedrig konzentriertem Hefe-Elicitor zu perfundieren. Die Pfeile kennzeichnen Messbereiche, in denen der pH exakt quantifiziert wurde: Vakuole (v), Zytoplasma (c), Zellkernregion (c/n).

Nach Elicitor-Kontakt erfolgt ein Anstieg des pH in der Vakuole, parallel mit einem Abfall des pH im Zytoplasma. Details in Roos et al., 1998.



**Abbildung 9:**  
ATP- und LPC-angefaserte pH-Änderungen von *in situ* Vakuolen (aus Viehweger et al., 2002)

Die Bilder zeigen konfokale pH-Karten (Methode wie Abb. 8) derselben Zelle nach selektiver Permeabilisierung der Plasmamembran. Der pH-Indikator DM-NERF ist deshalb nur in der Vakuole präsent. ATP und LPC wurden nacheinander dem Aussenmedium zugesetzt.

**A:** Beginn der Perfusion bei pH<sub>ext</sub> = 7.4  
pH vac ~ 7.0

**B:** 10 min nach Zusatz von 3mM MgATP  
pH vac ~ 6.3

**C:** 4 min nach Zusatz von 1 µM LPC  
pH vac ~ 6.9

**D:** 11 min nach Zusatz von LPC.  
pH vac ~ 6.3

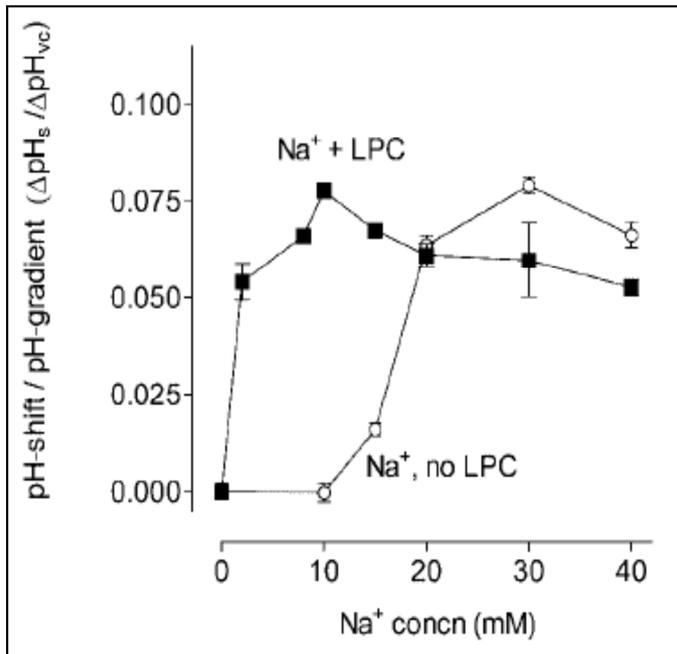
Das Inset zeigt den pH-Verlauf in der dargestellten Vakuole. Details in Viehweger et al., 2002. Die Bilder belegen die Ansäuerung durch ATP (via V-ATPase) und den reversiblen Verlust an H<sup>+</sup> durch LPC.

- Der transiente H<sup>+</sup>-peak im Zytoplasma wirkt als Signal für die **Aktivierung mehrerer Gene**, u.a. des Rate-limitierenden Enzyms der Alkaloid-Biosynthese, der 4-OMT und führt damit zur **Überproduktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden**. Dies wurde durch künstlich ausgelöste pH-shifts im Zytoplasma nachgewiesen, welche bei bestimmten Signaturen (zeitlicher und räumlicher Verlauf des pH) eine ähnliche Reaktion wie der Elicitorkontakt bewirken (Viehweger et al., 2006; Angelova et al., 2010).

### 1.4.1 Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LPC)

Für die vorliegende Dissertation ist die Wirkung von LPC auf den vakuolären pH von besonderer Bedeutung. Hierzu waren zu Beginn der Arbeit folgende Details bekannt:

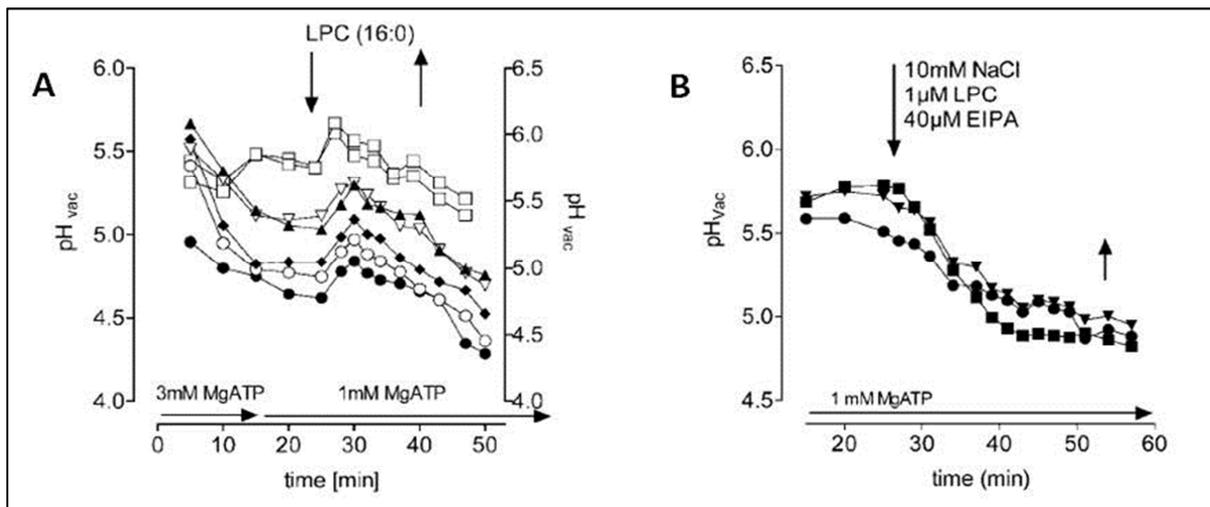
1. Das LPC-Molekül konnte in intakten Zellen identifiziert und durch MALDI-TOF MS quantifiziert werden. Wenige Minuten nach Elicitorkontakt tritt ein **transienter peak von LPC** auf, der eine geschätzte zytoplasmatische Konzentration von 1,9  $\mu\text{M}$  repräsentiert (Viehweger et al., 2002).
2. LPC wird in intakten Zellen **rasch reacyliert** (Schwartz und Roos, 2008). Der LPC-Gehalt ist daher auch bei aktiver Phospholipase A2 nur kurzzeitig (ca. 15 min) erhöht. Zur Dosis-Wirkungs-Analyse von LPC wurden Experimente an *in situ* Vakuolen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Zellen, deren Plasmamembran durch Behandlung mit osmotischen- und Temperatur-Gradienten für Mikromoleküle durchlässig gemacht wurde, wobei die dehnungsfähige Vakuole intakt bleibt. Die Intaktheit der Vakuole kann durch die ATP-abhängige Akkumulation von Protonen und deren Hemmbarkeit durch Bafilomycin oder durch die Pyrophosphat-abhängige Protonen-Akkumulation und Hemmbarkeit durch Etidronat bewiesen werden.
3. Am System der *in situ* Vakuole wurde gezeigt, dass LPC bereits in Konzentrationen um 1  $\mu\text{M}$  einen Efflux von  $\text{H}^+$  auslöst, dessen Ausmass durch die ausservakuoläre  **$\text{Na}^+$ -Konzentration** bestimmt wird (siehe Abb.10). Erst bei Konzentrationen  $> 10 \mu\text{M}$  traten membranschädigende Effekte auf. Der LPC-ausgelöste Efflux ist **reversibel** und durch das Amilorid-Derivat 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid (**EIPA**) vollständig **hemmbar** (siehe Abb.11).
4. Der LPC-Wirkung auf den Protonenefflux liegt höchstwahrscheinlich eine **direkte Interaktion** mit vakuolären Transportern zugrunde. Eine indirekte, auf Phosphorylierung/Dephosphorylierung beruhende Signalweitergabe ist unwahrscheinlich, da Effektoren von Proteinkinasen wie Staurosporin,  $\text{Ca}^{2+}$  oder BAPTA keinen Einfluß auf den LPC-Effekt haben (Viehweger et al., 2002). Aus diesen Befunden wurde die Arbeitshypothese abgeleitet, dass die durch Amilorid hemmbaren NHX-Antiporter des Tonoplasten der Angriffspunkt für den LPC-ausgelösten Efflux vakuolärer Protonen sind.



**Abbildung 10:** Einfluss von LPC auf den Na<sup>+</sup>-abhängigen H<sup>+</sup>-Efflux an *in situ* Vakuolen von *Eschscholzia californica* (aus Viehweger et al., 2002).

*In situ* Vakuolen wurden unter dem Mikroskop mit Aussenmedien der angegebenen NaCl-Konzentration perfundiert und der sich einstellende pH in der Vakuole durch konfokale pH-Topografie gemessen (Methode wie Abb. 8 und 9). Die Messpunkte zeigen die durch die anliegende Na<sup>+</sup>-Konzentration ausgelösten pH-Änderungen, bezogen auf den aktuellen pH-Gradienten zwischen Vakuole und Medium, d.h. der Triebkraft des H<sup>+</sup>-Efflux. Ein paralleles Experiment wurde in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  LPC durchgeführt.

Es ist ersichtlich, dass die für den Efflux von H<sup>+</sup> erforderliche Na<sup>+</sup>-Konzentration durch LPC etwa um den Faktor 10 verringert wird. Details in Viehweger et al., 2002.



**Abbildung 11:** Die Wirkung von EIPA auf den LPC-ausgelösten Efflux vakuolärer Protonen (aus Viehweger et al., 2002)

**A:** Der pH von *in situ* Vakuolen (Methode wie Abb. 8 und 9) wurde über 50 min nach Zusatz von MgATP und 10 mM NaCl kontinuierlich verfolgt. Nach 25 min wurde dem Perfusionsmedium 1  $\mu\text{M}$  LPC für 15 min zugesetzt. Jede Kurve repräsentiert den pH einer einzelnen Vakuole.

**B:** analoges Experiment zu A., jedoch wurde zeitgleich mit LPC der NHX-Inhibitor EIPA zugesetzt. In Gegenwart dieser Verbindung unterbleibt der LPC-ausgelöste und transiente pH-Anstieg.

### 1.5 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Mit der vorliegenden Dissertation wurde der Versuch unternommen, erstmals in intakten, Sekundärstoff-produzierenden Pflanzenzellen die Erfordernis von NHX-Antiportern für den pH-kontrollierten Signaltransfer zur Auslösung des Alkaloid-Stoffwechsels zu prüfen. Danach sollte die Aktivierung einzelner, klonierter NHX-Antiporter durch das Signalmolekül LPC in intakten Zellen nachgewiesen werden. Aufbauend auf den erwähnten Vorarbeiten, sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Sind NHX-Antiporter der Vakuole tatsächlich für den Elicitor-ausgelösten, pH-abhängigen Signalweg zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese erforderlich?

Da die bisherigen Daten ausschließlich aus einem artifiziellem System (*in situ* Vakuole) stammen, sollte durch die Etablierung einer NHX-silencing Mutante von *Eschscholzia californica* der Einfluss dieser Transporter auf den Signaltransfer in Ganzzellen, d.h. auf die Elicitor-ausgelösten Ereignisse "pH shift" und "Auslösung der Alkaloid-Überproduktion" geprüft werden.

2. Welche NHX-Gene sind in *Eschscholzia californica* aktiv und welche Verwandtschaft zeigen sie zu bekannten NHX-Gensequenzen anderer Pflanzen?

Hierzu wurden PCR-basierte Klonierungs- und Identifizierungsstrategien geplant.

3. Welcher der in *Eschscholzia californica* exprimierten NHX-Antiporter ist durch LPC aktivierbar?

Hierzu wurde die funktionelle Komplementation einer  $\Delta nhx1$ -Nullmutante aus Hefe ins Auge gefasst.

4. Lässt sich eine mögliche Interaktion von NHX-Transportern aus *Eschscholzia californica* mit LPC durch molecular modelling unterstützen?

Zur Erstellung eines 3D-Modells konnte als template ein bakterieller NapA-Antiporter genutzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Applichem	(Darmstadt, D)
GE Healthcare	(Freiburg, D)
Merck	(Darmstadt, D)
Roth	(Karlsruhe, D)
Serva	(Heidelberg, D)
Sigma	(Aldrich, D)

### 2.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte (siehe Anhang 7.1.1), Verbrauchsmaterialien (siehe Anhang 7.1.2) und Software (siehe Anhang 7.1.3) sind im Anhang aufgeführt.

### 2.3 Kitsysteme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kitsysteme sind im Anhang 7.1.3 aufgelistet.

### 2.4 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind thematisch wie folgt im Anhang aufgelistet:

1. für die Suche nach NHX-Genen verwendete Standard- und Race-Primer (siehe Anhang 7.3.1)
2. für die semiquantitative RT-PCR verwendete isoformspezifische Primer (siehe Anhang 7.3.2)
3. für die Kontroll-PCR (Flanken) zum Transformationsnachweis von Pflanzenzellen verwendete Primer (siehe Anhang 7.3.3)
4. für Auslese positiv transformierter Klone mittels Kolonie-PCR verwendeten Primer (siehe Anhang 7.3.4)
5. für die In-Fusion<sup>®</sup> HD- Klonierung (siehe Anhang 7.3.5)
6. für die Klonierung von EcNHX1-4 in Hefe verwendete Primer (siehe Anhang 7.3.6/7)

### 2.5 Enzyme und Polymerasen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzyme und Polymerasen verwendet:

Enzyme	Hersteller
LR Clonase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ribonuclease A (aus Rinderpankreas)	Sigma (München, D)
Restriktionsenzyme	Hersteller
BsrGI	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)
XhoI	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)
XbaI	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)
XbaI (Fast Digest)	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)
EcoRI (Fast Digest)	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)
Polymerasen	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase II	Finnzym/Thermo Scientific (Schwerte, D)
Roche PCR Mastermix	Roche (Basel, CH)
segentic Taq DNA Polymerase	Diagonal (Münster, D)
Taq DNA Polymerase	Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, D)

## 2.6 Plasmide und Mikroorganismen

Die verwendeten Plasmide und Mikroorganismen werden im Folgenden beschrieben:

Plasmide	Charakteristika	Referenz
p416GAL1-Vektor	GAL1 URA3 CEN	Mumberg et al., 1994
pCR 8/GW/TOPO -Vektor	SpecR, attL1/2	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pDrive Cloning Vektor	F':::Tn10(Tcr) proA+B+lacIqZΔM15]recA1 end A1hsdR17(rK12-mK12+) lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1	Qiagen (Hilden, D)
pJET1.2/blunt-Vektor	Amp <sup>R</sup>	Fermentas (Schwerte, D)
pK7GWIWG2(II)-Vektor	SpecR, KanR, CmR, 2x attR1/R2, <i>ccdB</i>	VIB (Department of Plant Systems Biology, University of Gent)
pBlueScript II-Vektor	Amp <sup>R</sup> lacPOZ	Agilent (Waldbronn, D)
Stamm	Charakteristika	Referenz
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>		
By4741	MATa; his3Δ0; leu2 Δ0; met15 Δ0; ura3 Δ0	Research Genetics, Huntsville AL
4290	BY4741; Mat a; his3 Δ1; leu2 Δ0; met15 Δ0; ura3 Δ0; YDR456w::kanMX4	EUROSCARF, Frankfurt
<b><i>E. coli</i></b>		
ccdB survival	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc-ccdA	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe, D)

## 2.7 Zellkultivierung

### 2.7.1 Pflanzenzellen (*Eschscholzia californica*)

#### Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden nach einem Wachstumszyklus von 9 Tagen in frisches LS-Medium überimpft. Dafür wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen abgefiltert, ca. 10 g in einen

300 µl Erlenmeyerkolben überführt und mit LS-Medium auf 150 ml aufgefüllt. In Abweichungen dazu wurden die transgenen Kulturen nach Augenmaß 9-12 Tage kultiviert und die doppelte Menge Zellen umgesetzt. Für die dauerhafte Kultivierung wurde den transgenen Kulturen 50 µg/ml Paromomycin, als Selektionsmarker zugesetzt. Die Kultivierungsbedingungen lauteten wie folgt:

1. Temperatur            24 °C
2. Rundschtüttler        100 rpm
3. Dauerlicht             $\sim 7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

### **Kalluskulturen**

Der Kallus wurde aus Zellen der oberen Wurzel von im Gewächshaus gezogenen *Eschscholzia californica* Pflanzen angelegt. Die Kalluskulturen wurden alle 3-4 Wochen unter sterilen Bedingungen auf frisches M21-Medium umgesetzt. Das M21-Medium der transgenen Kalluskulturen enthielt 100 µg/ml Paromomycin als Selektionsmarker. Die Kultivierungsbedingungen lauteten wie folgt:

1. Temperatur            24 °C
2. Dauerlicht             $\sim 7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

### **2.7.2 Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Die nativen Hefestämme wurden zunächst auf Vollmedium-Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C kultiviert. Die transgenen Hefestämme wurden unter gleichen Bedingungen auf -URA-Platten gehalten.

### **Vorkulturen**

Zum Anlegen einer Vorkultur wurde jeweils eine Hefe-Kolonie in 2 ml Vollmedium oder Minimalmedium suspendiert und über Nacht bei 30 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Vorkulturen wurden mit dem gleichen Medium auf 5 ml vergrößert und weitere 6-8 h unter gleichen Bedingungen kultiviert.

### **Hauptkulturen**

Zum Anlegen einer Hauptkultur wurden 5 ml Vorkultur (s.o.) in 45 ml Vollmedium oder Minimalmedium überführt und 6-8 h bei 30 °C und 120 rpm kultiviert. Die Kulturen wurden bei einer optischen Dichte von 1,0-2,0 für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

### **2.7.3 Nährmedien**

Die zur Kultivierung von Pflanzen- und Hefezellen verwendeten Nährmedien sind im Anhang 7.2 wie folgt aufgeführt:

Linsmaier/Skoog (LS)-Medium

M21-Medium  
 Vollmedium  
 Minimalmedium

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 Gewinnung genomischer DNA

Die Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenzellen erfolgte nach der CTAB-Methode aus Allen et al., 2006. Dazu wurde eine 7 Tage alte *Eschscholzia californica*-Zellkultur abgesaugt und unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill fein zermahlen. 200 mg Zellpulver wurden mit 1,2 ml Extraktionspuffer versetzt, gründlich gevortext und unter gelegentlichem Invertieren 30 min zu 65°C gestellt. Der Zellextrakt wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 800 µl einer Mischung aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) 20 min bei RT geschüttelt und zur Phasentrennung 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 800 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und vorsichtig invertiert. Nach 10 min wurden die ausgefällten Nukleinsäuren bei 13.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und RNA-Rückstände durch Zugabe von 2,5 µl RNase A (10 mg/ml) über 30 min bei 37°C verdaut. Die DNA wurde durch Zugabe von 25 µl Natriumacetat (3M) und 600 µl eiskaltem Ethanol 96 % (V/V) ausgefällt und nach 20 min bei -20°C, 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol 70 % (V/V) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank gelöst.

<u>Extraktionspuffer:</u>	1 M Tris/HCl-Lsg. (pH 8,0)	25 ml
	5 M NaCl-Lsg.	70 ml
	0,5 M EDTA-Lsg. (pH 8,0)	10 ml
	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	add 250 ml
	Vor Gebrauch frisch 0,5-1,0 % (V/V) β-Mercaptoethanol zusetzen	

### 2.8.2 Gewinnung von Gesamt-RNA

Die Gewinnung von RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits nach den Angaben des Herstellers.

### 2.8.3 Gewinnung von mRNA

Die mRNA wurde aus Gesamt-RNA (s.o.) mit Hilfe des PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System III nach Angaben des Herstellers gewonnen. Das Prinzip beruht auf der Biotinylierung der enthaltenen mRNA, ihrer Bindung an Streptavidin-markierte paramagnetische Partikel und anschließender Elution.

### 2.8.4 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte durch das Umschreiben von mRNA mit Hilfe des RevertAid<sup>®</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase-Kits und unter Verwendung von Oligo(dT)18-Primern, nach Angaben des Herstellers.

### 2.8.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurden im Laufe der Arbeit verschiedene Taq DNA Polymerasen verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers. Die in der Standard-PCR eingesetzten Basis-Primer sind im Anhang 7.3.1 aufgelistet. Die jeweiligen PCR-Programme lauteten wie folgt:

	<i>segentic</i> Taq DNA Polymerase (Diagonal)	Taq DNA Polymerase (Fermentas)	Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase II (Finnzym)
Initiale Denaturierung	94 °C      5 min	95 °C      1-3 min	98 °C      30 sec
Denaturierung	94 °C      45 sec	95 °C      30 sec	98 °C      5-10 sec
Annealing	40-60 °C      20-60 sec	40-60 °C      30 sec	40-60 °C      10-30 sec
Elongation	72 °C      30-60 sec/ kb	72 °C      1 min/ kb	72 °C      15-30 sec/kb
	25-30 Zyklen	25-40 Zyklen	25-35 Zyklen
Terminale Denaturierung	72 °C      7 min	72 °C      5-15 min	72 °C      5-10 min

Tabelle 1: Standard-PCR-Programme

### 2.8.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mit Hilfe der Race-PCR wurden, ausgehend von einer kurzen bekannten Sequenz in der codierenden Region eines NHX-Transkripts, die unbekanntes 5'- und 3'-Enden amplifiziert und danach die Volllänge-Sequenz des NHX-Transkripts identifiziert. Die Umsetzung erfolgte mit Hilfe des Marathon<sup>®</sup> cDNA Amplification Kits. Zu Beginn wurde zunächst eine adapterligierte doppelsträngige cDNA Bibliothek, als template für die darauf folgenden PCR's hergestellt. Dafür wurde aus Zellen von *Eschscholzia californica*-Zellkultur polyA-mRNA isoliert (siehe 2.8.3) und 1 µg davon in einer Erststrang-Synthese zunächst in einsträngige cDNA umgeschrieben. In einer Zweitstrang-Synthese erfolgte die Synthese des Gegenstranges und die Restriktion von Überhängen an den Doppelstrangenden. Daraufhin wurde in einer Adapter-Ligation-Reaktion ein partiell doppelsträngiger und am 5'-Ende phosphorylierter Marathon<sup>®</sup> cDNA Adapter an die Doppelstrangenden gebunden. Die nun adapterligierte doppelsträngige cDNA wurde 1:50 und 1:250 mit Tricin/ EDTA-Puffer

verdünnt und durch Erhitzen auf 94 °C über 2 min und anschließendem Abkühlen auf Eis, in Einzelstränge getrennt.

Die einzelnen Reaktionen wurden mit Hilfe des Kits nach Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt.

Für die Suche nach NHX-Transkripten in Zellkultur von *Eschscholzia californica* wurde eine Bibliothek aus unbehandelten Zellen und eine aus Salz-gestressten Zellen (1h, 100 mM NaCl) angelegt.

Die genspezifischen Primer sind im Anhang 7.3.1 aufgelistet.

Das empfohlene PCR-Programm wurde durch niedrigere Annealing-Temperaturen leicht abgewandelt:

RACE PCR-Programm:

Initialdenaturierung	94 °C	30 sec	x 1
Denaturierung	94 °C	5 sec	
Annealing/Elongation	68 °C	4 min	x 5
Denaturierung	94 °C	5 sec	
Annealing/Elongation	66 °C	4 min	x 5
Denaturierung	94 °C	5 sec	
Annealing/Elongation	64 °C	4 min	x 20-25
Terminale Elongation	72 °C	10 min	x 1

### 2.8.6.1 nested RACE-PCR

Die nested RACE-PCR wurde eingesetzt, um die Ausbeute an spezifischem Amplifikat zu erhöhen. Hierfür wurden zwei PCR's nacheinander durchgeführt. In der ersten PCR erfolgte, unter Verwendung eines genspezifischen Primers (GSP1) und eines Adapter-Primers (AP1), die Amplifizierung von zum Teil spezifischen und unspezifischeren DNA-Fragmenten. Um den spezifischen Anteil zu erhöhen, wurde eine Verdünnung der ersten PCR (1:50) als Matrize für eine weitere eingesetzt. Die dafür verwendeten Primer binden weiter innen an die Matrize und kommen einer Verlängerung der ursprünglichen Primersequenzen gleich. Sie werden daher als genspezifischer nested Primer (GSP2) und Adapter-Primer 2 (AP2) bezeichnet. Für die nested RACE-PCR wurden nach einer Initialdenaturierung lediglich die Zyklen mit Denaturierung von 5 sec und Annealing/Elongation bei 64 °C und anschließender terminalen Elongation durchgeführt.

## 2.8.7 Semiquantitative RT-PCR

### Pflanzliche Zellkulturen

Aus 6 Tage alten Suspensionskulturen des Wildstammes und transgener Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.8.2), wovon 5 µg in cDNA umgeschrieben wurden (siehe 2.8.4). Die cDNA wurde 1:100 verdünnt in der unten beschrieben isoformspezifischen PCR eingesetzt. Durch Abbruch der PCR bei unterschiedlichen Zykluslängen wurde in einem Vorversuch für jedes template der Zyklus in der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmt und bei der späteren Bestimmung der Expressionslevel verwendet. Mit jeder PCR wurde Actin als Referenzgen und template-freie Proben als Negativkontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes (siehe 2.8.9) und anschließender densitometrischer Quantifizierung der Banden (Bandenfläche x mittlere Intensität) mit Hilfe von Optimas<sup>®</sup> 5.0. Die errechneten Expressionslevel beschreiben den quantifizierten Unterschied zwischen einem template und seiner Bezugsbasis, normiert auf dessen Actin-Level. Die isoformspezifischen Primer sind im Anhang 7.3.2 aufgelistet. Die Bedingungen für die RT-PCR lauteten wie folgt:

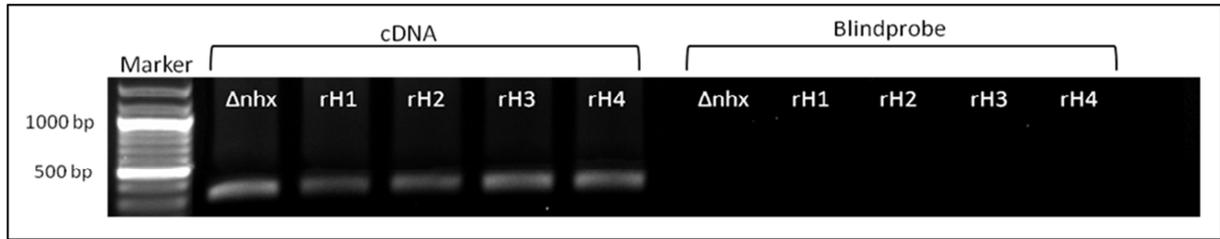
<u>RT-PCR-Ansatz:</u>	cDNA (1:100)	3 µl
	2x Roche <sup>®</sup> PCR Mastermix	10 µl
	forward Primer (1:5)	1,0 µl
	reverse Primer (1:5)	1,0 µl
	ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl

### RT-PCR Programm:

Initialdenaturierung	95 °C	10 min	x 1
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealling	55/ 58 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	x 28-33
Terminale Elongation	72 °C	10 min	x 1

### Hefekulturen

Im Unterschied zur RT-PCR in pflanzlichen Zellkulturen (s.o.) wurde aus induzierten Hauptkulturen (siehe 2.8.23.1) Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.8.2) und 400 ng in cDNA (siehe 2.8.4) umgeschrieben. Dabei wurde für jeden Stamm eine reverse Transkriptase-freie Blindprobe mitgeführt, um die Anwesenheit chromosomaler DNA auszuschließen (siehe Abb. 12). Die cDNA wurde 1:30 verdünnt und unter den oben beschriebenen Bedingungen eine PCR angesetzt. Die RT-PCR für EcNHX1-4 wurde für alle Stämme bei 58 °C und 30 Zyklen durchgeführt. Als Referenzgen wurde das Histon H1 bei 55 °C und 30 Zyklen bestimmt.

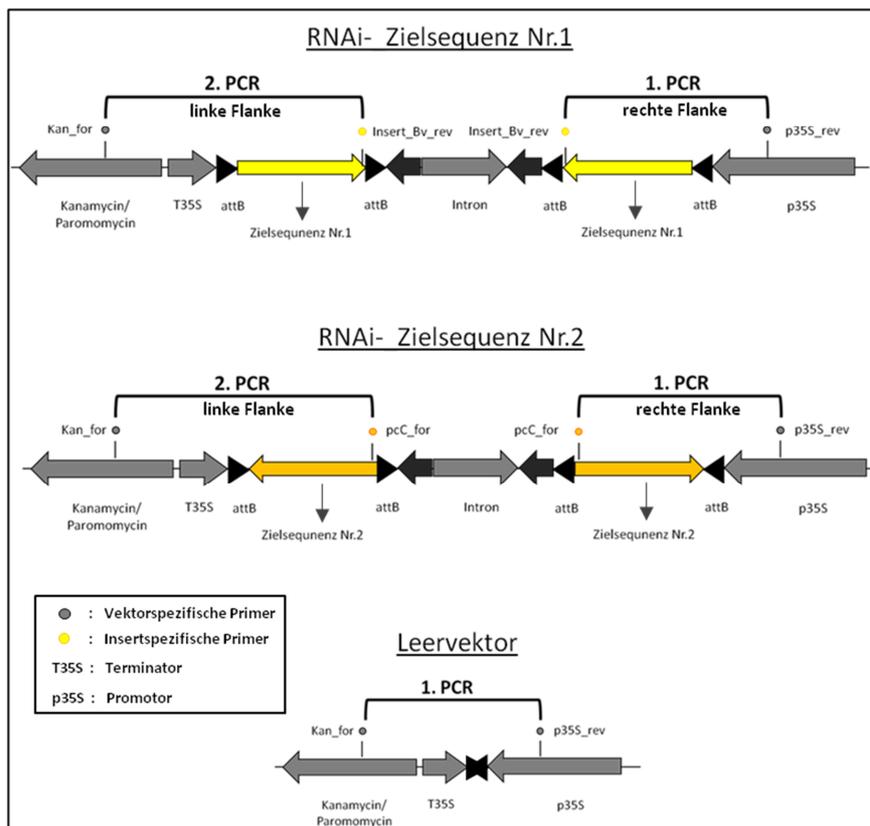


**Abbildung 12: Nachweis von Histon H1 in cDNA rekombinanter Hefestämme**

Die PCR erfolgte nach den oben genannten Bedingungen. Als template dienten gleiche Mengen an cDNA und reverse Transkriptase-freier Blindproben. Histon H1 diente der Kontrolle gleicher Mengen template. **Δnhx**: Δnhx1-Nullmutante (4290) aus *Saccharomyces cerevisiae*, **rH1-4**: rekombinante Δnhx1-Nullmutante, mit der hinzugewonnenen Fähigkeit zur selektiven Expression eines aus *Eschscholzia californica* stammenden NHX-Gens (NHX1/2/3/oder 4).

### 2.8.8 Kontroll-PCR (Flanken)

Für den Nachweis des RNAi-vermittelnden Vektors im Genom transgener Kulturen wurde auf Basis genomischer DNA eine über die Vektorflanken übergreifende PCR durchgeführt. Die Extraktion genomischer DNA erfolgte nach 2.8.1 aus einer erbsengroßen Menge transformierter Kallus-Kultur. Die Zellen wurden mit einem Stößel zerdrückt und in 600 µl Extraktionspuffer (65 °C) aufgenommen. Abweichend vom in 2.8.1 aufgeführten Protokoll wurden nur halbe Volumina eingesetzt. Mit der PCR wurde gleichzeitig auf das Vorhandensein von Vektor-DNA und einklonierter Zielsequenz getestet, indem ein vektorspezifischer Primer mit einem Zielsequenzspezifischen Primer kombiniert wurden (siehe Abb. 13). Als Positivkontrolle wurden die für die Tranfomation verwendeten RNAi-vermittelnden Expressionsvektoren bzw. der Leervektor als template eingesetzt (siehe 2.8.22.3). Die PCR-Bedingungen sind im Anhang 7.5.1 aufgeführt.



**Abbildung 13: Vorgehensweise bei der Flanken-übergreifende PCR zum Nachweis der Transformation von Zellen aus *Eschscholzia californica***

Schematische Darstellung von Ausschnitten des RNAi-vermittelnden Expressionsvektors (pK7GWIWG2(II)) mit und ohne einklonierter Zielsequenz. Die Vektor- und Insert-spezifischen Primer sind im Anhang 7.3.3 aufgeführt. In einer ersten PCR erfolgte der Nachweis der rechten Flanke, in einer zweiten der der Linken. Zielsequenz Nr.1: gelbe Pfeile in Leserichtung, Zielsequenz Nr.2: orangene Pfeile in Leserichtung, RNAi-vermittelnder Expressionsvektor: graue Pfeile in Leserichtung.

### **2.8.9 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen**

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt, auf ein 1% iges Agarosegel geladen und in 30-60 min bei einer Spannung von 100-120 V aufgetrennt. Das Gel wurde durch Aufschmelzen von 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer und Zusatz von 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung bei 60 °C, vorbereitet. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Anregung bei 320 nm. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe der Digitalkamera Camedia E10 oder dem Dokumentations-System, Molecular Manager Gel Doc<sup>®</sup>XR<sup>+</sup> dokumentiert. Für die Bestimmung der Fragmentgröße wurden 5 µl eines DNA-Größenmarkers aufgetragen (siehe Anhang 7.4.1). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang aufgeführt (Details siehe Anhang 7.4.1).

### **2.8.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die Ziel-DNA-Bande wurden aus dem Gel ausgeschnitten und entweder mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit oder dem Zymoclean<sup>®</sup> Gel DNA Recovery Kit extrahiert. Die Aufreinigung basiert auf der Bindung von DNA an Ionenaustauschersäulen und anschließender Elution. Die genaue Vorgehensweise ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

### **2.8.11 Extraktion von DNA aus Reaktionsansätzen**

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen oder aus Restriktionsverdauen wurden mit dem GenJET<sup>®</sup> PCR Purification Kit extrahiert. Die DNA wurde dabei an Ionenaustauschersäulen gebunden und anschließend eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben.

### **2.8.12 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration**

Die Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte über Messung der Absorption bei 260 nm mit Hilfe des Ultrospec II /Genequant<sup>®</sup>1300 Spektrometer oder des Nano Photometer<sup>®</sup>P-300. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Die Quotienten  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  und  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  dienen der Bestimmung der DNA-Qualität.

### **2.8.13 Klonierung von PCR-Produkten für die Sequenzierung**

#### **2.8.13.1 pDrive-Vektor-Klonierung**

PCR-Produkte mit einem A-Überhang d.h. Produkte einer Taq DNA Polymerase wurden mit Hilfe des QIAGEN<sup>®</sup> PCR Cloning Kit in den pDrive<sup>®</sup> Cloning Vektor kloniert. Dazu wurde der linearisierte pDrive Cloning Vektor mit U-Überhängen und ein 5-10 fach molarer Überschuß an aufgereinigtem PCR-Produkt nach Herstellerangaben miteinander ligiert. Die

Reaktion erfolgte je nach Produktgröße über 30-120 min bei 4-16 °C im Kühlschrank. Der rezirkularisierte Vektor wurde anschließend in *E.coli* transformiert (siehe Kap.2.8.19.1).

### **2.8.13.2 pJET1.2/blunt-Vektor-Klonierung**

Blunt-end DNA-Sequenzen als Produkt einer Pfu DNA Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität wurden mit dem CloneJET<sup>®</sup> PCR Cloning Kit in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert. Dazu wurde der an den 5'-Enden phosphorylierte und linearisierte pJET1.2/blunt-Vektor mit dem aufgereinigten blunt-end PCR-Produkt (entsprechend 0,15 pmol blunt-ends) im 3fachen Überschuß und nach Vorgaben des Herstellers ligiert. Die Ligation erfolgte je nach Produktgröße über 5-30 min bei RT. Der rezirkulierte Vektor wurde anschließend in *E.coli* transformiert (siehe Kap.2.8.19.1).

### **2.8.13.3 pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektor-Klonierung**

Taq-amplifizierte PCR-Produkte die für eine spätere Gateway-Klonierung vorgesehen waren, wurden mit Hilfe des pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>TA Cloning<sup>®</sup> Kits in den pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert. Das Prinzip besteht in der Reaktion zwischen dem Topoisomerase I-gebundenen, linearisierten pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektor und dem aufgereinigten, Taq-amplifizierten PCR-Produkt. Hierbei bindet das 5'-Hydroxyl-Ende des PCR-Produktes an das 3'-Ende des Vektorstranges und verdrängt die Topoisomerase I. Die Reaktion erfolgte je nach Größe des PCR-Produktes innerhalb 5-30 min bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers. 2 µl des rezirkularisierten pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektors wurden anschließend in *E.coli* transformiert (siehe Kap.-2.8.19.1) und bei einer nachfolgenden Gateway-Klonierung als Entry-Vektor eingesetzt (siehe Kap.2.8.14).

### **2.8.13.4 In-Fusion<sup>®</sup>HD Klonierung in den pBlueScript II-Vektor**

Der EcNHX1-ORF's wurde mit Hilfe der In-Fusion<sup>®</sup> HD Klonierung in den pBlueScript II-Vektor kloniert. Bei dieser Methode wird ein DNA-Fragment mit Hilfe überlappender Primer in einen geöffneten Vektor amplifiziert und das DNA-Fragment statt durch Ligation direkt in den linearisierten Vektor amplifiziert.

#### **Linearisierung des pBlueScript II-Vektors**

Der pBlueScript II-Vektor (pBKS) wurde für 1,5 h bei 37 °C mit XbaI/EcoRI verdaut. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 80 °C und anschließendem Erhitzen auf 68 °C für 20 min, abgestoppt (Details siehe Anhang 7.5.1).

### In-Fusion-Produkt

In einer ersten PCR wurde der EcNHX1-ORF mit im 5'UTR- und 3'UTR-Bereich liegenden Primern, durch PCR amplifiziert (Details siehe Anhang 7.5.1).

In einer weiteren PCR wurde ein 15 bp langer Überhang durch Infusion-Primer angefügt. Die Primer stimmen in 20 bp mit der EcNHX1-Sequenz und in 15 bp mit der Vektorsequenz überein. Sie beschreiben exakt den Übergang vom EcNHX-ORF zum pBluescript II-Vektor an der ausgewählten Restriktionsschnittstelle (XbaI/EcoRI). Als template diente das unaufgereinigte PCR-Produkt der ersten PCR in einer 1:10 Verdünnung (Details siehe Anhang 7.5.1). Die verwendeten Primer sind dem Anhang 7.3.5 zu entnehmen.

### In-Fusion<sup>®</sup> HD Klonierung

Für die In-Fusion<sup>®</sup> HD Klonierung wurde der linearisierte Vektor (s.o.) mit dem In-Fusion-Produkt (s.o.) für 15 min bei 50 °C mit dem HD In-Fusion<sup>®</sup> Enzyme Premix inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt (Details siehe Anhang 7.5.1).

#### 2.8.14 Gateway-Klonierung

Mit Hilfe der Gateway-Klonierung wurden die RNAi-vermittelnden Expressionsvektoren für das gene silencing (siehe 2.8.22) kloniert. In Form einer LR-Reaktion (s.u.) wurde ein Austausch heterologer DNA-Sequenzen zwischen attR-sites des destination-Vektors und attL-sites des entry-Vektors vorgesehen (siehe Abb. 14). Die Reaktion wurde mit Hilfe des „Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase<sup>®</sup> II“- Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

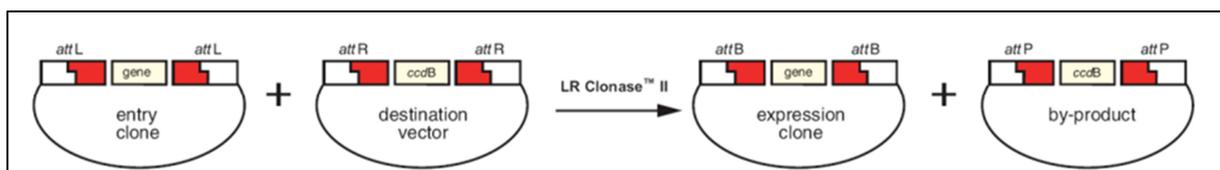


Abbildung 14: Prinzip der LR-Reaktion nach dem Gateway<sup>®</sup>Technology-Handbuch (Invitrogen)

#### 2.8.15 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von der Firma Fermentas bezogen. Für den Verdau wurde die DNA mit den benötigten Restriktasen im vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37 °C inkubiert. Die Länge der Inkubation richtete sich nach der Menge an DNA. Dabei wurde für 1 µg DNA, 1 h pro Enzym-Einheit berücksichtigt.

Verdau:	Proben-DNA	0,5 – 1,0 µg
	10x Reaktions-Puffer	2,0 µl
	Restriktionsendonuklease (10 u/µl)	0,5 – 2,0 µl
	ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl

Ein Doppel- oder Mehrfachverdau erfolgte nach dem folgenden Schema:

<u>Doppelverdau:</u>	Plasmid-DNA	0,5 - 1,0 µg
	Reaktions-Puffer	2,0 - 4,0 µl
	Restriktionsenzym	1,0 - 2,0 µl
	<hr/>	
	ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl

Mögliche Enzymkombinationen und die dafür geeigneten Reaktions-Puffer wurden über [www.fermentas.com/doubledigest](http://www.fermentas.com/doubledigest) ermittelt. Die eingesetzte Menge an Restriktionsenzymen durfte dabei nicht mehr als 10 % (V/V) des Gesamtansatzes überschreiten.

### 2.8.16 Ligation

Für die Ligation von Vektor- und gegebenenfalls Insert-DNA wurden die Fragmente mit denselben Restriktionsenzymen verdaut (2.8.15) und gereinigt (2.8.9, 2.8.10). Pro Ansatz wurden insgesamt 400-800 ng DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt (s.u.) und durch eine T4 DNA Ligase über Nacht bei 16 °C ligiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt und 5-10 µl in *E.coli* transformiert.

<u>Ligation:</u>	Vektor-DNA/Insert-DNA (400-800 ng)	10 µl
	10x Ligationspuffer	2 µl
	T4 DNA Ligase (5 u/µl)	1 µl
	<hr/>	
	dd H <sub>2</sub> O	add 20 µl

### 2.8.17 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) durch die Firma Eurofins Genomics. Dafür wurden die PCR-Fragmente und Plasmide gereinigt (siehe 2.8.10 bzw. 2.8.21.2) und auf die von Eurofins Genomics empfohlenen Konzentrationen eingestellt. Bei der Klonierung der Hefe-Expressionsvektoren erfolgte die Sequenzierung über den ABI Prism<sup>®</sup>377 DNA Sequenzer der Arbeitsgruppe Prof. Breunig (Institut für Biologie, MLU Halle- Wittenberg). Dafür wurden die Plasmide wie oben beschrieben gereinigt und mit Hilfe des Big Dye<sup>®</sup> Terminator Kits eine Sequenzier-PCR nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, mit 10 µl Natriumacetat (3M, pH 4,8) versetzt und durch Zugabe von 250 µl Ethanol 96 % (V/V) und gelegentlichem Invertieren ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm über 20 min abgetrennt und das Pellet nach zweimaligen Waschen mit Ethanol 70 % (V/V) an der Luft getrocknet. Danach erfolgte die Elektrophorese im DNA-Sequenzer.

## 2.8.18 Herstellung kompetenter Zellen

### 2.8.18.1 *E.coli*

Aus einer Kolonie des *E.coli*-Stammes TOP10 (siehe Kap.2.6) wurde eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium angelegt und über Nacht bei 37°C und 160 Upm geschüttelt. 500 µl dieser Vorkultur wurden in 100 ml LB-Medium suspendiert und bei 37°C und 160 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,3 kultiviert. Die Zellen aus 2x50 ml Kultur wurden bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert und die Pellets zu 2x12,5 ml in 4 °C kalter Lösung A resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis gestellt und die Zellen danach abzentrifugiert (s.o.). Die Pellets wurden nach Aufnahme in 2x1 ml 4°C kalter Lösung B vereint und zu 50 µl bzw. 100 µl aliquotiert. Die mit flüssigem Stickstoff schockgefrosteten Aliquots wurden bei -70°C aufbewahrt.

<u>Lösung A:</u>	Kaliumacetat	30 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Kaliumchlorid	100 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Glycerin	15 % (m/V)
<u>Lösung B:</u>	MOPS (pH 7,0)	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Kaliumchlorid	10 mM
	Glycerin	15 % (m/V)
<u>LB-Medium:</u>	Trypton	1 % (m/V)
	Natriumchlorid	1 % (m/V)
	Hefe-Extrakt	0,5 % (m/V)

### 2.8.18.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Aus einer Kolonie der Hefestämme By4741 und 4290 (siehe Kap.2.6) wurden Vorkulturen angelegt (siehe Kap.2.7.2). Die 2 ml Vorkultur wurde in 25 ml Vollmedium bei 30 °C und 140 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,8 kultiviert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C über 5 min abgetrennt und das Pellet in 1 ml PLAG-Lösung resuspendiert. Der Kultur wurden 125 µl RNA (10 mg/ml) zugesetzt und 150 µl Aliquots angefertigt, welche langsam bei -70 °C eingefroren wurden.

<u>PLAG solution:</u>	Lithiumacetat	0,1 M
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	PEG 4000	40% (m/V)
	Glycerol	15 % (m/V)

autoklavieren

## 2.8.19 Transformation von Zellen

### 2.8.19.1 Hitzeschock-Transformation von *E.coli*

Auf **50 µl-Aliquots** gefrorener kompetente *E.coli*-Zellen (s.o.) wurden 2-5 µl Vektor-DNA zugegeben und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie 35 sec bei 42°C erwärmt und direkt danach für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (s.u.) versetzt und 1h bei 37 °C und 600 rpm geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde auf einer Selektionsplatte (siehe Kap.2.8.20.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. **100 µl Aliquots** wurden analog behandelt, jedoch wurden bis zu 20 µl Klonierungsansatz zugesetzt, 20 min auf Eis gestellt, 2 min bei 42 °C erwärmt und 2 min auf Eis abgekühlt, bevor sie mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert und nach Aufnahme in 100 µl SOC-Medium, ausgestrichen.

<u>SOC-Medium:</u>	Hefeextrakt	0,5 % (m/V)
	Trypton	2,0 % (m/V)
	Natriumchlorid	10 mM
	Kaliumchlorid	2,5 mM
	Glukose	20 mM
autoklavieren		
	Magnesiumchlorid (1M, sterilfiltriert)	+ 10 mM
	Magnesiumsulfat (1M, sterilfiltriert)	+ 10 mM

### 2.8.19.2 Transformation von Hefezellen

Für die Hefetransformation wurden 1-2 µg Plasmid-DNA zu den gefrorenen kompetenten Hefezellen (s.o.) gegeben und der Ansatz bei 37 °C über 15-30 min geschüttelt. Die Zellen wurden danach bei 42°C über 1-1,5 h inkubiert und auf -URA-Platten (siehe Kap.2.8.20.2) ausgestrichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C kultiviert. Einzelne Kolonien wurden erneut auf -URA-Platten ausgestrichen und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

### 2.8.19.3 Biolistische Transformation von Pflanzenzellen

#### Zellvorbereitung

In Vorbereitung auf die Transformation wurden Zellen einer Kallus-Kultur von *Eschscholzia californica* dünn und gleichmäßig auf sterile Filterplättchen (Ø 21 mm) verteilt und 5 Tage auf M21-Medium (siehe Anhang 7.2) kultiviert.

#### Goldpartikel-Präparation

Um die RNAi-vermittelnden Expressionsvektoren an Goldpartikel anzuhaften, wurden zunächst 60 mg Goldpartikel (1,0 µm) in 1 ml ddH<sub>2</sub>O suspendiert, 40 µl entnommen und die Partikel abzentrifugiert. Das Goldpellet wurde mit 2x50 µl ddH<sub>2</sub>O durch Dispergieren im

Ultraschallbad und anschließendem Zentrifugieren gewaschen. Dem Goldpellet wurden 5 µg des Expressionsvektor zugesetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei halber Stärke 1 min gevortext. Anschließend wurden 20 µl Spermidin (0,1 M) und tropfenweise 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) zugesetzt, 3 min bei halber Stärke gevortext und die beladenen Partikel abzentrifugiert. Das Goldpellet wurde mit 200 µl Ethanol 96% p.a. gewaschen, in 84 µl Ethanol 96% p.a. aufgenommen und auf Eis gestellt.

### **Transformation**

Die Transformation von *Eschscholzia californica* erfolgte mit dem Biolistic<sup>®</sup>-PDS-1000/He Particle Delivery System (Partikelkanone). Ca. 100 mg Kallus-Zellen wurden auf dem Filterplättchen (s.o.) mit 6 µl der o.g. DNA-Goldpartikel-Präparation und einem Druck von 1100 psi beschossen. Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren.

Insgesamt wurden jeweils 30 Zellplättchen mit der in den Expressionsvektor einklonierten Zielsequenz Nr.1 und Nr.2 beschossen. Der Leervektor wurde insgesamt auf 2x10 Zellplättchen geschossen.

## **2.8.20 Selektion transformierter Zellen**

### **2.8.20.1 *E. coli***

#### **Resistenzgen-Nachweis**

Die Selektion plasmid-tragender *E.coli*-Zellen erfolgte zunächst über die Kultivierung der Bakterien auf antibiotikumhaltigem LB-Medium. Die Antibiotika wurden abhängig vom Vektor ausgewählt und in folgenden wirksamen Konzentrationen eingesetzt (Details siehe Anhang 7.3.4):

Antibiotikum	Wirksame Konzentrationen
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

#### **Reportergen-Nachweis**

Während das Resistenzgen auf bloße Anwesenheit des Vektors selektiert, kann über das LacZ-Gen des BlueKSm-Vektors die erfolgreiche Einklonierung des Inserts in den Vektor kontrolliert werden. Das LacZ-Gen codiert für eine β-Galaktosidase welches bei fehlgeschlagener Vektor/Insert-Klonierung funktionstüchtig exprimiert wird und das Substrat XGal in einen blauen Indigo-Farbstoff umwandelt. Für die Selektion pBKS-tragender Zellen wurde dem Nähragar neben einem Antibiotikum (siehe Anhang 7.3.4), der XGal-Farbstoff in einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugesetzt und die nicht-blauen Kolonien selektiert.

### Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurden Transformanten auf die Größe des DNA-Inserts geprüft. Pro Klonierungsversuch wurden 5-10 Kolonien gepickt und vor dem direkten Suspendieren im PCR-Mastermix, auf eine neue Selektionsplatte übertragen. Bei einem breit angelegten Screening wurden die Kolonien gepoolt. Für die PCR wurden vektorspezifische, die multicloning site flankierende Primer eingesetzt (siehe Anhang 7.3.4). Für die Kolonie-PCR wurde entweder Mastermix aus den unten angegebenen Bestandteilen vorbereitet oder ein bereits gebrauchsfertiger Roche® PCR Mastermix nach Herstellerangaben verwendet. Die Bedingungen lauteten wie folgt:

<u>Mastermix:</u>	10x PCR-Reaktionspuffer	2,0 µl
	Forward-Sequence-Primer (10µM)	0,2 µl
	Reverse-Sequence-Primer (10µM)	0,2 µl
	dNTPs (10mM)	0,4 µl
	Taq DNA Polymerase	0,2 µl
	ddH <sub>2</sub> O	17 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

Bakteriein-Kolonie suspendieren

Bei der Kolonie-PCR dient die Bakterien-Zelle als template. Die besonders intensive Initialdenaturierung zu Beginn der Reaktion (s.u.), sorgt dabei für die Freisetzung der bakteriellen DNA durch Zerstörung der Plasmamembran.

<u>Kolonie-PCR Programm:</u>	Initialdenaturierung	95 °C	10 min	x 1
	Denaturierung	95 °C	30 sec	
	Annealing	58 °C	1 min	
	Elongation	72 °C	1 min	x 40
	Terminale Elongation	72 °C	10 min	x 1

#### 2.8.20.2 Hefezellen

Die Selektion plasmid-tragender Hefezellen erfolgte auf Basis der Nukleinbasen-Prototrophie des Vektors über die Anzucht in einem synthetischen Minimalmedium ohne die entsprechende Nukleinbase, hier Uracil (siehe Anhang 7.2)

#### 2.8.20.3 Pflanzenzellen (*Eschscholzia californica*)

Durch biolistisch transformierte Zellen wurden 5 Tage zur Erholung auf M21-Medium kultiviert. Danach wurden sie zunächst für 14 Tage auf ein halbkonzentriertes Selektionsmedium gesetzt, bevor sie endgültig auf Selektionsmedium gehalten wurden. Die Selektion erfolgte über die Paromomycin-Resistenz transformierter Zellen. Die nach 10 Wochen gewachsenen Kalli wurden vereinzelt und regelmäßig alle 4 Wochen umgesetzt.

Für die Überführung von Kallus-Kultur in Suspensions-Kultur wurde 1 g Kalluszellen in 1 ml LS-Selektionsmedium suspendiert und 7 Tage unter den in 2.3.1 aufgeführten Bedingungen kultiviert. Dabei wurde die Zellen aller 7 Tage umgesetzt unter schrittweiser Erhöhung des Gesamtvolumen von 1 ml auf 2 ml über 5 ml, 10 ml, 50 ml 100 ml, bis auf 150 ml vergrößert. Die stabile Zellkultur wurde regelmäßig aller 9 Tage passagiert (siehe Kap 2.7.1). Zusammensetzung der Nährmedien siehe Anhang 7.2.

## 2.8.21 Plasmid Präparationen

### 2.8.21.1 Mini-Plasmid Präparation durch alkalische Lyse

Für die Mini-Plasmid Präparation durch alkalische Lyse wurden 2x1,4 ml Bakterien-Vorkultur 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert, 200 µl Lösung II zugegeben und der Ansatz durch 5x invertieren gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III und 5x invertieren wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz 8 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das klare Zelllysate im Überstand abgenommen. Die DNA wurde durch Zugabe von 450 µl Isopropanol ausgefällt, 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 150 µl Ethanol 70% (V/V) gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

<u>Lösung I:</u>	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
	Tris/ HCl	25 mM
	dd H <sub>2</sub> O	add 100 ml
	autoklavieren	pH 8,0
<u>Lösung II:</u>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (m/V)
	dd H <sub>2</sub> O	add 100 ml
	autoklavieren	
<u>Lösung III:</u>	Kaliumacetat	3 M
	Essigsäure	5,75 ml
	dd H <sub>2</sub> O	add 100 ml
	sterilfiltrieren	

### 2.8.21.2 Plasmidpräparation mit Kit-Systemen

Für die Präparation von Plasmiden, die aufgrund ihrer Verwendung für Sequenzierungen oder Transformationen eine höhere Reinheit voraussetzten, wurde der QIAprep Spin<sup>®</sup> Miniprep Kit oder der GeneJET<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Beide Systeme beruhen auf der Bindung von Plasmid-DNA an Ionenaustauschersäulen und anschließender Elution.

## 2.8.22. Gene silencing

In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip des gene silencing benutzt, um einen breitgefächerten knockdown vakuolärer  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHX1-4) in Zellen von *Eschscholzia californica* zu bewirken. Zu diesem Zweck wurde eine Zielsequenz in einen RNAi-vermittelnden Vektor (destination-Vektor) kloniert, der die Zielsequenz als haarnadelförmige RNA (hpRNA) exprimiert und damit die Bildung von siRNA verursacht. siRNA bewirkt den Abbau komplementärer mRNA-Sequenzen und bildet den Grundstein für das nachfolgende „Verstummen“ des Zielgens.

### 2.8.22.1 Destination-Vektor

Als destination-Vektor wurde der pK7GWIWG2(II)-Vektor mit dem konstitutiven p35S Promotor und einem T35S Terminator verwendet. Er besitzt Kopf an Kopf gerichtete attR-sites, die ein toxisches ccdB-Gen flankieren, welches durch Expression das bakterielle Wachstum hemmt und der sicheren Selektion dient. Die sense/antisense-Orientierung der attR-Kassetten und ihre Trennung durch ein Intron führt zur Expression haarnadelförmiger RNA (hpRNA), dem Ausgangspunkt des gene silencing (Vektorkarte siehe Anhang 7.6.1).

### 2.8.22.2 RNAi-vermittelnde Zielsequenzen

Für das gene silencing wurden zwei Zielsequenzen unterschiedlicher Lage im Zielgen und unterschiedlicher Gesamtlänge verwendet (siehe Kap.3.4.1). Die Zielsequenz-tragenden DNA-Fragmente wurden mittels PCR (siehe Kap.2.8.5) auf Grundlage von cDNA generiert (s.u.).

	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	<b>Länge</b>
Zielsequenz Nr.1	3*	4*	290 bp
Zielsequenz Nr.2	5*	6*	356 bp

(\*) siehe Anhang 7.3.1

### 2.8.22.3 RNAi-vermittelnde Expressionsvektoren

Ausgangspunkt für die Klonierung eines funktionsfähigen RNAi-vermittelnden Expressionsvektors sind Kopf an Kopf gerichtete und attR-flankierte Kassetten des destination-Vektors (s.o.) und eine attL-flankierte Zielsequenz in einem sogenannten entry-Vektor. Für die Generierung des entry-Vektors wurden die Zielsequenzen (s.o.) zunächst in den pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert, dessen Spectinomycin-Resistenzgen durch einen XhoI/XbaI-Verdau entfernt (siehe 2.8.15) und damit der Vektor linearisiert (siehe 2.8.13.3). Über die Gateway-Klonierung wurde ein Austausch zwischen den attR/L-flankierten DNA-Fragmenten vorgenommen (siehe 2.8.14).

Nach diesem Prinzip wurden zwei RNAi-vermittelnde Expressionsvektoren, mit den Zielsequenzen Nr.1 und Nr.2 (s.o.) kloniert. Dem als Leervektor-Kontrolle dienenden destination-Vektor wurden die attL-flankierten ccdB-Gene durch einen BsrGI-Verdau entfernt und der linearisierte Vektor ligiert (siehe 2.8.16).

Die zwei RNAi-vermittelnden Expressionsvektoren und der Leervektor wurden für die biolistische Transformation von Kalluszellen von *Eschscholzia californica* eingebracht (siehe 2.8.19.3).

### **2.8.23 Heterologe Genexpression in Hefe**

Die heterologe Genexpression ermöglicht einen isolierten Blick auf die Funktion eines Proteins ausserhalb seines arteigenen Gefüges. Hefe eignet sich dabei besonders gut als Modelorganismus, da sie wie Tiere und Pflanzen, ebenfalls ein eukaryotischer Organismus ist, der sich in Struktur und Funktionsweise wesentlich komplexer aufbaut als prokaryotische Zellen und trotzdem ein hohes Reproduktionsvermögen besitzt. Zudem ist der Besitz einer Vakuole für die Betrachtung der Funktionsweise der vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter (EcNHX1-4) eine wesentliche Voraussetzung.

#### **2.8.23.1 Hefestämme**

Für die folgenden Untersuchungen wurde der Hefestamm By4741 und ein ihm zugehöriger Deletionshefestamm 4290 ( $\Delta\text{nhx}$ ) aus der Euroscarf-Sammlung verwendet (siehe 2.6). Die Glycerin-Kulturen beider Stämme wurden von der AG Breunig, MLU-Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Nähere Informationen unter <http://www.yeastgenome.org/>.

#### **2.8.23.2 Klonierung der EcNHX1-4 ORF's**

Die für EcNHX1 codierende Sequenz wurde mittels In-Fusion<sup>®</sup>HD-Klonierung in einen pBlueScript II-Vektor kloniert und gleichzeitig eine XbaI (5') und eine EcoRI (3')-Schnittstelle angefügt (siehe 2.8.13.4).

Die EcNHX2-4 ORFs wurden mittels PCR exakt vom Methionin-kodierenden Codon bis zum Stop-Codon amplifiziert (Details siehe Anhang 7.5.3).

In einer zweiten PCR wurde über Primer eine XbaI (5')- und eine XhoI (3')-Schnittstelle angefügt. Als template diente das Produkt der ersten PCR (s.o.) in einer 1:10 Verdünnung (Details siehe Anhang 7.5.3). Das PCR-Produkt wurde in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert (siehe Kap.2.8.13.2).

### 2.8.23.3 Klonierung der Expressionsvektoren

#### Expressionsvektor p416GAL1

Die Expression des p416GAL1-Vektors nach Mumberg et al., 1994 wird über einen GAL1-Promoter gesteuert. Der Vektor trägt mit URA3 eine der Selektion dienliche Nukleinbasen-Prototrophie für Uracil und verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin. Der p416GAL1-Vektor ist die low-copy-Variante zum high-copy p426GAL1-Vektor (siehe Kap.2.6, Vektorkarte siehe Anhang 2.6.2).

#### Induktion des GAL1-Promotors

Für die Induktion des GAL1-Promotors wurden die Hefezellen aus Hauptkulturen (siehe Kap.2.4.3) 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in Galaktose-haltigem Minimalmedium resuspendiert und 4 h bei 30 °C und 120 rpm geschüttelt. Zusammensetzung der Nährmedien Anhang 7.2)

#### Restriktionsverdau

Für die Klonierung des EcNHX1-Expressionsvektors wurden 3 µg pBlueScript II-Vektor (s.o.) und p416GAL1-Expressionsvektor (s.o.) mit EcoRI und XbaI verdaut (siehe 2.8.15).

Für die Konierung der EcNHX2-4-Expressionsvektoren wurden 5 µg pJET1.2/blunt-Vektor (s.o.) und p416GAL1-Expressionsvektor (s.o.) mit XhoI und XbaI verdaut (siehe 2.8.15). Die Produkte wurden über Gelelektrophorese (siehe 2.8.9) und Gelextraktion (siehe 2.8.10) gereingt.

#### Ligation

Die Produkte aus dem Restriktionsverdau wurden in einem Mengenerhältnis von 1:3-4 (EcNHX1-4 Fragmente/Expressionsvektor) und maximal 500 ng Gesamt-DNA im Ansatz ligiert (siehe 2.8.16). Der Ansatz wurde in *E.coli* transformiert (siehe 2.8.19.1), die plasmid-tragenden Klone selektiert (siehe 2.8.20.1) und die Plasmide isoliert (siehe 2.8.21.2).

### 2.8.23.4 Hefe-Transformanten

Für die Gewinnung von rekombinanten Hefestämmen wurden Zellen der  $\Delta$ nhx1-Nullmutante (4290) mit den Expressionsvektor-Plasmiden (s.o.) transformiert (siehe 2.8.19.2). Als Kontrolle dienten die mit leerem p416GAL1-Vektor transformierten Stämme des Wildtyps (By4741) und der  $\Delta$ nhx1-Nullmutante (4290). Die Liste der Transformanten lautet wie folgt:

Stamm- Bezeichnung	Stamm	Vektor/Insert	Beschreibung
By	By4741	p416GAL1/leer	Leervektor-Kontrolle
$\Delta$ nhx	4290	p416GAL1/leer	Leervektor-Kontrolle
rH1	4290	p416GAL1/ <i>Ec</i> NHX1	Expression des <i>Ec</i> NHX1-Gens
rH2	4290	p416GAL1/ <i>Ec</i> NHX2	Expression des <i>Ec</i> NHX2-Gens
rH3	4290	p416GAL1/ <i>Ec</i> NHX3	Expression des <i>Ec</i> NHX3-Gens
rH4	4290	p416GAL1/ <i>Ec</i> NHX4	Expression des <i>Ec</i> NHX4-Gens

Tabelle 2: Liste der rekombinanten Hefestämme zur Expression von NHX-Proteinen aus *Eschscholzia californica*

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Extraktion von Membranprotein aus Hefezellen

In 100 ml Hauptkulturen (siehe Kap.2.7.2) wurden die Expression des GAL1-Promotors induziert (siehe 2.8.23.3) und die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm über 5 min abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 400  $\mu$ l B60-Puffer resuspendiert und zum Aufbrechen der Zellwände mit 300  $\mu$ l Glasschrot 3x 4 min bei 4-8 °C gevortext. Die unlöslichen Bestandteile wurden 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der klare Überstand in 2 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt und austarriert. Die Ansätze wurden 1 h bei 4 °C und 100.000 g ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig abgenommen und das Membranpellet über Nacht in 100  $\mu$ l CHS-Puffer bei 1000 rpm bei 4-8 °C solubilisiert. Die solubilisierten Proteine wurden erneut 40 min bei 100.000 g ultrazentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -70 °C eingefroren. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang 7.4.2 aufgeführt.

### 2.9.2 Extraktion von Tonoplastenprotein aus pflanzlicher Zellkultur

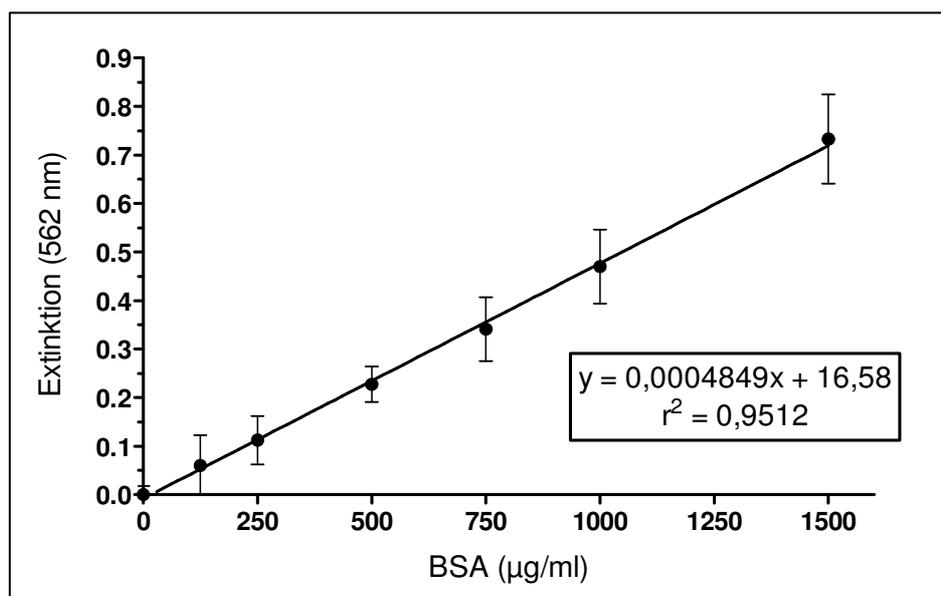
2x20 g Zellmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff und Seesand gemörsert. Das Zellpulver wurde jeweils in 15-20 ml Homogenisierungsmedium aufgenommen und 1 min mit dem Ultraturax homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und jeweils 25 ml in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und austarriert. Die Ansätze wurden 40 min bei 39.000 rpm zentrifugiert und die Pellets nach Suspendieren in 5 ml Sucrose/Tris-Puffer vereint. Die Proteinsuspension wurde auf Eis vorsichtig mit 10 ml Sorbitol/Tris-Puffer überschichtet. Das Zweiphasen-System wurde 40 min bei 39.000 rpm zentrifugiert und auf Eis gestellt. Der durch Zentrifugation entstandenen mittleren Phase (Tonoplastenproteine)

wurden 2 ml entnommen und in ein 2 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Tonoplastenproteine wurden bei 60.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl Sorbitol/Tris-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang 7.4.3 aufgeführt.

### 2.9.3 Proteinbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Membranproteinen wurde der „Pierce® BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible“ verwendet. Das Prinzip beruht auf der Biuret-Reaktion, einer Reaktion bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit Proteinen in alkalischer Lösung zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden. Die Detektion der  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen erfolgt durch die Bildung eines spezifischen Farbkomplexes mit Bicinchoninsäure (BCA) und der quantitativen Bestimmung seiner Absorption bei 562 nm. Durch den Einsatz einer Compatibility Reagent ist der Pierce® BCA Protein Assay Kit sowohl mit Disulfid-reduzierenden Agentien wie DTT, als auch mit einem Großteil ionischer und nicht-ionischer Detergentien wie CHAPS kompatibel und daher besonders für die Bestimmung von Membranproteinen geeignet.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Verdünnung der Hefe-Proteinextrakte wurde der CHS-Puffer verwendet (s.o.). Die Verdünnung der Pflanzen-Proteinextrakte erfolgte mit Sorbitol/Tris-Puffer (s.o.). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergeraden, welche auf Empfehlung des Herstellers mit Standard-Serumalbumin (BSA) ermittelt wurde. In Abb.15 ist die Kalibriergerade zur Bestimmung der Hefe-Proteinextrakte dargestellt.



**Abbildung 15: Kalibrierung der spektrometrischen Bestimmung von Protein-Konzentrationen mit bovinem Serumalbumin (BSA)**

Die Umrechnung von Absorptionen in Proteinkonzentrationen erfolgte mit der eingerahmten Formel.

### 2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinextrakte mit SDS- und Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer (s.u.) 10 min bei 70 °C denaturiert. Die durch SDS-Anlagerung negativ geladenen Proteinstränge wurden entsprechend ihres Molekulargewichts über die Netzstruktur eines Polyacrylamid-Gels im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei erfolgte die Auftrennung diskontinuierlich nach Laemmli d.h. unter Verwendung eines Polyacrylamid-Gels bei dem ein großporiges Sammelgel (s.u.) über ein kleinporiges, basisches Trenngel (s.u.) geschichtet wurde. Das Sammelgel bewirkte die Ankonzentrierung der Proteine in einer Lauffront und sorgt für die Detektion scharfer Banden nach Auftrennung im 12 % igen Trenngel. Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean® Tetra Cell-System von BioRad mit Laufpuffer aufgefüllt, die vorbereiteten Gele mit 20 µl je Probe und 5 µl Proteinmarker beladen und über 40 min eine Spannung von 180 V angelegt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und der Details zum Marker sind im Anhang 7.4.4 aufgeführt.

### 2.9.5 Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (s.o.) wurden mit Hilfe des Tankblot-System Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) auf eine Nitrocellulose-Trägermatrix übertragen. Dafür wurde die Nitrocellulosemembran, das Polyacrylamid-Gel (s.o.), die Whatman-Paper und die Schaumgummimatten 30 min in Transferpuffer (4°C) vorinkubiert. Das Transfermodul wurde nach Angaben des Herstellers unterhalb des Pufferspielgels luftblasenfrei zusammengebaut und samt Kühlakku in der Laufkammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Proteine wurden über 40 min durch Anlegen eines Spannungsfeldes (100 V) horizontal auf die Nitrocellulosemembran geblottet.

<u>Transfer-Puffer:</u>	Tris	0,25 M
	Glycin	2,5 M
	Methanol	20 % (V/V)

### 2.9.6 Ponceau-Färbung

Zum Nachweis eines erfolgreichen Proteintransfers und gleicher Lademengen wurde der Blot (s.o.) mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S durch Schwenken in Ponceau S-Lösung (s.u.) angefärbt und solange mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Danach wurde der Farbstoff mit TBST-Puffer (s.u.) wieder vollständig entfernt.

<u>Ponceau S-Lösung:</u>	Ponceau S	0,2 % (m/V)
	Trichloressigsäure	30 % (V/V)

### 2.9.7 Immuno-Detektion

Der immunologische Nachweis der NHX-Proteine basierte auf ihrer Erkennung durch einen spezifischen Primärantikörper (siehe Kap.2.5.8.1) und dessen Detektion durch einen HRP\*-markierten sekundären Antikörper (siehe Kap.2.5.8.1). Dafür wurde der Blot zunächst mit Milchpulver-Lösung (5 % in TBST-Puffer) über 1 h geblockt und über Nacht in der Primärantikörper-Lösung bei 4-8 °C geschwenkt. Der Blot wurde 3x 5 min mit TBST-Puffer gewaschen, 1 h mit der Sekundärantikörper-Lösung bei 4-8 °C geschwenkt und abschließend 3x10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der HRP\*-markierten Antikörper erfolgte durch das ECL<sup>®</sup> Western Blotting Detection-Reagenz (Amersham). Dabei wurde unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol durch HRP\* katalysiert und die emittierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Films (Hyperfilm<sup>®</sup> ECL, Amersham) von 10-30 sec in einer Dunkelkammer aufgefangen. Der Film wurde durch das Entwickler/Fixierer-System von Kodak entwickelt. Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind im Anhang 7.4.5 aufgeführt.

### 2.9.8 Antikörper

#### Primärer Antikörper

Bezeichnung:	anti-AtNHX1-Antiserum (AS09484)
Hersteller:	Agrisera <sup>®</sup> Antibodies
Antigen:	KLH*-konjugiertes, synthetisch hergestelltes Q68KI4-Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , 538 AS
Molekulargewicht:	59,5 <sup>1</sup>   45 <sup>2</sup> kDa
Format:	polyklonales Antiserum
Wirtsorganismus:	Hase
Kreuzreaktiv mit:	bestätigt: <i>Kandelia obovata</i> vermutet: <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Ricinus communis</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Oryza</i> <i>sativa</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Populus euphratica</i>
Nicht kreuzreaktiv mit:	<i>Avicenna marina</i> (Mangrove)

Sekundärer Antikörper

Bezeichnung:	HRP*-konjugierter, boviner anti-rabbit IgG-Antikörper, (sc-2370)
Hersteller:	Santa Cruz <sup>®</sup> Biotechnology
Antigen:	rabbit IgG
Format:	via Affinitätschromatographie aufgereinigte IgG-Antikörper
Wirtsorganismus:	Rind

---

KLH\* =keyhole limpet hemocyanin (Schlitzschnecken-Hämocyanin); HRP\* = siehe oben; <sup>1</sup> = berechnetes Molekulargewicht; <sup>2</sup> = experimentell bestimmtes Molekulargewicht

**2.9.9 Alkaloid-Messung****Elicitierung**

Zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese wurde 5-7 Tage alte Zellkultur mit Gaze abfiltriert und mit LS-Medium auf eine Zelldichte von 100 mg/ml eingestellt. Die Kultur wurde mit 1 µg/ml Hefe-Elicitor versetzt und unter Kultivierungsbedingungen (siehe Kap.2.7.1) geschüttelt. Alle 24 h wurden Proben entnommen. Als Blindwert wurde eine gleichbehandelte aber elicitorfreie Kultur parallel mitgeführt. Der verwendete Hefe-Elicitor ist eine Glykoproteinfraktion, die aus Bäckerhefe durch pH- und Ethanol-fällung gewonnen (Schumacher et al., 1987) und durch Ultrafiltration, FPLC und SDS-PAGE gereinigt wurde (Roos et al. 1998, Heinze et al. 2007). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das rohe Präparat vor der FPLC-Stufe.

**Alkaloid-Extraktion**

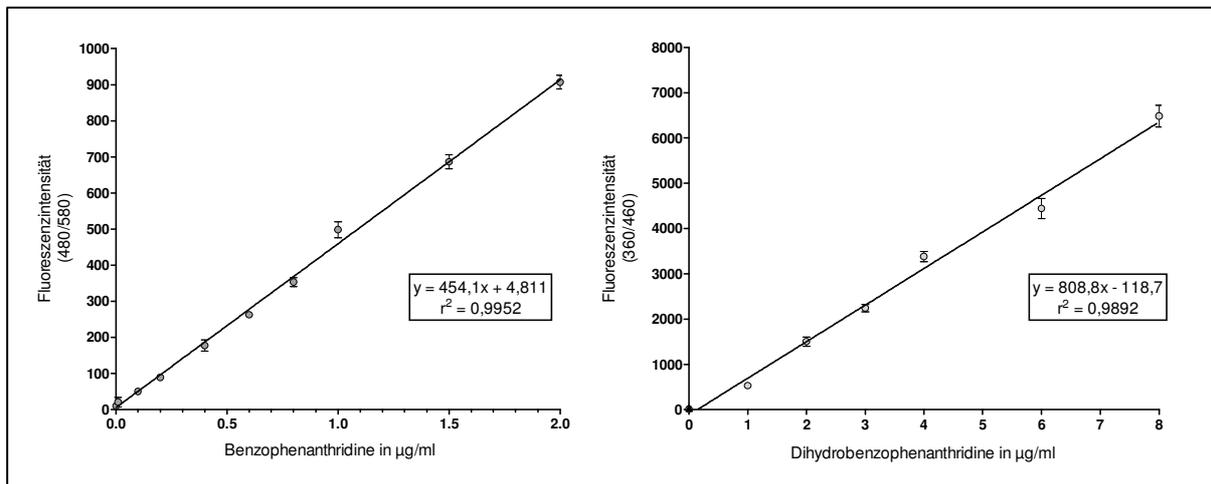
Den elicitierten Zellkulturen (s.o.) wurde eine Probe von 500 µl entnommen und 1:1 mit Methanol/HCl (36 mM) versetzt. Die Alkaloide wurden über 20 min bei 40 °C extrahiert und die Zellen durch eine Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm abgetrennt.

**Fluorimetrische Alkaloid-Bestimmung**

Der klare Überstand (s.o) wurde zu 100 µl Aliquots in eine Quarz-Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität der Benzophenanthridin-Alkaloide bei: Ex 490/ ± 20 nm, Em 570/ ± 20 nm und der Dihydrobenzophenanthridin-Alkaloide bei: Ex 360/ ± 20 nm, Em 460/ ± 20 nm, gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit dem Microplate Fluorescence Reader<sup>®</sup> FLX800. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe einer Kalibriergeraden in Alkaloid-Konzentrationen umgerechnet (s.u.).

## Kalibrierung

Für die Kalibrierung der Benzophenanthridine erfolgte mit Sanguinarin (MG 332 g/mol). Die Kalibrierung der Dihydrobenzophenanthridine erfolgte mit Dihydrosanguinarin (MG 333 g/mol), das durch Reduktion von Sanguinarin durch Natriumborhydrid gewonnen wurde. Die Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzintensität und Alkaloid-Konzentration ist in Abb.16 dargestellt.



**Abbildung 16: Kalibriergeraden zur fluorimetrischen Bestimmung von Benzophenanthridin- und Dihydrobenzophenanthridin-Alkaloiden**

**links:** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei Ex480/Em580 von der Sanguinarinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ).

**rechts:** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei Ex360/Em460 von der Dihydrosanguinarinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ). Die zur Umrechnung gemessener Fluoreszenzintensitäten in Alkaloid-Konzentrationen verwendeten Kalibriergleichungen sind im jeweiligen Diagramm eingerahmt.

## 2.10 Methodenentwicklung

### 2.10.1 Messung des vakuolären pH durch Fluoreszenzspektroskopie

Die Aktivität der NHX-Transporter kann als vakuolärer Protonen-Efflux in Abhängigkeit von  $\text{Na}^+$  gemessen werden. Experimentell wurde dieser Vorgang als Veränderung des vakuolären pH-Wertes in Zellen mit permeabler Plasmamembran quantifiziert. Messungen dieser Art wurden bisher an einzelnen Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt und konnten erstmals den Amilorid-sensitiven und  $\text{Na}^+$ -abhängigen Anstieg des vakuolären pH und dessen Stimulation durch LPC demonstrieren (Viehweger et al., 2002; 2006). Die fluoreszenzmikroskopische Messung von Einzelzellen kann jedoch kaum einen repräsentativen Vergleich zwischen einer Vielzahl von Zellsuspensionen liefern. Eine statistisch auswertbare Quantifizierung der Aktivität der vakuolären NHX-Transporter durch die Erfassung mittlerer Fluoreszenzintensitäten von Zellsuspensionen war deshalb eine wesentliche Voraussetzung dieser Arbeit.

Die Messung in Zellsuspensionen stellt hohe Anforderungen an die Robustheit des Messverfahrens. Denn es muss berücksichtigt werden, dass das zu erfassende und zu quantifizierende Ereignis nicht eine chemische Reaktion, sondern eine Bewegung von Protonen durch den Tonoplasten darstellt. Deshalb kommt der Kompartimentierung des pH-Indikators und der Intaktheit der Vakuole besondere Bedeutung zu.

Für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren zur Messung des mittleren vakuolären pH-Wertes von Zellsuspensionen mussten folgende **Voraussetzungen** erfüllt bzw. modifiziert werden:

1. ein pH-abhängiger Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Akkumulationsrate in der Vakuole.
2. ein Verfahren zur einfachen und schnellen Fluoreszenzmessung in suspendierten Zellen unter Vermeidung von Stressreaktionen.
3. eine wenig aufwändige Methode zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von Zellsuspensionen.

Diese Voraussetzungen werden durch die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Bedingungen gewährleistet.

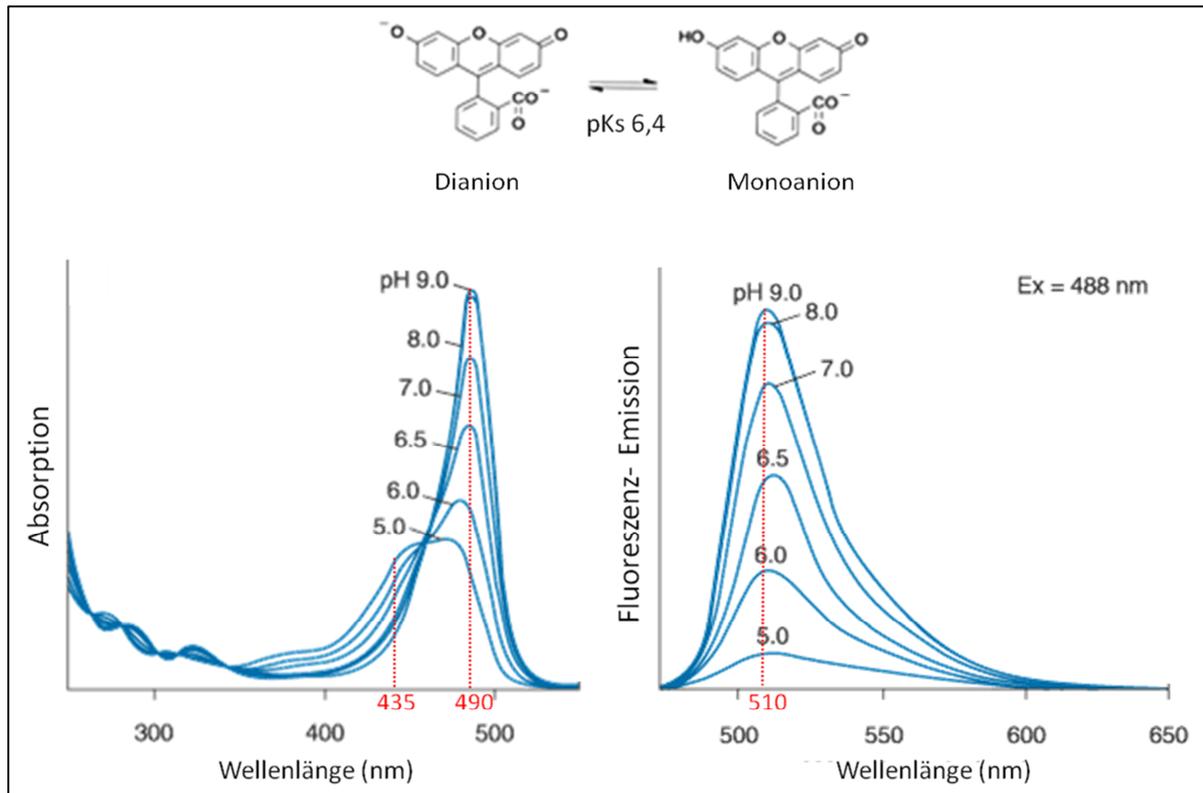
Ein wesentliches Argument für die Nutzbarkeit des Verfahrens liegt darin, dass die für die Zellsuspension von *Eschscholzia californica* optimierten Parameter auch auf Hefezellen übertragen werden konnten (siehe 2.10.4).

### 2.10.1.1 5-Carboxyfluoreszein (5-CF)

Die Verbindung wird den Zellen aufgrund des besseren Penetrationsvermögens als 5-Carboxyfluoreszeindiacetat-Acetoxymethylester (CFDA-AM) zugesetzt und erreicht rasch das Zytoplasma, wo der Acetoxymethylester enzymatisch gespalten wird. Das entstehende 5'-Carboxyfluoreszeindiacetat penetriert in die Vakuole, wo dort lokalisierte Esterasen das 5-CF freisetzen. Dieses Molekül liegt im sauren Milieu der Vakuole als nicht membrangängiges Carboxyl-Anion vor und wird deshalb akkumuliert (Roos, 2000).

5-Carboxyfluoreszein zeigt eine deutliche pH-Abhängigkeit seiner Fluoreszenzeigenschaften, die auf dem Protonierungsgleichgewicht zwischen Monoanion (Ex 435 nm) und Dianion (Ex 490 nm) mit einem  $pK_s = 6,4$  beruhen (Abb.17). Das Konzentrationsverhältnis beider Moleküle-Spezies spiegelt damit den lokalen pH-Wert im Bereich von 5-8 wider. Dieses Verhältnis kann durch Messung der Emission bei 510 nm nach vorhergehender Anregung bei 435 nm und 490 nm ermittelt werden. Das als excitation ratioing (siehe 2.10.2.2) bezeichnete

Verfahren wurden bereits mit verschiedenen Indikatoren erfolgreich in pflanzlichen als auch tierischen Zellen angewandt (Roos, 2000) .



**Abb.17: pH-Abhängigkeit des Exzitations- und Emissionsspektrums von Fluoreszein (siehe Diagramme unten) unter Berücksichtigung seiner fluoreszenzaktiven Dissoziationszustände des Mono- und Dianions (siehe Strukturformeln oben)**

**Links:** Das Exzitationsmaximum des Monoanions bei ca. 435 nm und des Dianions bei ca. 490 nm sind rot im Exzitationspektrum gekennzeichnet.

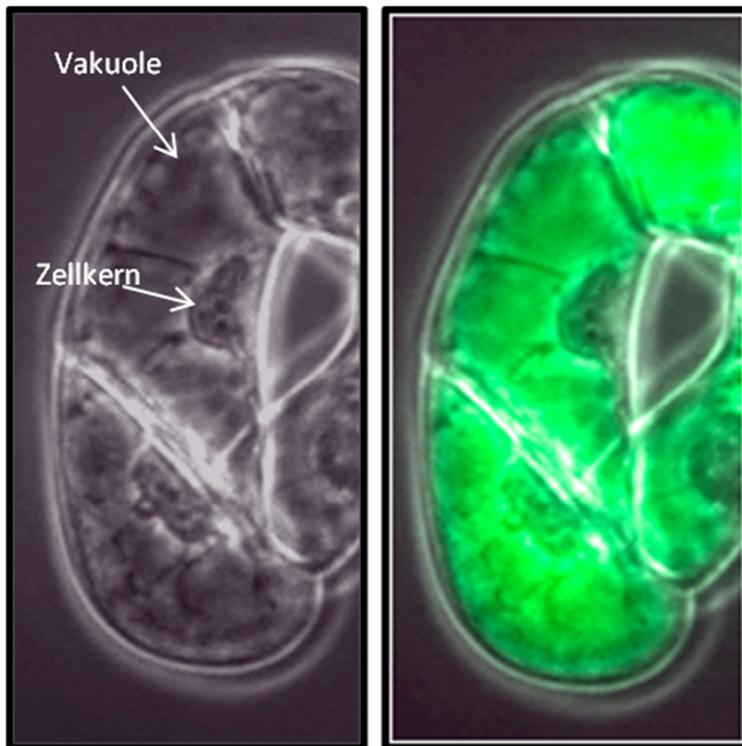
**Rechts:** Das Emissionsmaximum von 510 nm gilt für beide Ionen und ist rot im Emissionsspektrum gekennzeichnet (aus <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/ph-indicators/probes-useful-at-near-neutral-ph.html>, Stand 2014)

## 2.10.2 Verfahren der fluorimetrischen pH-Messung

### 2.10.2.1 Beladen der Zellen mit 5-Carboxyfluoreszein

Zellen einer 7-9 Tage alten Suspensionskultur wurden mit Nylongaze (Porendurchmesser 50  $\mu\text{m}$ ) abgelfilert und durch resuspendieren in 75 % iger phosphatfreier LS-Nährlösung eine Zelldichte von 50 mg Frischmasse/ml eingestellt. Die Zellen wurden mit 100 nM CFDA-AM und 100  $\mu\text{M}$  Eserin versetzt und bei 100 rpm 30-60 min geschüttelt, bis 90 % der intrazellulären Fluoreszenz in der Vakuole konzentriert war. Die zelluläre Verteilung der Fluoreszenz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft (Abb.18). Eserin verhindert als nicht permeabler Esterase-Hemmstoff die Spaltung von CFDA-AM außerhalb der Zelle. Anschließend wurden die Zellen erneut abgelfilert und in LS-Nährmedium resuspendiert. Sie

wurden entweder direkt oder nach Permeabilisierung ihrer Plasmamembran zur fluorimetrischen Messung eingesetzt.



**Abbildung 18:**  
**Nachweis der Farbstoffakkumulation von 5-Carboxyfluoreszein (5-CF) in Vakuolen von *Eschscholzia californica***

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene Zellen (siehe Kap.2.10.2.1) wurden unter folgenden Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop untersucht: Kanal 1: Durchlicht, Kanal 2: Ex 470- 490 nm, Em 525 ± 50 nm.

**Links:** Zelle im Durchlicht (Kanal 1) mit dem Verweis auf Lage des Zellkerns und der Vakuole.

**Rechts:** Überlagerung des Durchlichtbildes (Kanal 1) mit der grünen Fluoreszenz von 5-CF (Kanal 2).

### 2.10.2.2 Ratiometrische Messung des pH-shift (excitation ratioing)

Die mit dem pH-Indikator beladenen Zellsuspensionen wurden zu 100 µl-Aliquots in eine 96er Quarz-Mikrotiterplatte mit lichtdicht voneinander getrennten Kompartimenten pipettiert. Nach Zusatz der im jeweiligen Experiment genannten Effektoren (siehe 2.10.2.4), erfolgte die Fluoreszenzmessung am Microplate Fluorescence Reader® FLX800 alternierend in zwei Kanälen, bei einer Sensitivität von 50 und von der Bodenseite aus. Die Zellen wurden vor jedem Messdurchgang 3 sec aufgeschüttelt.

**Kanal 1 (Monoanion):** Ex 435 ± 20 nm, Em 520 ± 20 nm

**Kanal 2 (Dianion):** Ex 485 ± 20 nm, Em 520 ± 20 nm

Die Zeitabstände zwischen den Messungen variierten je nach Probenanzahl und Versuchsaufbau zwischen 0,75-2,5 min. Die Messdauer betrug 2-30 min. Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der Quotienten aus Kanal 2/Kanal 1 gebildet.

### 2.10.2.3 Kalibrierung

20 ml einer Zellsuspension wurden mit Farbstoff beladen siehe (Kap.2.10.2.1), permeabilisiert (siehe Kap.2.10.2.4) und in 2 ml Portionen zu 100 mg Frischmasse/ml in

Kalibriermedium mit definierten pH-Wert eingebracht. Die Äquilibration zwischen dem pH des Mediums und dem der Vakuole erfolgte durch die membranpermeablen Protonenträger Methylamin und Pivalinsäure. Methylamin wurde 80 mM (für pH-Bereiche von 5-7,5) und Pivalinsäure 5 mM (für pH-Bereiche von 4-5,5) in 40 mM MES-Puffer eingesetzt und die pH-Werte mit Hilfe einer Glaselektrode in 0,5 pH-Einheiten eingestellt. Die Messung erfolgte nach den oben genannten Bedingungen (siehe Kap.2.10.2.2). Das Ergebnis der *in situ* Kalibrierung zeigt eine sigmoidale Abhängigkeit des Fluoreszenzquotienten vom pH-Wert. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen des Wildtyps und transgener Zellstämme der Gruppe 1 und 2 festgestellt werden. Die Messwerte wurden gemittelt und sind in Abb.19 dargestellt.

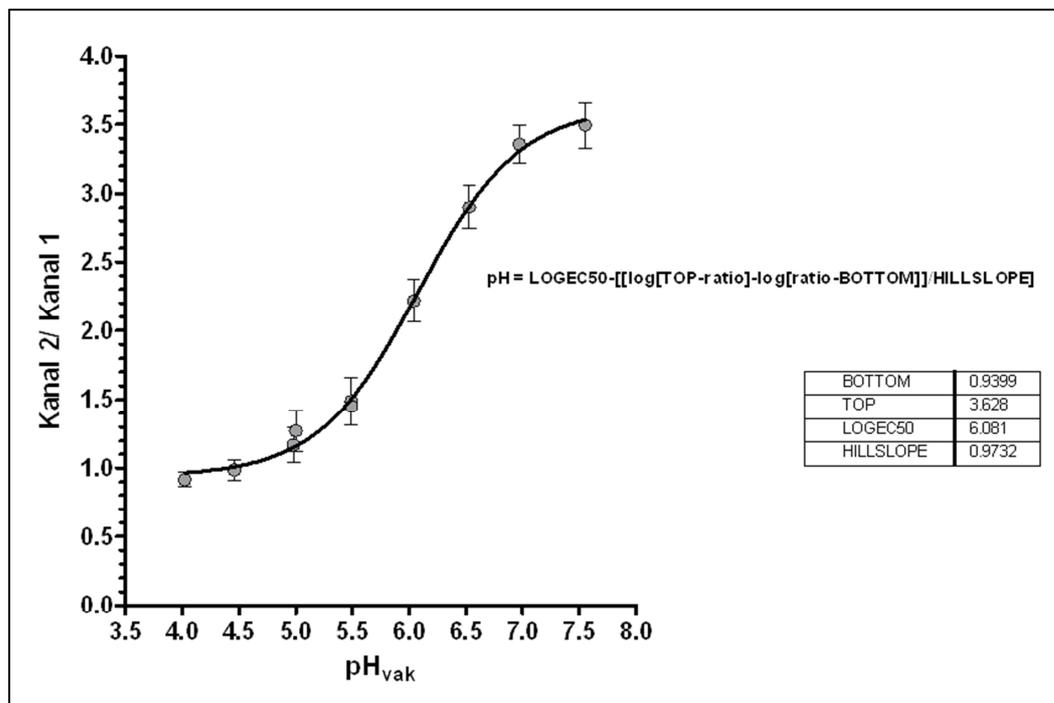


Abbildung 19: Kalibrierkurve für 5-Carboxyfluoreszein in permeablen Zellen von *Eschscholzia californica*

Die Äquilibration des zellulären pH-Wertes im Bereich von pH 4,0-5,5 erfolgte mit Pivalinsäure und im Bereich von 5,0-7,5 mit Methylamin (siehe 2.6.2.3), die Umrechnung von Fluoreszenzquotienten in pH-Werte erfolgte mit Hilfe der aufgeführten Formel unter Anwendung der ermittelten Werte für die in der Tabelle aufgeführten Parameter. Messpunkte sind Mittelwerte aus 32 gleichberechtigten Messungen ( $n=32$ ,  $\pm$  SD).

#### 2.10.2.4 Effektoren und wirksame Konzentrationen

Der Effekt des Lösungsmittels wurde als Blindwert ermittelt und von allen Messwerten abgezogen. Die wichtigsten Effektoren, ihre jeweiligen Lösungsmittel und wirksamen Konzentrationen sind im Folgenden aufgelistet:

Effektoren/Lösungsmittel	Wirksame Konzentrationen
MgCl <sub>2</sub> /ddH <sub>2</sub> O	[MG 203,3] 5 mM
K <sub>2</sub> ATP/ddH <sub>2</sub> O	[MG 583,2] 5 mM
LPC 16:0/CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1)	[MG 495,6] 1 μM
EIPA/DMSO	[MG 299,8] 400 μM
Bafilomycin/DMSO	[MG 622,8] 1 μM
Eserin/Ethanol 96%	[MG 275,3] 100 μM

### 2.10.2.5 Berechnung der pH-shifts

Die in regelmäßigen Zeitabständen in zwei Kanälen (siehe Kap.2.10.2.2) gemessenen Fluoreszenzintensitäten (**F**) wurden in Quotienten (ratio) umgerechnet (s.u. **Punkt 1**). Mit Hilfe der Kalibriergleichung (siehe Kap.2.10.2.3) wurden die Quotienten in pH-Werte umgewandelt (s.u. **Punkt 2**). Anschließend erfolgte die Umrechnung in Protonenkonzentrationen (**[H<sup>+</sup>]**) umgerechnet (s.u. **Punkt 3**). Nach Zugabe eines Effektors wurde der maximale Protonenefflux (**[H<sup>+</sup>]-Efflux**) als Protonendifferenz pro Zeit berechnet und auf die aktuell wirksame Triebkraft, als Protonendifferenz zwischen Vakuole und Zytosol bzw. Suspensionspuffer (pH 7,4) zu Beginn der Messung, bezogen (**[H<sup>+</sup>]-Gradient**) (s.u. **Punkt 4**). Die Berechnung erfolgte mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (Software) nach den im Folgenden aufgeführten Formeln:

1.  $\text{ratio} = F_{490 \text{ nm}} / F_{435 \text{ nm}}$
2.  $\text{pH} = \text{Hillslope} - [ \log[ \text{Top-ratio} ] - \log[ \text{ratio-Bottom} ] ] / \log \text{Ec}50$
3.  $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$
4.  $[\text{H}^+]\text{-Efflux}/[\text{H}^+]\text{-Gradient} = (([\text{H}^+]_{t1} - [\text{H}^+]_{t2}) / (t_1 - t_2)) / ([\text{H}^+]_{t1} - 10^{-7,4})$

### 2.10.3 Permeabilisierung der Plasmamembran zum Nachweis vakuolärer Protonenfluxe

Die selektive Permeabilisierung der Plasmamembran beruht auf der wesentlich geringeren Dehnbarkeit der Plasmamembran gegenüber dem Tonoplasten, welche durch eine unterschiedliche Zusammensetzung aus Phospholipiden und einem höheren Sterolgehalt des Tonoplasten zustande kommt. Die Kombination von einem milden osmotischen Schock und einem Temperatursprung führt in der Plasmamembran zur Bildung von Poren, die für kleine Moleküle bis 10 kDa passierbar sind, aber einen wesentlichen Verlust an zellulären Proteinen verhindern. Die Vakuole verbleibt derweil intakt in ihrer gewohnten makromolekularen Umgebung, während das umgebende Medium experimentell ausgetauscht werden kann (Viehweger et al., 2002; 2006).

**Durchführung:**

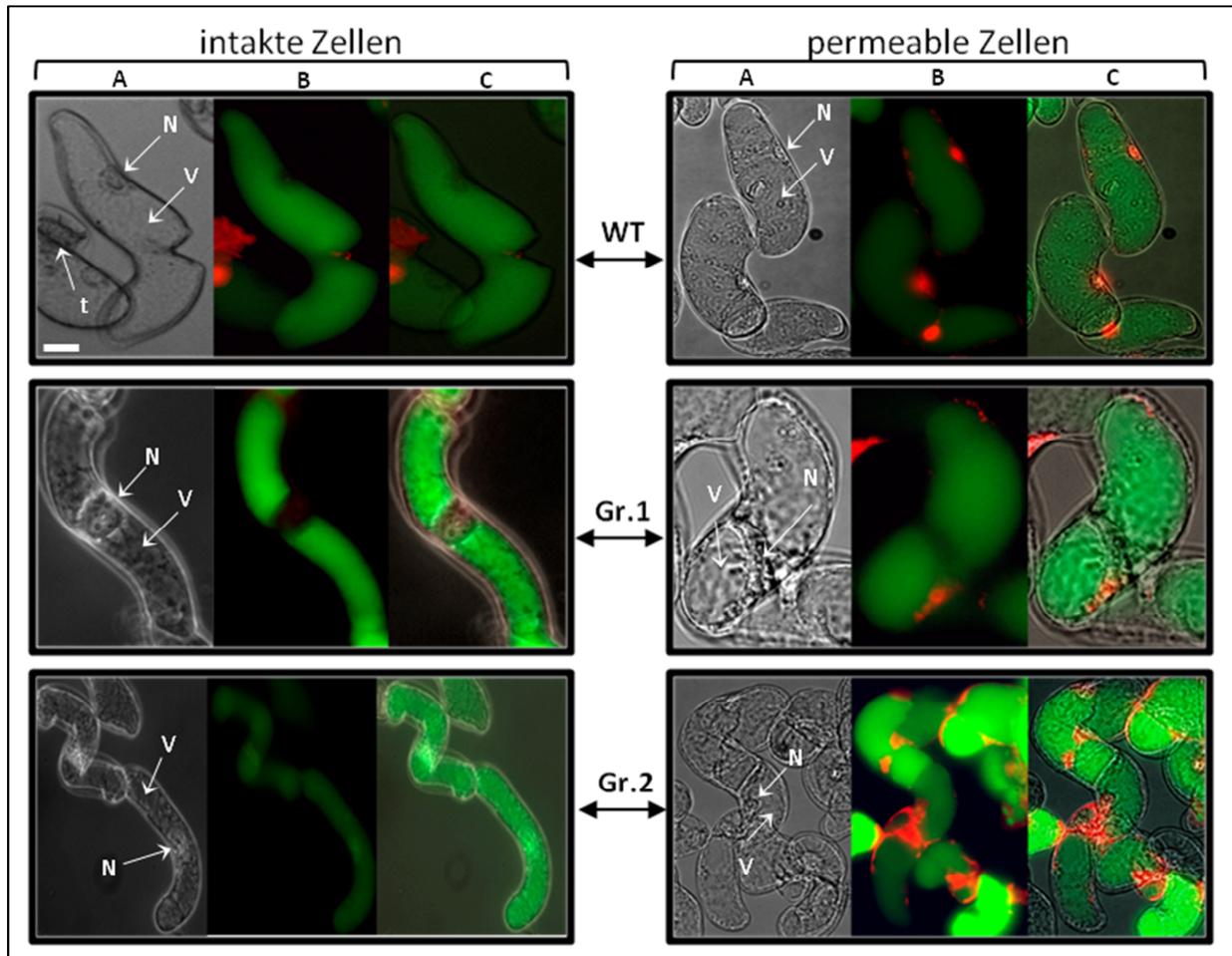
Eine mit dem pH-Indikator 5-Carboxyfluoreszein beladene Zellsuspension (siehe Kap.2.10.2.1) wurde mit Nylongaze (50 µm Maschen) gefiltert, zu 50 mg Frischmasse/ml in hypertonem Medium 1 resuspendiert und 15 min bei 13 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut abgefiltert, in isotonem Medium 2 aufgenommen und 15 min bei 13 °C inkubiert. Die nun permeablen Zellen wurden in Erhaltungsmedium resuspendiert und bis zum Zeitpunkt ihrer Vermessung bei 13 °C aufbewahrt. Dieses Medium enthielt einen Zytoplasma-ähnlichen Ionengehalt sowie Ascorbinsäure und Kaliumcyanid, um die mitochondriale Metabolisierung des Farbstoffs zu verhindern. Vor jeder Messung wurde den permeabilisierten Zellen 5 mM MgATP zugesetzt, um den Protonengradienten zwischen Vakuole und Außenmedium wieder herzustellen.

<u>Medium 1:</u>	Kaliumchlorid	300 mM
	Hepes	20 mM
	Gluthation	5 mM
		pH 7,4
<u>Medium 2:</u>	Kaliumchlorid	100 mM
	Hepes	20 mM
	Gluthation	5 mM
		pH 7,4
<u>Erhaltungsmiduum:</u>	Kaliumchlorid	100 mM
	MOPS/Btp	50 mM
	Gluthation	5 mM
	Natriumchlorid	5 mM
	Natriumcitrat	0,5 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,5 mM
	Ascorbinsäure	2 mM
	Kaliumcyanid	100 µM
	BSA	0,1 % (m/V)
	mit KOH	pH 7,4

**2.10.3.1 Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran**

Zum Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran für Mikromoleküle bei gleichzeitiger Intaktheit des Tonoplasten, wurde den Zellsuspensionen der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (75 mM) zugesetzt und dessen Verteilung neben dem bereits akkumulierten Farbstoff 5-Carboxyfluoreszein (100 nM), in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Das Propidiumjodid-Kation ist nicht permeabel für die intakte Plasmamembran, während es in Zellen mit permeabler Plasmamembran eindringt, in der DNA interkaliert und an Zytoskelettproteine bindet, so dass zytoplasmische und nukleare Bereiche permeabler Zellen rot fluoreszieren. Die Intaktheit der Vakuole wird dabei durch die fortwährende Akkumulation

des grün fluoreszierenden 5-Carboxyfluoreszeins demonstriert. Abb.20 zeigt typische Bilder permeabler und nicht permeabler Zellen.



**Abbildung 20: Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran von Zellen aus *Eschscholzia californica***

Zellen des Wildstammes und der transgenen Zellstämme der Gruppe 1 und 2 wurden mit 5-Carboxyfluoreszein beladen (siehe Kap.2.10.2.1) und ein Teil permeabilisiert (siehe Kap.2.10.3.1). Vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erfolgte der Zusatz von 75 nM Propidiumjodid. Es wurden sowohl für intakte als auch permeabilisierte Zellen aller Stämme Bilderreihen aus **A: Kanal 1, B: Kanal 2+3 und C: Kanal 1+2+3** erstellt.

Einstellungen: **Kanal 1:** Durchlicht, **Kanal 2** (rote Fluoreszenz von Propidiumjodid): Ex  $560 \pm 40$  nm, Em  $600 \pm 50$  nm, **Kanal 3** (grüne Fluoreszenz von 5-CF): Ex 470-490 nm, Em  $525 \pm 50$  nm, Nikon Optiphot Fluoreszenz-Mikroskop. Maßstab ca. 15  $\mu$ m.

**N:** Zellkernregion, **V:** Vakuole, **t:** tote Zelle, **WT:** Wildtyp, Gruppe 1 (**Gr.1**): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen, Gruppe 2 (**Gr.2**): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1).

#### 2.10.4 Die Messung des vakuolären pH-Wertes in Hefezellen

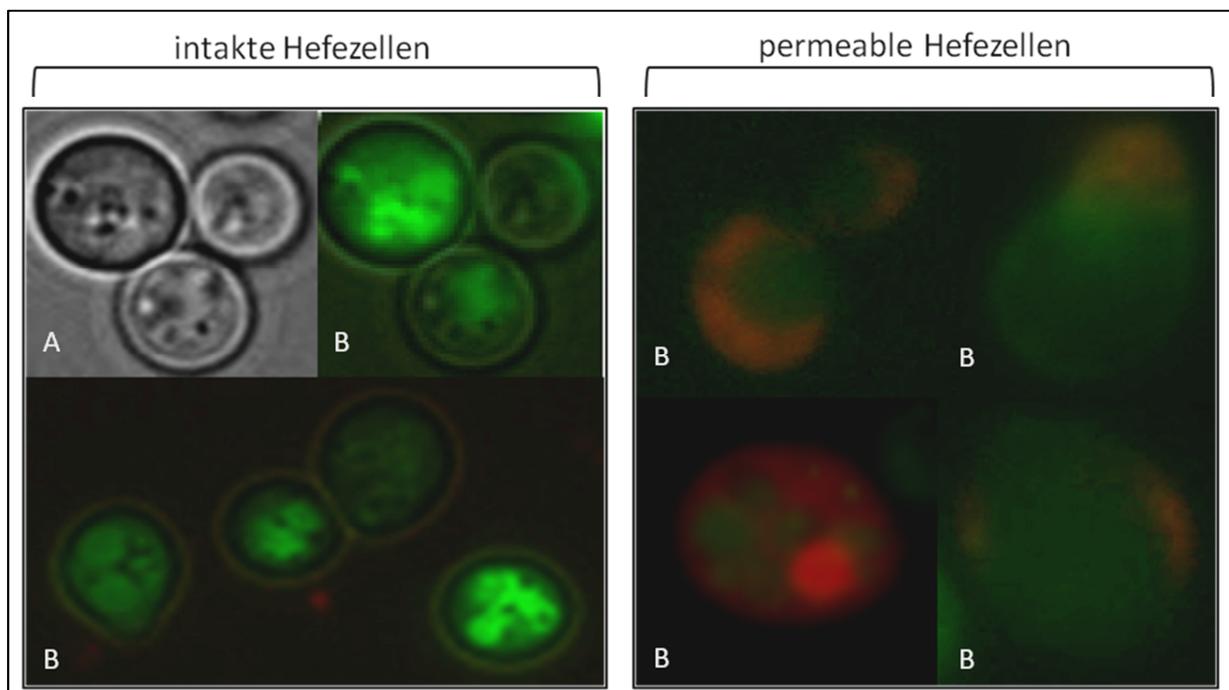
Die Messung des Protonenfluxes an Vakuolen von Hefezellen des Wildstammes (BY4741), seiner  $\Delta$ nhx1-Nullmutante (4290) und deren rekombinanten Stämme (siehe Kap.2.8.23.4) erfolgte prinzipiell nach der oben beschriebenen Methode für Pflanzenzellen. Folgende wesentliche Änderungen waren notwendig:

### Beladen der Hefezellen mit 5-Carboxyfluoreszein

Zellen einer Hauptkultur (siehe Kap.2.7.2) wurden 3 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellen wurden statt mit 100 nM wie in Pflanzen mit 400 nM CFDA-AM und 100 µM Eserin versetzt und 1 h horizontal geschüttelt. Die Zellen wurden 3 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert, gewaschen, mit ddH<sub>2</sub>O auf eine optische Dichte von 3,0 eingestellt und zu 1,2 ml aliquotiert.

### Permeabilisierung von Hefezellen

Die mit Farbstoff beladenen Hefezellen (s.o.) wurden 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, jeweils in 500 µl Medium 1a (2-8 °C) resuspendiert. Dabei wurde die Konzentration des Kaliumchlorids von 300 mM auf 400 mM für die Anwendung in Hefe erhöht. Die Zellen wurden 15 min bei 13 °C inkubiert und danach 3 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden auf Eis gestellt und in jeweils 500 µl isotonen Medium 2 (2-8 °C) resuspendiert. Die Ansätze wurden 15 min auf 13 °C temperiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in jeweils 1,2 ml Erhaltungsmedium aufgenommen. Die Fluoreszenzmessungen schlossen sich nahtlos an. In Abb.21 zeigen typische Bilder von permeablen und nicht permeablen Hefezellen.

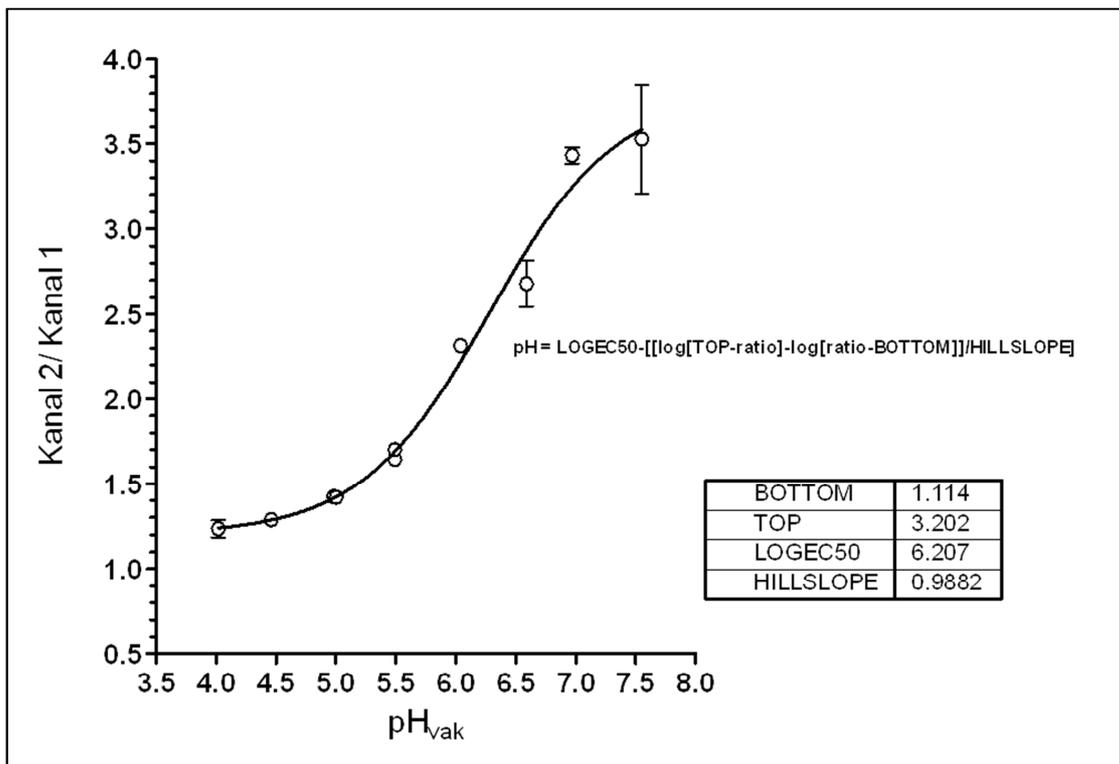


**Abbildung 21: Nachweis der Permeabilität der Plasmamembran von Hefezellen**

Hefezellen des Wildstammes (By4741) wurden mit 5-Carboxyfluoreszein (5-CF) beladen und ein Teil permeabilisiert (siehe Kap.2.10.4). Vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erfolgte der Zusatz von 75 nM Propidiumjodid. Von intakten und permeabilisierten Zellen wurden Bilder in drei Kanälen aufgenommen: **Kanal 1**: Durchlicht, **Kanal 2** (rote Fluoreszenz von Propidiumjodid): Ex 560 ± 40 nm, Em 600 ± 50 nm, **Kanal 3** (grüne Fluoreszenz von 5-CF): Ex 470-490 nm, Em 525 ± 50 nm. **A**: Aufnahme Kanal 1, **B**: Überlagerung von Kanal 1+2+3.

### Kalibrierung von 5-Carboxyfluoreszein in Hefezellen

Die mit Farbstoff beladenen und permeabilisierten Zellen des Wildtyp-Stammes (By4741) wurden abzentrifugiert und in Kalibriermedium definierten pH-Wertes zu einer OD von 3,0 aufgenommen. Die Angleichung des pH-Wertes zwischen Vakuole und Außenmedium erfolgte ebenfalls durch die bereits oben beschriebenen Protonenträger Methylamin und Pivalinsäure. 100  $\mu$ l Aliquots wurden in einer Quarzmikrotiterplatte alternierend in zwei Kanälen gemessen (siehe Kap.2.10.2.2). Das Ergebnis zeigt eine sigmoidale Abhängigkeit der Fluoreszenzquotienten vom vakuolären/Provakuolären pH-Wertes (Abb.22).



**Abbildung 22:** Kalibrierung der pH-abhängigen Fluoreszenz von 5-Carboxyfluoreszein in Hefezellen

Die Äquilibrierung des zellulären pH-Wertes im Bereich von pH 4,0-5,5 erfolgte mit Pivalinsäure und im Bereich von 5,0-7,5 mit Methylamin (siehe Kap.2.6.2.3), die Umrechnung von Fluoreszenzquotienten in pH-Werte erfolgte mit Hilfe der aufgeführten Formel unter Anwendung der ermittelten Werte für die in der Tabelle aufgeführten Parameter. Messpunkte sind Mittelwerte aus drei gleichberechtigten Messungen ( $n=3$ ,  $\pm$  SD).

#### 2.10.5 Variabilität der Messwerte

Nach unseren Erfahrungen wird die Variabilität der in Zellsuspensionen gemessenen pH-Änderungen nicht durch das fluoreszenzbasierte Messverfahren verursacht, sondern beruht auf folgenden Charakteristika der Zellen bzw. Zellkulturen,

- dem Differenzierungszustand:** nach Schätzungen von Viehweger (2003) nehmen nicht alle, sondern zwischen 30-60 % der Zellen einer Suspension von *Eschscholzia californica* an der Elicitor-ausgelösten Alkaloid-Bildung teil,

2. **dem Zellzyklus:** periodische Schwankungen der pH-Verteilung über den Kulturverlauf sind messbar,
3. **der Heterogenität des Wachstums:** unterschiedliches Verhalten von Einzelzellen und Zellverbänden, sowie
4. **unvollständige Permeabilisierung** der Zellen einer gegebenen Suspension. Hierzu ist ein Kompromiss zwischen der Zerstörung der Plasmamembran und dem Erhalt des Tonoplasten zu finden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakteristika des Protonentransports an der Vakuole von Zellen aus *Eschscholzia californica*

Ausgangspunkt für die im Folgenden beschriebenen Experimente war die Entwicklung eines Verfahrens zur Messung und Charakterisierung von Protonenströmen zwischen Vakuole und Zytoplasma in Zellsuspensionen von *Eschscholzia californica*. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, die bisher nur an Einzelzellen durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie messbare Aktivität vakuolärer NHX-Transporter in einer großen Zahl von kultivierten Zellen gleichzeitig zu erfassen. Das in Kapitel 2.10 beschriebene Verfahren beruht auf zwei methodischen Voraussetzungen: 1. der selektiven Akkumulation eines Fluoreszenz-pH-Indikators in der Vakuole der Suspensionszellen und 2. der selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran, wodurch der intakte Tonoplast für externe Mikromoleküle direkt zugänglich wird. Damit entstand ein *in situ* System, welches die Untersuchung von Ionenfluxen an Vakuolen in ihrer natürlichen makromolekularen Umgebung erlaubte. Dies erscheint als ein wesentlicher Vorteil gegenüber der vollständigen Isolation der Vakuole aus der Ursprungszelle, was zu erheblicher Heterogenität und Instabilität freigesetzter und neu entstandener Vakuolen führt.

Die Funktionstüchtigkeit der Vakuolen für die geplanten Messungen von Protonenfluxen wird durch die folgenden Experimente demonstriert.

1. Die *in situ* Vakuolen sind zur Aufrechterhaltung eines ATP-abhängigen Protonengradienten in der Lage (siehe Abb.23). Bafilomycin, ein spezifischer Hemmstoff der V-ATPase, stoppt den Anstieg der vakuolären Protonenkonzentration. Der weiterhin ablaufende  $H^+$ -Efflux führt zur Abnahme der Konzentration an akkumulierten Protonen. Dies demonstriert die Bedeutung der V-ATPase für die Etablierung und Aufrechterhaltung des Protonengradienten.
2.  $H^+$ -beladene *in situ* Vakuolen zeigen einen von der externen  $Na^+$ -Konzentration abhängigen Protonenefflux (siehe Abb.24). Dieser wird durch Amilorid, einen spezifischen Hemmstoff vakuolärer NHX-Transporter, blockiert. Der  $Na^+$ -abhängige Protonenefflux dient als Maß für die Aktivität der NHX-Transporter.
3. Das Signalmolekül Lysophosphatidylcholin (LPC) ist seit langem als Stimulator des des vakuolären  $Na^+/H^+$ -Antiports in *Eschscholzia californica* bekannt (Viehweger et

al., 2002, 2006). Wie Abb.24 zeigt, ist dieser Effekt ebenfalls in permeabilisierten Zellen der hier verwendeten Kultur nachweisbar.

Damit sind 3 wesentliche, vorher an Einzelzellen dokumentierte Charakteristika von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern des Tonoplasten auch in Suspensionen permeabilisierter Zellen experimentell zugänglich. Dies ermöglichte die Anwendung der für Zellkulturen etablierten molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter des Tonoplasten und war Ausgangspunkt für die Identifizierung und Charakterisierung ihrer individuellen Vertreter.

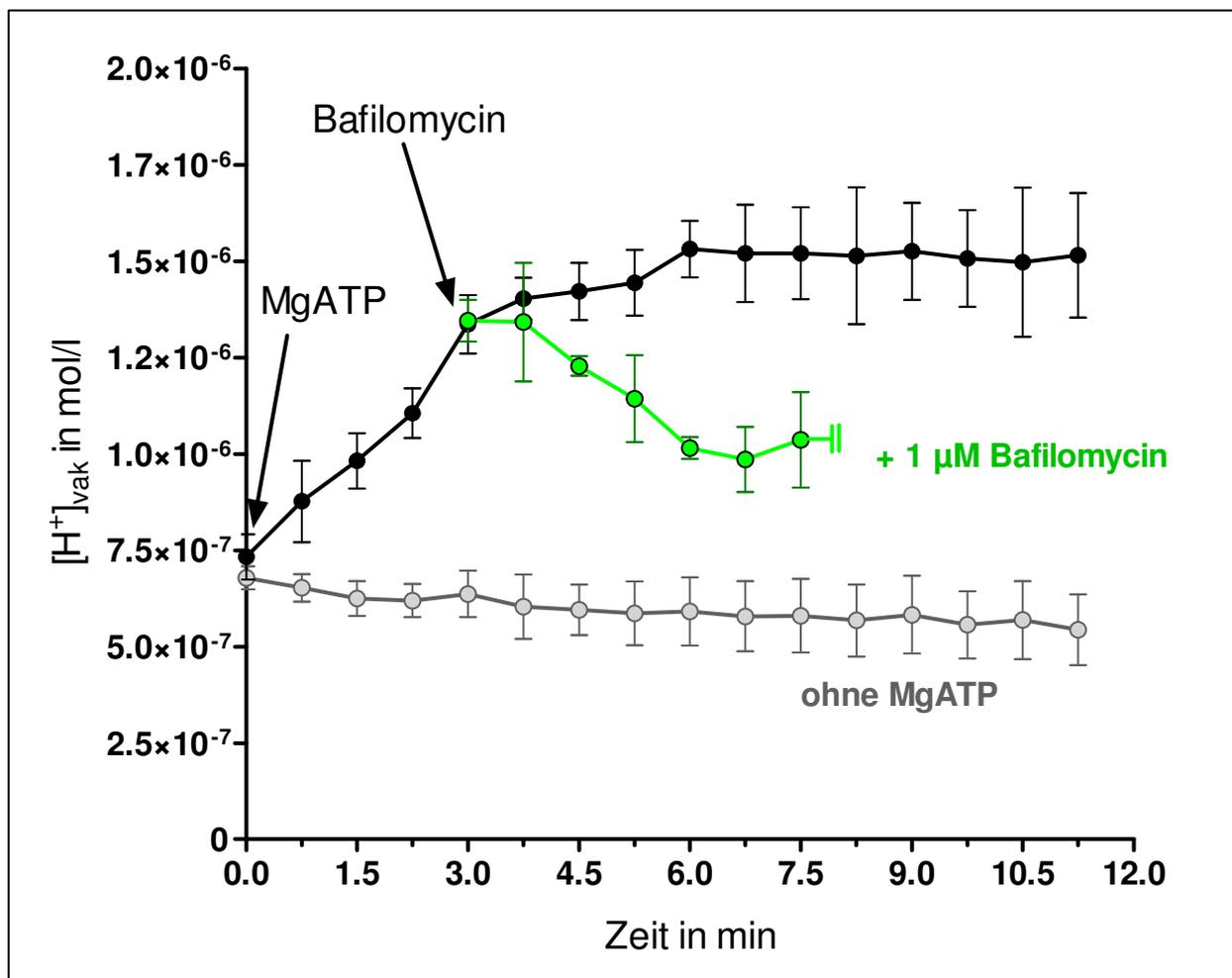
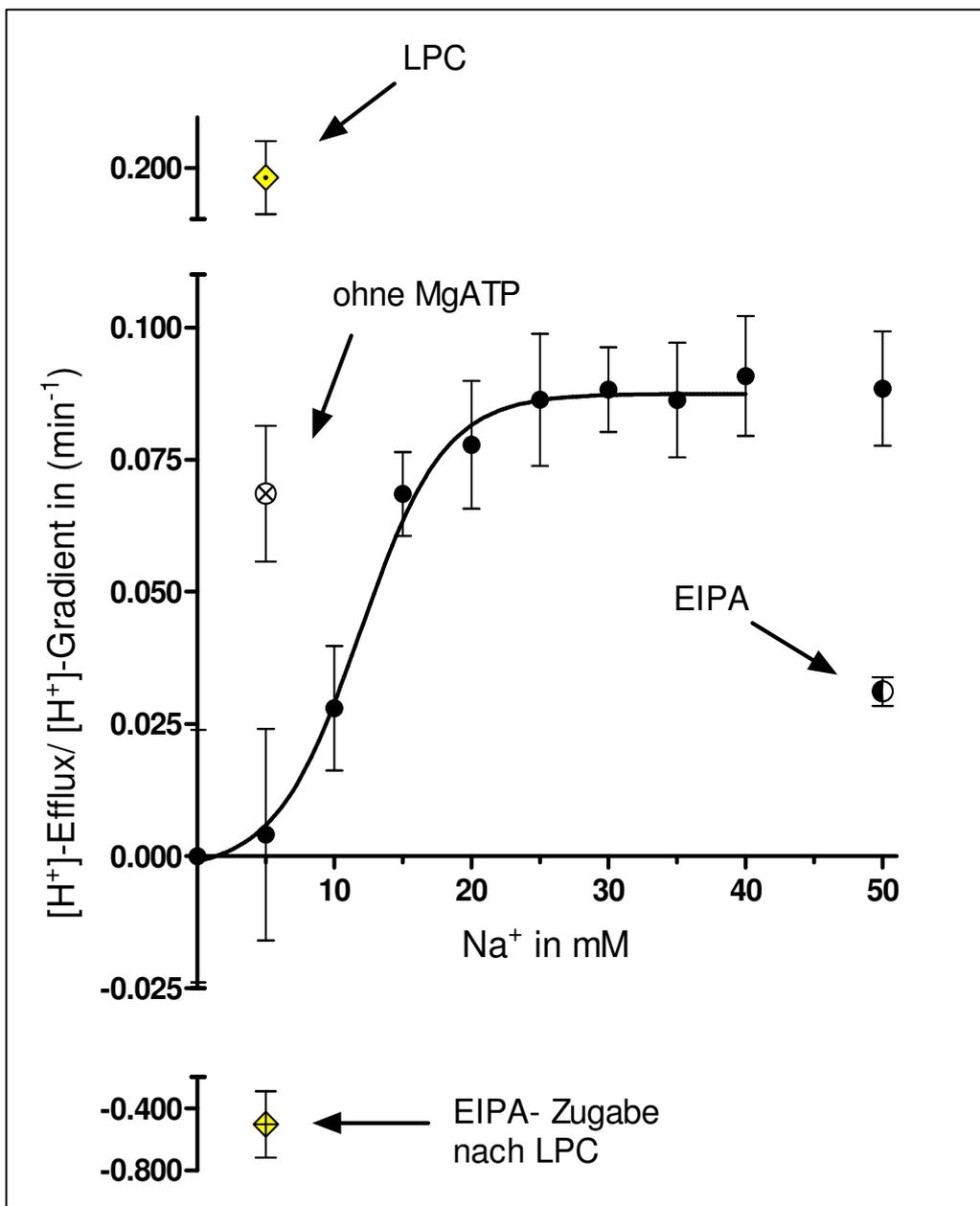


Abbildung 23: Aktivierung vakuolärer Protonenpumpen (V-ATPasen) durch MgATP

Eine mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellsuspension von *Eschscholzia californica* wurde mit 5 mM MgATP versetzt und die vakuoläre  $\text{H}^+$ -Konzentration fluorimetrisch gemessen (siehe Kap.2.10.2). Beim angegebenen Zeitpunkt ( $\downarrow$ ) erfolgte der Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Bafilomycin (V-ATPase-Hemmstoff) bzw. einer äquivalenten Menge Lösungsmittel (Lsgm.). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 gleichberechtigten Messungen ( $n=4$ ,  $\pm$  SD) und beschreiben die von der Lsgm.-haltigen Vergleichsprobe verschiedene  $\text{H}^+$ -Konzentration nach Bafilomycin-Zusatz.



**Abbildung 24: Wirkung von LPC und Amilorid auf den Na<sup>+</sup>-abhängigen Protonenefflux an der Vakuole**

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellsuspension wurde mit 5 mM MgATP versetzt und die vakuoläre H<sup>+</sup>-Konzentration nach Zusatz verschiedener Na<sup>+</sup>-Konzentrationen fluorimetrisch bestimmt (●), (siehe Kap.2.10). Daten sind Änderungen der vakuolären H<sup>+</sup>-Konzentration pro Zeit (μM/min) nach Na<sup>+</sup>-Zusatz, gemessen als H<sup>+</sup>-Ausstrom aus der Vakuole (H<sup>+</sup>-Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen Vakuole und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ([H<sup>+</sup>]-Gradient in μM). Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus 12 gleichberechtigten Messungen dar (n=12, ±SD) und beschreiben die von einer Na<sup>+</sup>-freien Vergleichprobe verschiedene H<sup>+</sup>-Konzentration. Bei einer Konzentration von 5 mM Na<sup>+</sup> wurden zusätzlich Protonenfluxe in Abwesenheit von MgATP (⊗) und in Gegenwart folgender Effektoren gemessen: 1 μM LPC (◆) und 400 μM Ethylisopropylamilorid (EIPA) nach vorheriger Einwirkung von LPC (◆). Bei einer Konzentration von 50 mM Na<sup>+</sup> wurde der Protonenflux unter Anwesenheit von 400 μM EIPA (●) gezeigt. Diese Messpunkte sind Mittelwerte aus 4 gleichberechtigten Messungen (n=4, ±SD) und beschreiben die von einer Zusatz-freien Vergleichprobe verschiedene H<sup>+</sup>-Konzentration.

### 3.2 Identifizierung vakuolärer Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter (NHX1-4) in *Eschscholzia californica*

Die Suche nach Genen für vakuoläre Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter (NHX) in *Eschscholzia californica* erfolgte mittels PCR in der aus Gesamt-RNA hergestellten cDNA (siehe 2.8.4). Aus Konsensus-Sequenzen bekannter pflanzlicher NHX-Gene wurden NHX-spezifische Primer abgeleitet (siehe Abb.25). Darunter befanden sich konservierte Bereiche hoher Ähnlichkeit, wie die für die Amilorid-Bindestelle kodierende DNA.

Die mit den zuerst verwendeten Primerkombinationen erhaltenen Amplimere dienten der Ableitung weiterer spezifischer Primer, die eine fortschreitende Amplifizierung von NHX-spezifischen DNA-Sequenzen ermöglichten. Aus den durch Überlappungen erhaltenen Sequenzen und ihrer Verlängerung durch RACE-PCR erfolgte eine schrittweise Vervollständigung, die letztlich zur Identifizierung von vier NHX-spezifischen ORF's führte. Der Verlauf der PCR-gestützten Suche ist dabei in Abb.26 zusammengefasst. Die Ergebnisse sprechen für die Existenz von vier vakuolären Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiportern in *Eschscholzia californica*.

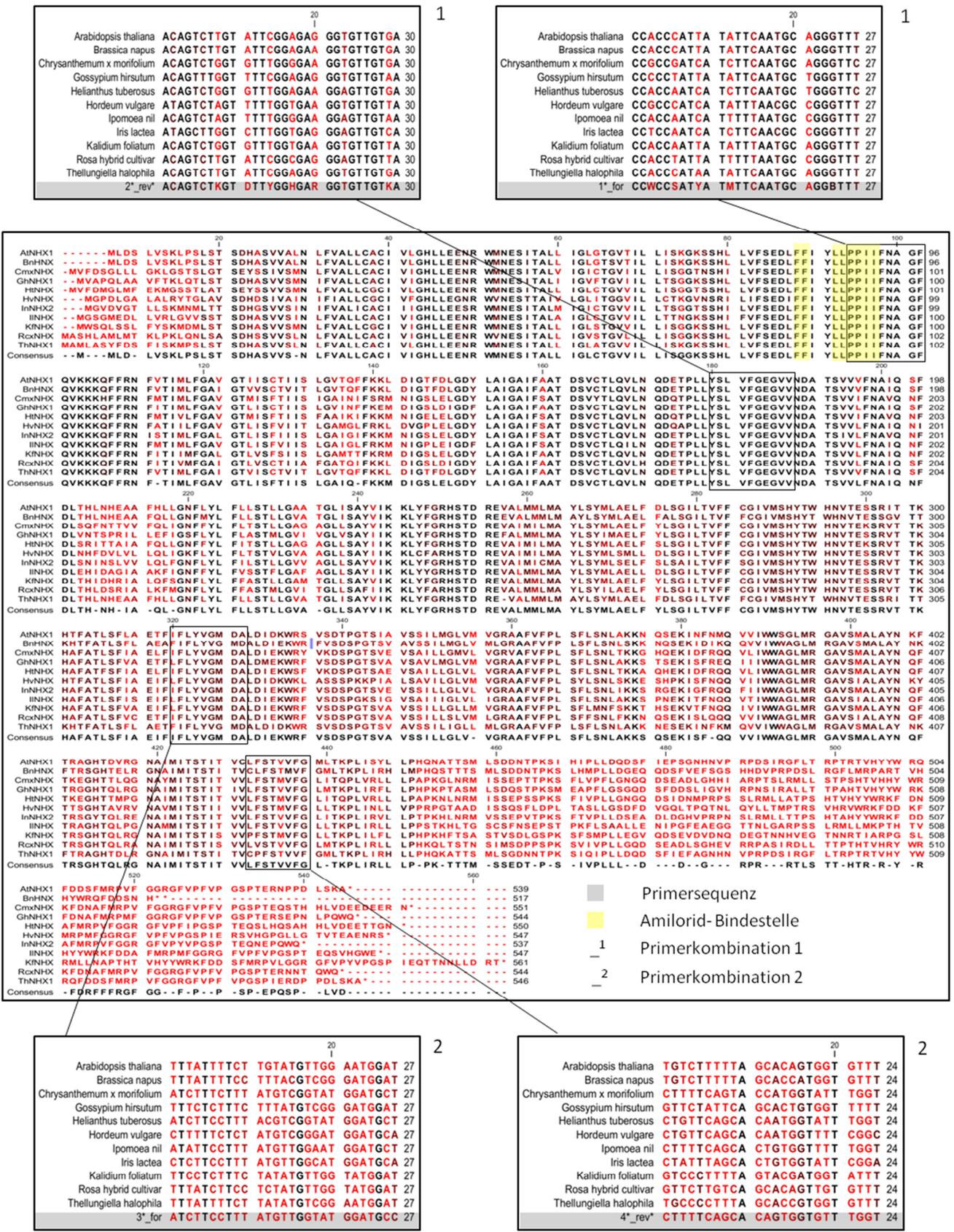
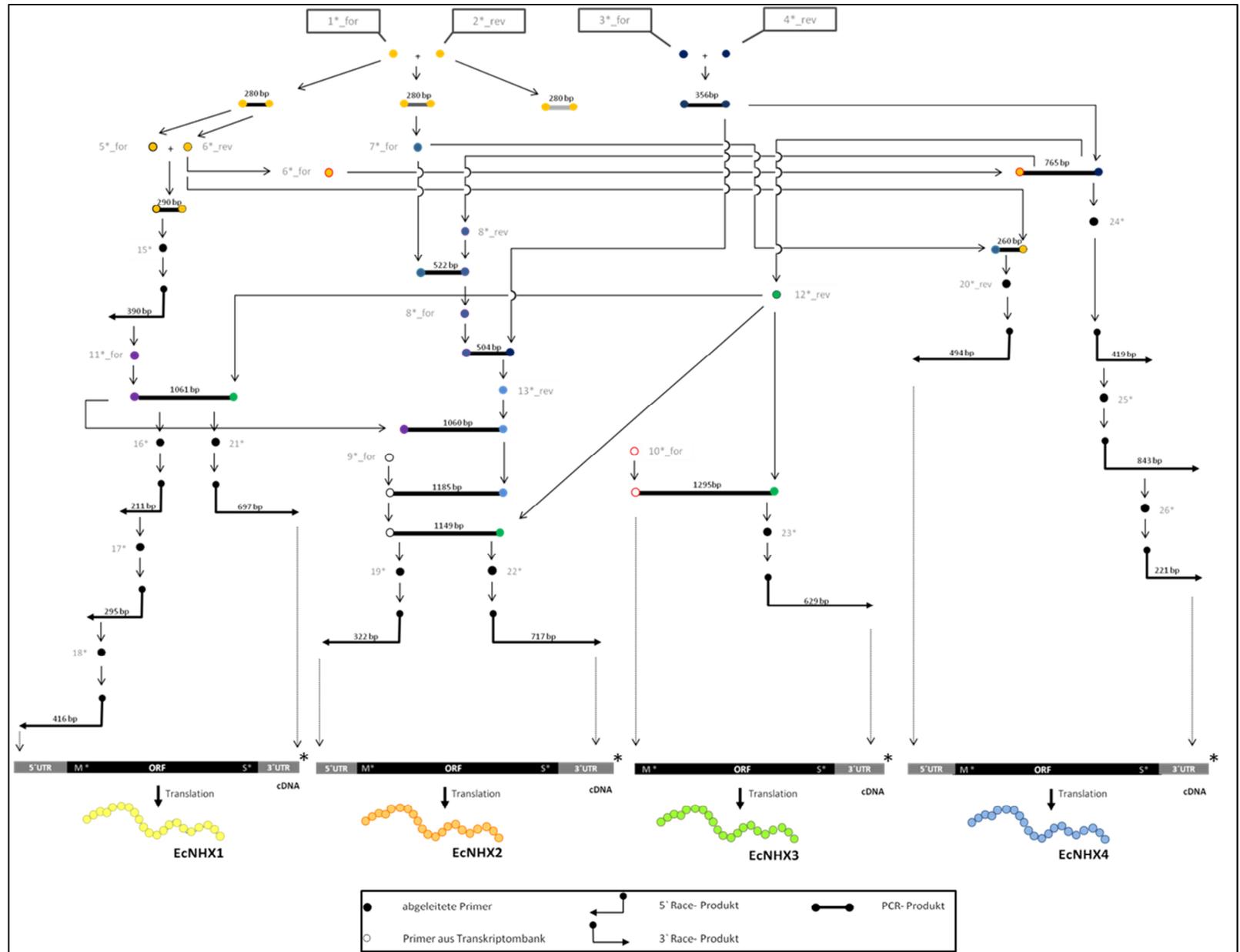


Abbildung 25: Ableitung NHX-spezifischer Primer für die Suche nach vakuolären NHX-Antiporern in *Eschscholzia californica*

Aus einer Auswahl bekannter NHX-Aminosäuresequenzen wurden konservierte Bereiche ermittelt, welche als Vorlage für die Primer-Ableitung dienen. Primer 1\* und 2\* (Box1) wurden von Blumwald et al., 2003 vorgeschlagen Primer und übernommen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind mit grauen Kästen in den Boxen gekennzeichnet. Die Aminosäuren bzw. Basen (in Box1/2) sind von schwarz (hohe Übereinstimmung) bis hellrot (niedrige Übereinstimmung) dargestellt. Die hoch konservierte Sequenz der Amilorid-Bindestelle ist mit einem gelben Kasten gekennzeichnet.

**Abbildung 26:**  
**Suche nach NHX-spezifischen**  
**Sequenzen in *Eschscholzia***  
***californica***

Mit Hilfe von PCR (2.8.5) und Race-PCR (2.8.6) wurden schrittweise vier NHX-spezifische Sequenzen in cDNA von *Eschscholzia californica* identifiziert, auf deren Basis vier *in silico* translatierte Aminosäuresequenzen abgeleitet wurden. Die Primer sind als Nummern vereinfacht dargestellt und im Anhang 7.3.1 aufgelistet (Nr\*). DNA-Fragmente sind durch schwarze Balken dargestellt und werden durch die Gesamtlänge (bp) und die Primerkombination (unterschiedlich farbig ausgefüllte Kreise) charakterisiert. Die am Ende resultierende cDNA-Gesamtsequenz (\*) beinhaltet die untranslatierten 5’-/3’-Regionen (UTR) und den open reading frame (ORF) M\*: Methionin-Startcodon, S\*: Stopcodon.



### 3.3 Charakterisierung der vakuolären Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter (EcNHX1-4)

#### 3.3.1 Konservierte Domänen

Die Suche nach konservierten Domänen auf Basis der *in silico* translatierten Proteinsequenzen der neu identifizierten NHX-ORF's lieferte, wie aus den in der Einleitung gezeigten Phylogenien zu erwarten war, vor allem bekannte Familienmerkmale der CPA1 und CPA2-Familie, wie die NhaP-, Kef-, a/b\_cpa1- Domänen (Details siehe Anhang 7.8). In Abb.27 ist die für Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter typische pfam00999 Domäne am Beispiel der neu identifizierten NHX-Antiporter von *Eschscholzia californica* illustriert. Sie ist Ausgangspunkt phylogenetischer Untersuchungen der CPA1-Familie (siehe Abb.2) und beinhaltet die hochkonservierte Amilorid-Bindestelle (siehe Kap.1.2.1). Aus dem Vergleich der Proteinsequenzen aller vakuolären NHX-Isoformen aus *Eschscholzia californica* fällt auf, dass die als EcNHX1 und EcNHX3 sowie die als EcNHX2 und EcNHX4 bezeichneten Proteine untereinander eine höhere Sequenzähnlichkeit aufweisen als zu den anderen Isoformen.

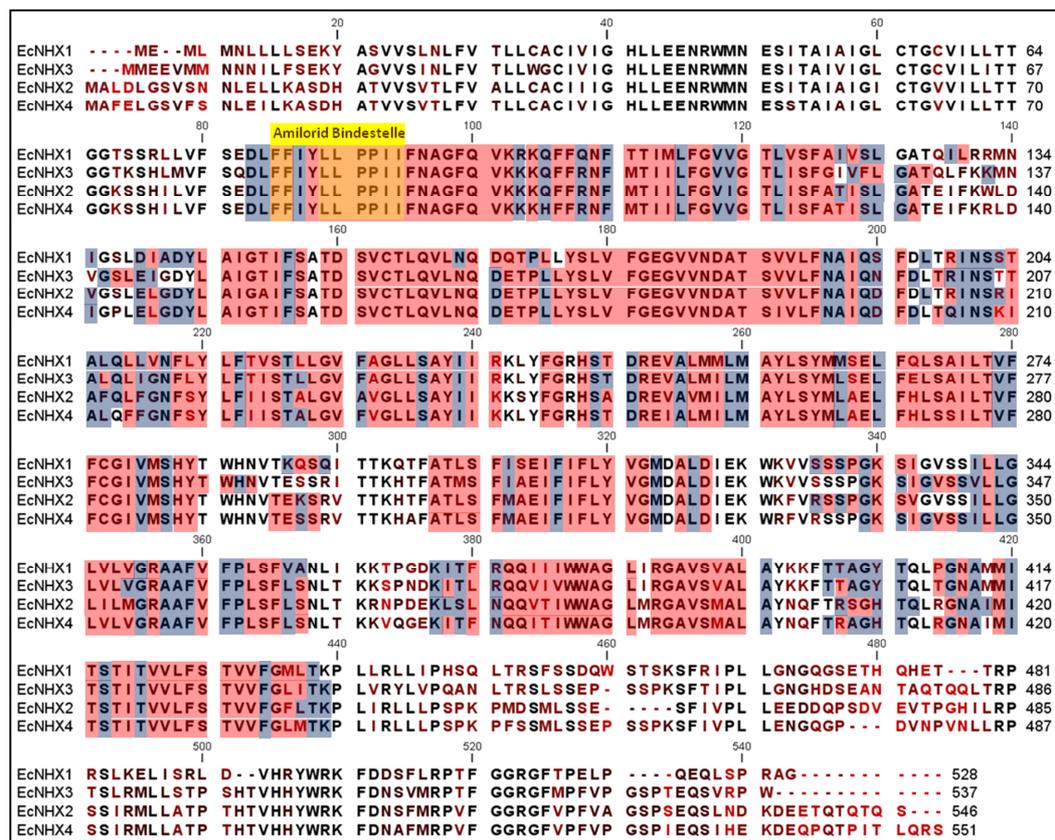


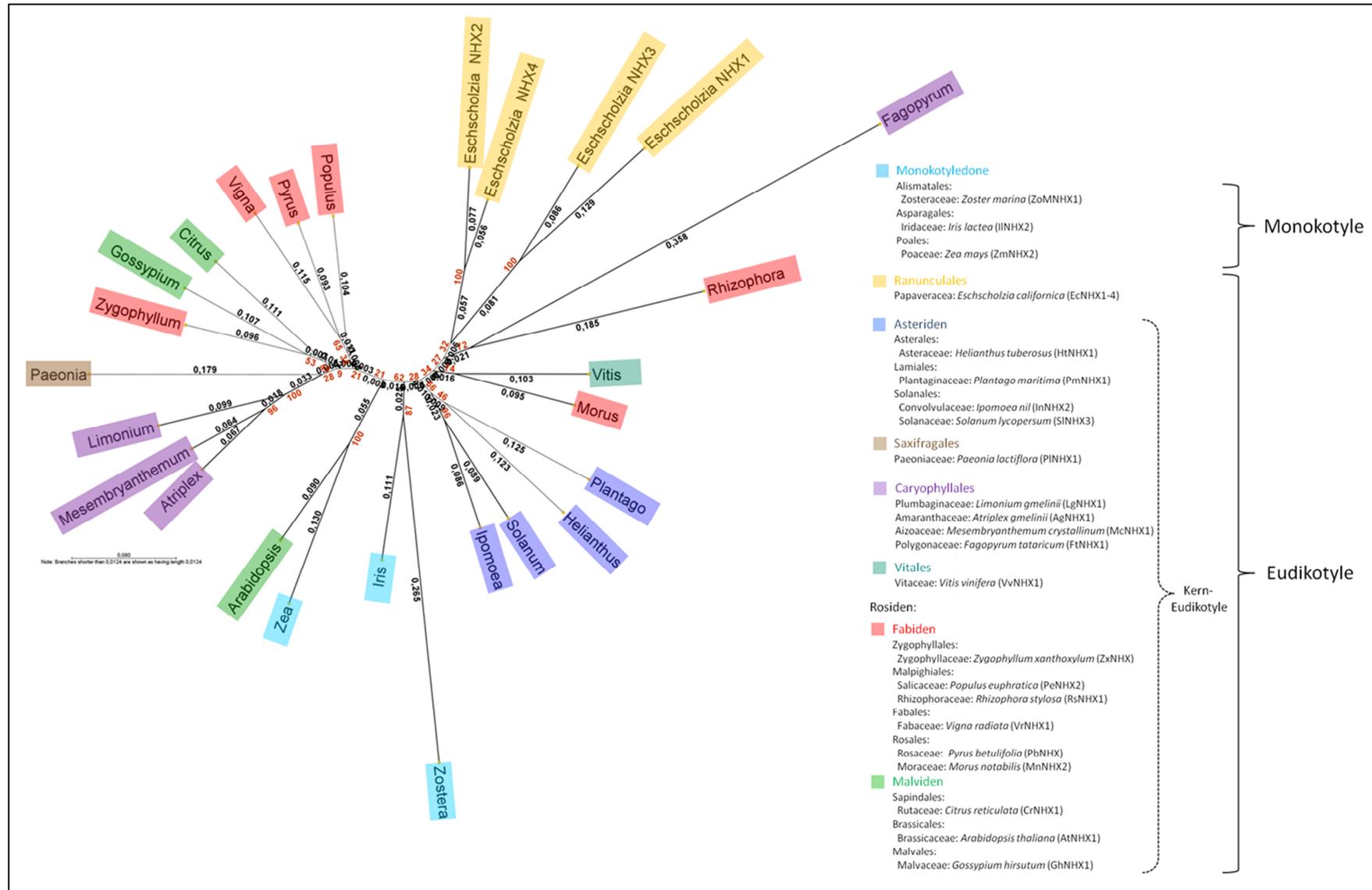
Abbildung 27: Die pfam00999 Domäne in NHX-Proteinsequenzen von *Eschscholzia californica*

Die Aminosäuren sind mit schwarz für hohe Übereinstimmung bis dunkelrot mit niedriger Übereinstimmung gekennzeichnet. Die pfam00999 Domäne ist durch blaue (wenig konserviert) und rote Kästen (hoch konserviert) gekennzeichnet. Die Proteinsequenzen stammen von den vier neu identifizierten NHX-ORF's aus *Eschscholzia californica* (EcNHX1-4) und wurden *in silico* translatiert. Die sequenzgenaue Ermittlung der Domäne erfolgte mit Hilfe des Programms <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Stand 12.2014).

### 3.2.2 Vergleich der EcNHX1-4 Transporter mit ihren pflanzlichen Homologen

Vor dem Hintergrund einer Vielzahl bekannter NHX-Sequenzen mit ähnlichen Domänen stellte sich die Frage nach der molekularen Verwandtschaft der in *Eschscholzia californica* identifizierten Antiporter.

Dazu wurden die *in silico* translatierten Sequenzen mit annotierten NHX-Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Pflanzenfamilien verglichen (siehe Abb.28). Um Ungleichgewichte in den Datenbanken zwischen Spezies mit mehreren zugänglichen NHX-Isoformen und/oder mehreren Vertretern einer Pflanzenfamilie, zu weniger beforschten Spezies und/oder Pflanzenfamilien auszugleichen, wurde jeweils nur ein NHX-Vertreter pro Familie ausgewählt, und zwar derjenige mit der höchsten Sequenz-Identität gegenüber dem als Bezugsbasis dienenden AtNHX1-Antiporter von *Arabidopsis thaliana* (Spezies siehe Anhang 7.9). Der Sequenzvergleich (Multisequenzalignment siehe Anhang 7.9) und der daraus erstellte radiale Stammbaum zeigen zunächst die erwartete hohe Ähnlichkeit zwischen allen pflanzlichen NHX-Transportern, auch bei großer evolutionärer Distanz, etwa zwischen *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* (Systematik der Angiospermen siehe Anhang 7.9). Die vier NHX-Antiporter aus *Eschscholzia californica* bilden ein gemeinsames Cluster, d.h. die Sequenzunterschiede zwischen diesen Isoformen sind untereinander geringer als zu den gezeigten NHX-Homologen aus einer Vielzahl von Pflanzenfamilien. Weitere phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass sich die vier Antiporter EcNHX1-4 auch unter Einbeziehung der Gruppen vakuolärer NHX-Antiporter von *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1-4), *Populus euphratica* (PeNHX1-4) und *Zea mays* (ZmNHX1-4) deutlich unterscheiden (Bild nicht gezeigt). Diese hohe Ähnlichkeit zwischen den Isoformen spricht für einen möglichen Zusammenhang zwischen der evolutionären Entstehung dieser Antiporter und der Artbildung.



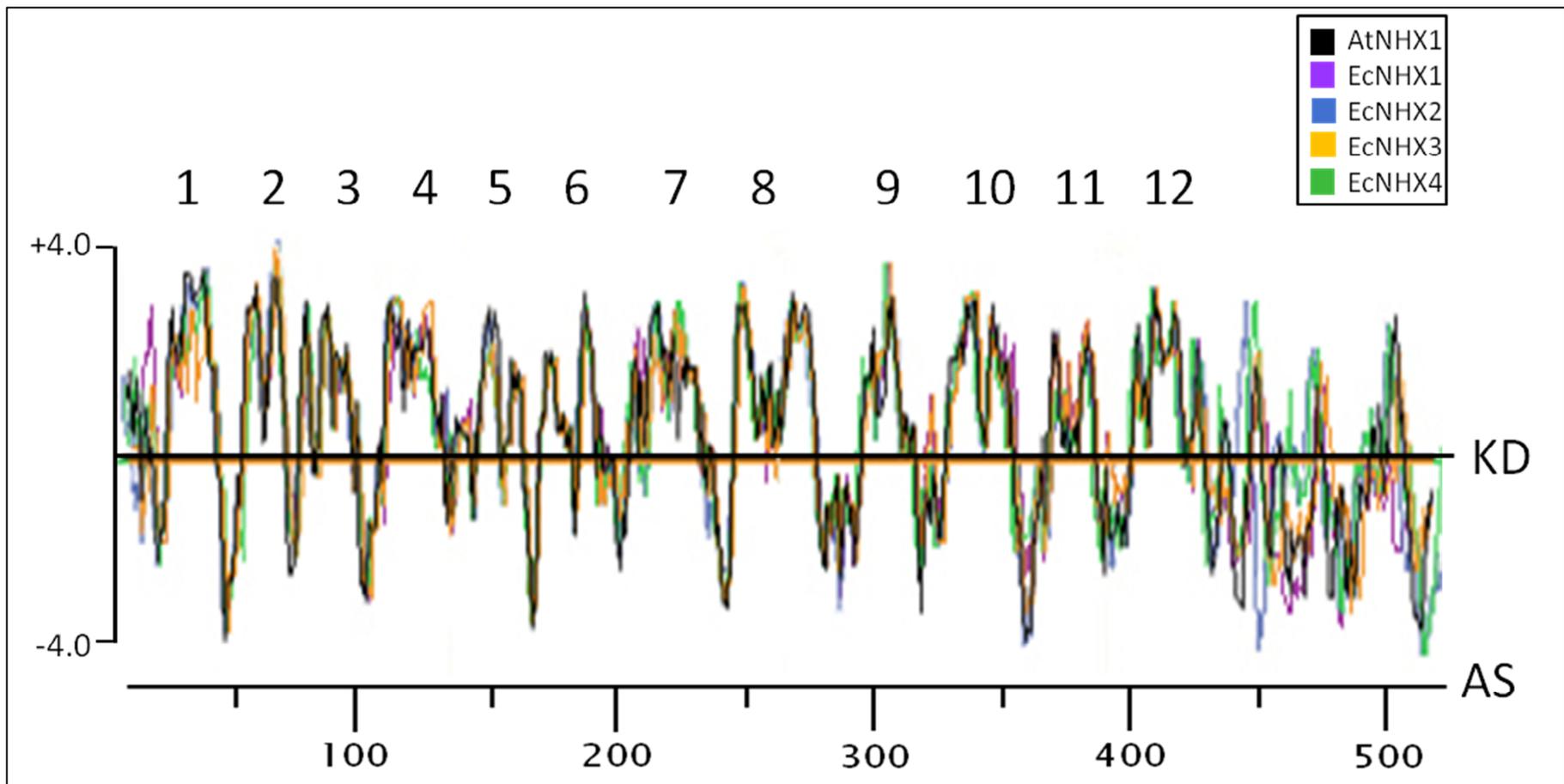
**Abbildung 28: Radialer Familien-Stammbaum**

Der Stammbaum wurde aus dem in Abb.57 gezeigten Multisequenzalignment mit dem neighbor-joining Algorithmus erstellt. Die Distanz- Kalkulation erfolgte mit dem Kimura-2-Parameter. Der Stammbaum wurde mit bootstraps von 100 getestet. Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen dem bootstrap- Wert (rot). Die Zahlen an den Zweigen repräsentieren die Zweiglängen (schwarz) und sind ein Maß für die erwartete Anzahl an Mutationen bei der Entstehung des jeweiligen NHX-Gens. Alle Berechnungen erfolgten mit der CLC Sequence Viewer 7.0.2 Software.

### 3.3.3 Topologie und Funktion

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kap.1.3.2), sind die umfangreichsten Daten zur Topologie der NHX-Transporter und der Funktion ihrer Proteindomänen aus *Arabidopsis thaliana* bekannt (siehe Abb.3). Um erste Hinweise auf die Topologie der neu in *Eschscholzia* gefundenen NHX-Proteine zu erhalten, wurden für alle EcNHX-Aminosäuresequenzen Hydropathie-Plots erstellt und mit dem von AtNHX1 verglichen. Die in AtNHX1 sichtbare, typische Topologie eines NHX-Transporters zeigt einen, zwischen vielen Spezies konservierten N-Terminus, den Transmembran-Bereich mit 12 hydrophoben Helices, und den C-Terminus, welcher die meisten Sequenzunterschiede zu anderen Spezies aufweist.

Wie aus Abb.29 hervorgeht, sind die N-terminale Domäne und die Transmembran-Bereiche aller EcNHX-Antiporter hinsichtlich ihrer Hydropathie sehr ähnlich und stimmen weitgehend mit dem AtNHX1-Antiporter aus *Arabidopsis thaliana* überein. Man kann also auch für die vakuolären Antiporter aus *Eschscholzia californica* von 12 Transmembran-Helices ausgehen. Dagegen sind die Unterschiede in den C-terminalen Domänen sowohl innerhalb der NHX-Antiporter aus *Eschscholzia californica* als auch im Vergleich mit AtNHX1 deutlich ausgeprägt. Zusammen mit der hohen Sequenzähnlichkeit (siehe Abb.30) zeigen diese Daten, dass die EcNHX-Antiporter mit hoher Wahrscheinlichkeit dem für AtNHX1 entworfenen Topologie-Modell von Yamaguchi et al., 2003 entsprechen.



**Abbildung 29: Hydropathie-Plots von AtNHX1 im Vergleich zu EcNHX1-4**

Der Hydropathie-Plot des AtNHX1-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (accession NM\_122597.2) wurde mit den Hydropathie-Plots der neu identifizierten EcNHX1-4 Proteinen aus *Eschscholzia californica*, auf Basis ihrer *in silico* translatierten Aminosäuresequenzen, verglichen. Die Plots wurden nach dem Kyte-Doolittle Modell (KD) erstellt. Die Zahlen 1-12 kennzeichnen die hydrophoben Transmembrandomänen und potenziellen Membranhelices.

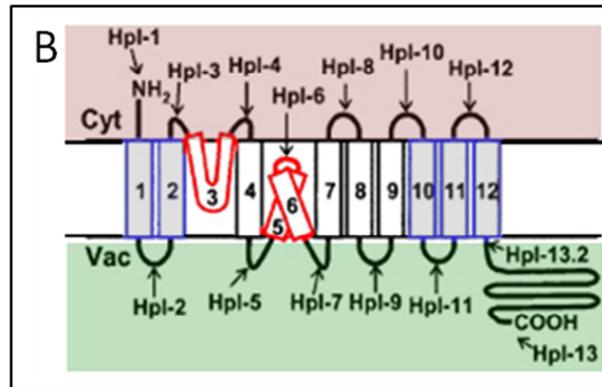
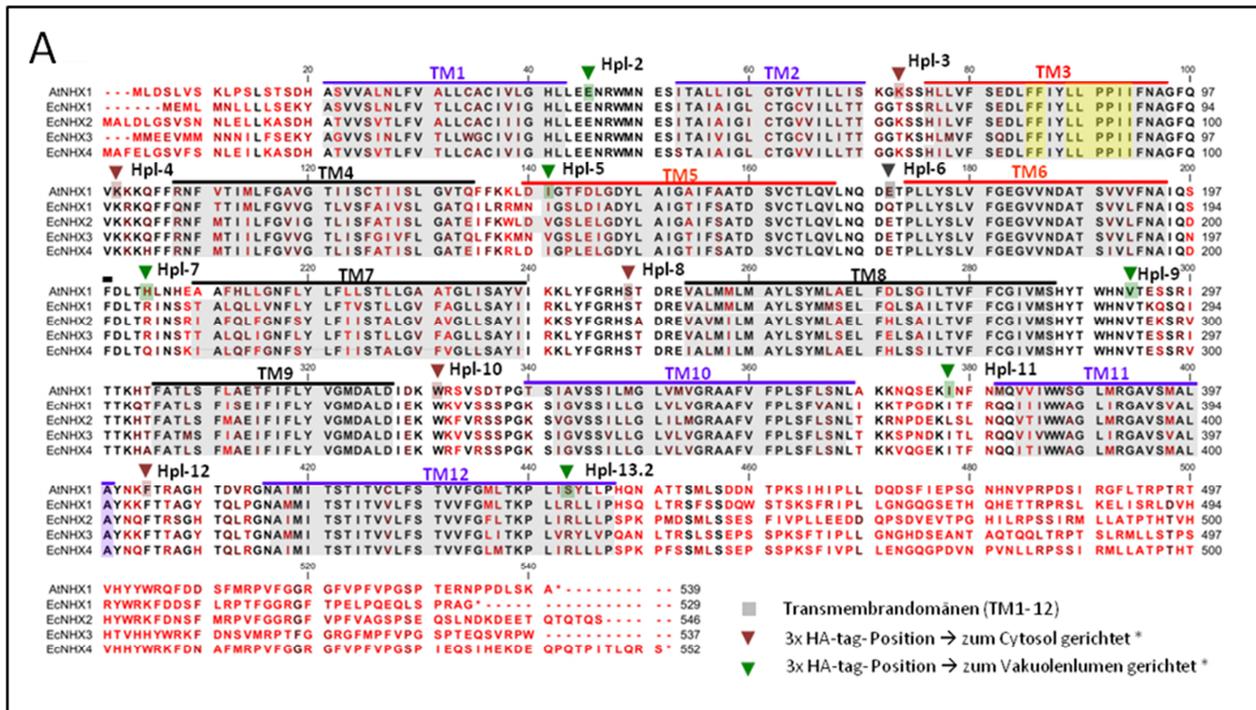


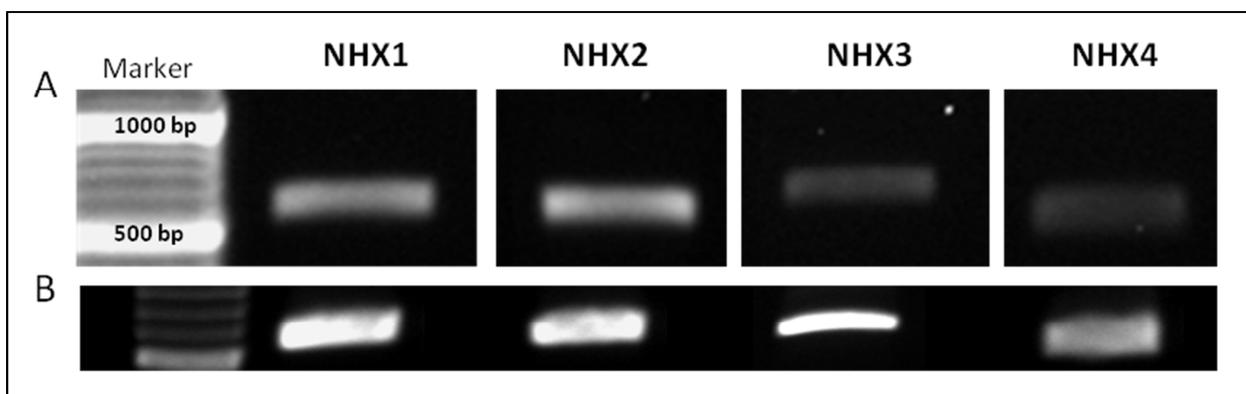
Abbildung 30: Topologie-Modell aus Yamaguchi et al, 2003 für AtNHX1 aus *Arabidopsis thaliana* in Anwendung auf *Eschscholzia californica*

**A:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von AtNHX1 aus *Arabidopsis thaliana* mit EcnHX1-4 aus *Eschscholzia californica*. Aminosäuren sind von schwarz (für hohe Identitäten) bis hellrot (für niedrige Identitäten) dargestellt. Die Amilorid-Bindestelle in der Transmembrandomäne 3 (TM3) ist mit gelben Kästen gekennzeichnet. Die Transmembrandomänen (TM1-12) wurden mit Hilfe der im Hydropathie-Plot errechneten Werte (siehe Abb.29) ermittelt. Die Pfeile kennzeichnen die Position der 3xHA-tags (Hpl-1-13.2) die für die Erstellung des Topologie-Modells (aus Yamaguchi et al., 2003) vorgenommen wurden (Details siehe Kap.1.3.2.)

**B:** Nach dem **Topologie-Modell** aus Yamaguchi et al., 2003 ist der N-Terminus des AtNHX1-Proteins zum Zytoplasma („Cyt“, lila), und der C-Terminus zum Vakuolenlumen („Vac“, grün) gerichtet. Die dem NHE1-Transporter entgegengesetzte Transportrichtung ergibt sich aus der entgegengerichteten Anordnung der als schwarz gekennzeichneten TM, während die blau gekennzeichneten in derselben Richtung verlaufen. Die mit der Membran assoziierten Domänen (TM3, -5, -6) sind an Ionenbindung und -transport beteiligt und rot gekennzeichnet (Details siehe Kap.1.3.2).

### 3.3.4 Die Expression der NHX-Gene in *Eschscholzia californica*

In der verwendeten Zellkultur von *Eschscholzia californica* wurden deutliche Expressionsunterschiede in den Transkripten der NHX-Gene festgestellt. Nach der in Abb.31 gezeigten RT-PCR Analyse, ist die mRNA-Expression von NHX1 und NHX2 verglichen mit NHX3 und NHX4 um das zweifache erhöht. Diese Unterschiede sind insofern interessant, als dass sie eine Vergleichsmöglichkeit mit den aus Ganzpflanzen bekannten Expressionsunterschieden zwischen NHX-Isoformen bieten, welche z.B. in *Arabidopsis thaliana* (z.B. Yokoi et al., 2002), *Populus euphratica* (Ye et al., 2009) oder *Zea mays* (Zörb et al., 2004) festgestellt wurden.

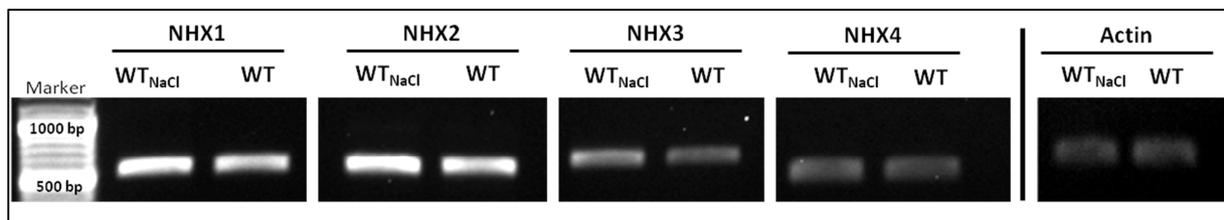


**Abbildung 31: mRNA-Expression von EcNHX1-4 in Zellkultur von *Eschscholzia californica***

**A:** isoformspezifische RT-PCR unter Verwendung gleicher Mengen aus Zellkultur gewonnener Gesamt-cDNA (siehe Kap.2.8.7).

**B:** PCR zum Nachweis der Produkt-Bildung der einzelnen Isoformen. Dazu wurden jeweils 150 ng eines Isoform-tragenden Plasmids als template eingesetzt

Die vakuolären NHX-Transporter spielen eine wesentliche Rolle in der Na<sup>+</sup>-Homöostase von Pflanzen, was u.a. in der Induzierbarkeit der NHX-Gene durch erhöhte Salzgehalte des Bodens bzw. des Kulturmediums deutlich wird (siehe Kap.1.3.6.1). Diese Eigenschaft wurde in Halophyten, jedoch auch in Glykophyten wie *Arabidopsis thaliana* gefunden (z.B. Yokoi et al., 2002). Es stellte sich nun die Frage, ob die NHX-Gene von *Eschscholzia californica*, einer glykophytischen Pflanze sich ebenfalls durch erhöhte Salzgehalte induzieren lassen. Wie Abb.32 zeigt, ist das bei allen 4 NHX-Genen der Fall.



**Abbildung 32: mRNA-Expression der EcNHX1-4 Gene unter Salzstress**

Isoformspezifische RT-PCR unter Verwendung gleicher Mengen cDNA aus Salz-behandelter ( $WT_{NaCl}$ ) und -unbehandelter (WT) Zellkultur (siehe Kap. 2.8.7). Dafür wurden dem Kulturmedium für 1h 100 mM NaCl zugesetzt. Actin diente dem Nachweis gleicher Mengen cDNA.

### 3.4 Silencing der NHX-Gene von *Eschscholzia californica* durch RNAi

Bisherige Untersuchungen des Signaltransfers zur Auslösung des Alkaloid-Stoffwechsels belegen, dass Zellen von *Eschscholzia californica* auf Kontakt mit einem Hefe-Elicitor mit einem Ausstrom vakuolärer Protonen ins Zytosol reagieren, welcher die Expression von Genen der Alkaloid-Biosynthese und der Stressabwehr auslöst. (siehe Kap.1.4, Abb.7). Ein ähnlicher Efflux vakuolärer Protonen kann in permeabilisierten Zellen (siehe Kap.2.10.3) durch Zugabe von LPC ausgelöst werden. Dieser Prozeß ist durch Amilorid hemmbar, was auf die Beteiligung der NHX-Transporter hinweist (siehe Kap.1.4, Abb.9 und 11). Ob die NHX-Transporter in der intakten Zelle tatsächlich für die zur Alkaloid-Bildung führenden pH-shifts verantwortlich sind, kann am Modell der *in situ* Vakuole nicht geklärt werden, da diese nicht zur Alkaloid-Bildung fähig ist. Die Zugabe des NHX-Hemmstoffs Amilorid zu intakten Zellen ergibt vermutlich wegen der geringer Aufnahme bei niedrigen und Vergiftungserscheinungen bei zu hohen Dosen, nur erheblich schwankende Resultate, (Roos und Viehweger, pers. Mitteilung). Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit transgene Zellstämme mit verminderter Expression der NHX-Gene etabliert, mit dem Ziel, eindeutige Belege für die Beteiligung von NHX-Transportern an der Elicitor-ausgelösten Alkaloid-Produktion zu finden.

#### 3.4.1 DNA-Sequenzen für das silencing von NHX-Genen

Der knockdown der vakuolären  $Na^+/H^+$ -Antiporter erfolgte nach dem Prinzip des gene silencing (siehe Kap.2.8.22). Die für den selektiven Abbau der NHX-mRNAs erforderlichen RNAi-Sequenzen wurden aus Konsensus-Bereichen der NHX-Gene von *Eschscholzia californica* und anderer bekannter Pflanzen abgeleitet. Damit sollte eine breitgefächerte Unterdrückung der Expression aller NHX-Gene in *Eschscholzia californica* erreicht werden. Im Einzelnen wurden zwei Sequenzen ausgewählt:

Nr.1: ein Teil der für die Amilorid-Bindestelle kodierenden DNA

Nr.2: ein konservierter DNA-Bereich in der Nähe des C-Terminus.

Abb.33 beschreibt Lage und Sequenz der zwei unterschiedlichen RNAi-vermittelnden Zielstrukturen (siehe Kap.2.8.22.2) in den EcNHX1-4 ORF's von *Eschscholzia californica*. Die Zielsequenzen wurden mit dem Gateway-System in einen Expressionsvektor kloniert (siehe Kap.2.8.14) und für die Transformation von Kallus-Zellen von *Eschscholzia californica* mittels Partikelkanone genutzt (siehe Kap.2.8.19.3).

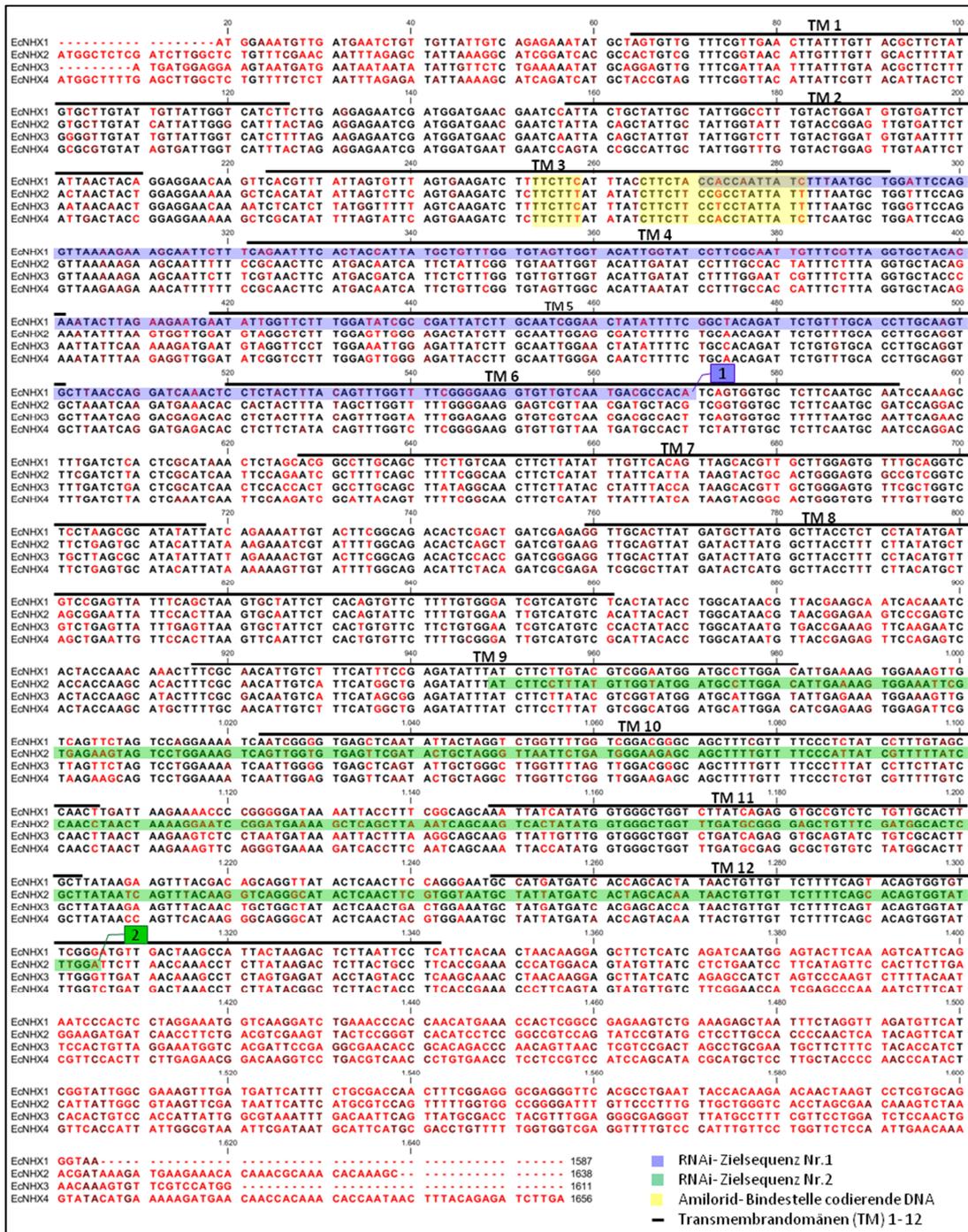
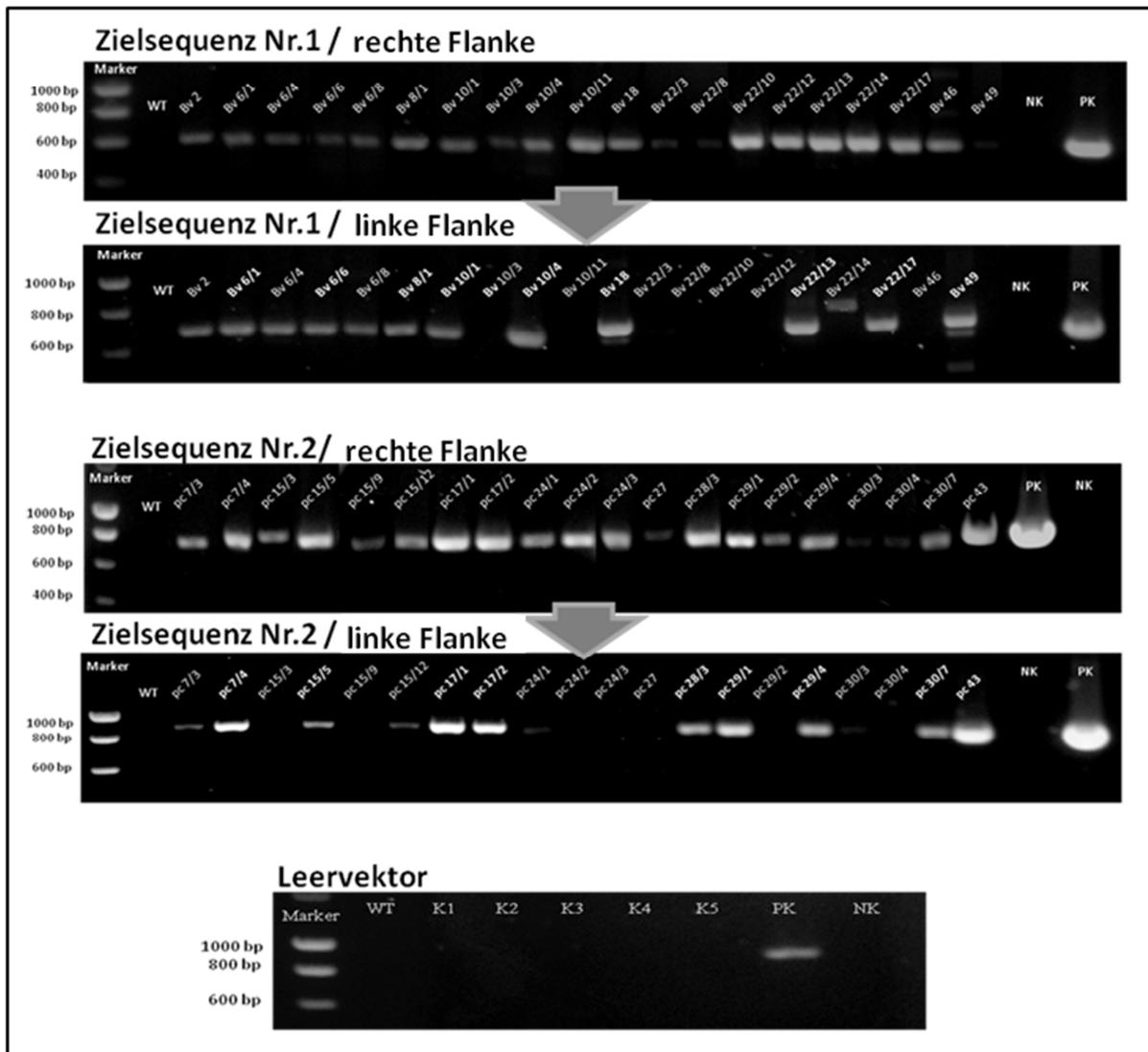


Abbildung 33: DNA-Sequenzen für des gene silencing und ihre targets in *Eschscholzia californica*

Als Vorlage der Zielsequenz Nr.1 (blau Kästen) diente das EcNHX1-Gen. Als Vorlage der Zielsequenz Nr.2 (grüne Kästen) diente das EcNHX2-Gen. Die Basen sind von schwarz (hohe Identität) bis hellrot (niedrige Identität) dargestellt.

### 3.4.2 Selektion der RNA-silencing Mutanten

Die Selektion von Transformanten mit potentiell silencing der NHX-Gene basierte auf der durch den Einbau des RNAi-vermittelnden Vektors hinzugewonnenen Fähigkeit der Zellen von *Eschscholzia californica* zur Paromomycin-Resistenz. Nach Anzucht auf Selektionsmedium (siehe Kap.2.8.20.3) wurden jeweils 51 Klone der mit Zielsequenz Nr.1 bzw. Nr.2 transformierten Zellen isoliert und durch PCR auf das Vorhandensein des RNAi-vermittelnden Vektors im Genom überprüft (siehe Kap.2.8.8). Wie aus Abb.34 hervorgeht, gelang der positive Nachweis beider Vektor-Flanken für jeweils 9 Klone, die anschließend von Kallus- in Suspensionskultur überführt wurden (siehe Kap.2.8.20.3). Damit konnte ein erfolgreicher Transfer und stabiler Einbau der gegen die NHX-mRNA gerichteten silencing-Sequenzen festgestellt werden. Wider Erwarten konnten aus den mit Leervektor transformierten Zellsuspensionen keine stabilen, wachstumsfähigen Kulturen etabliert werden. Außerdem verlief der Nachweis des leeren Vektors im Genom negativ. Die Ursache ist bisher unklar, zumal das bei der Gateway-Klonierung verwendete, Toxin-codierende ccdB-Gen vor dem Transfer durch Restriktionsverdau entfernt und der Vektor neu ligiert wurde (siehe Kap.2.8.22.3). Der Ausfall der Leervektor-Kontrolle wurde in den anschließenden Experimenten durch eine Transformante mit praktisch fehlendem silencing-Effekt kompensiert (s.u.).



**Abbildung 34: Nachweis der rechten und linken Vektor-Flanke im Genom transgener Kulturen von *Eschscholzia californica***

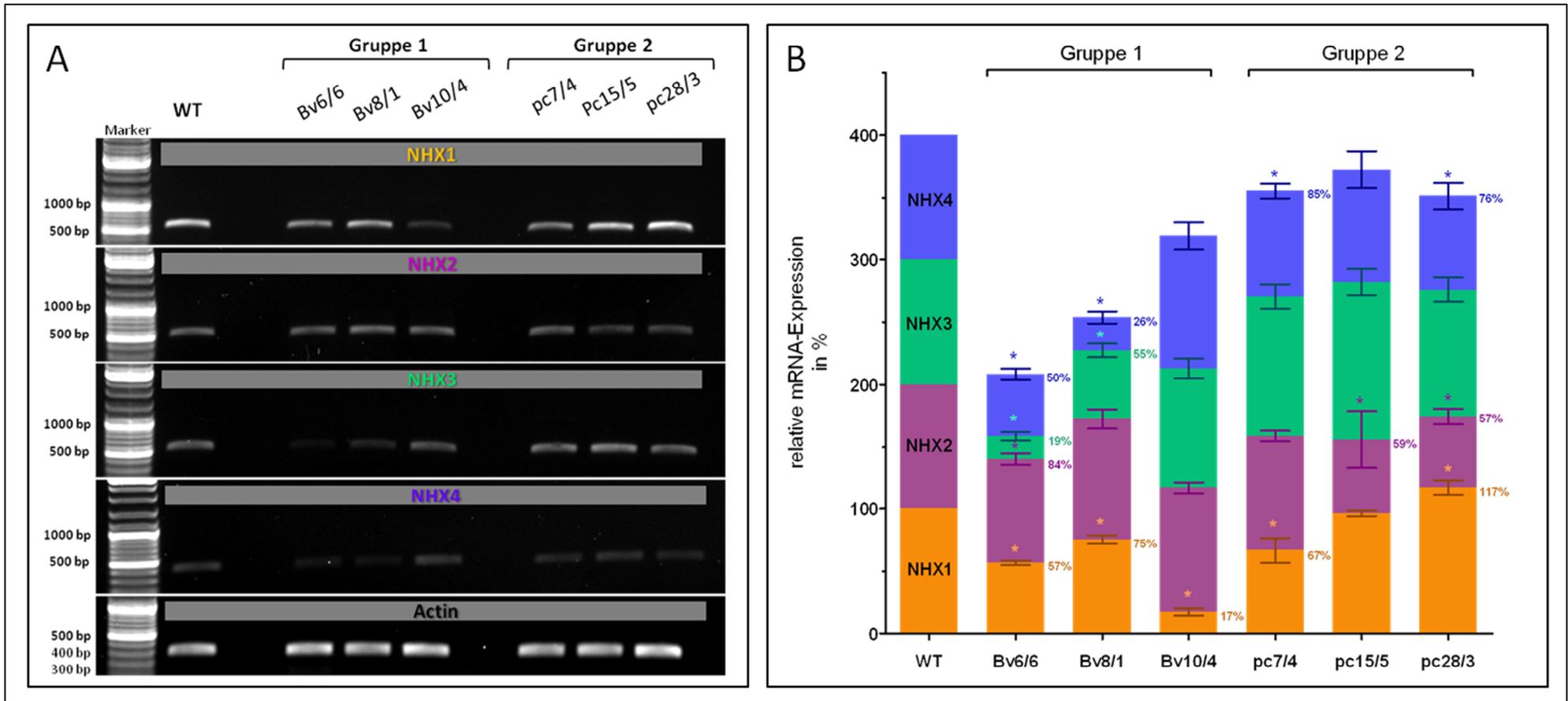
Zur Prüfung der erfolgreichen Transformation der Zellen von *Eschscholzia californica* wurde der Expressionsvektor im Genom mittels PCR nachgewiesen. Dafür wurden zunächst alle isolierten Klone in einer 1.PCR auf das Vorhandensein der rechten Vektorflanke getestet. Auf den positiven Nachweis der rechten Flanke erfolgte der Nachweis der Linken in einer 2.PCR (siehe Kap.2.1.8). Bei der Positivkontrolle (PK) diente der jeweilige Expressionsvektor als template. Die Negativkontrolle enthielt ddH<sub>2</sub>O statt template. Als Wildtyp (WT) diente hier die nicht transformierte Kalluskultur. Bv: mit Zielsequenz Nr.1 transformierte Klone, pc: mit Zielsequenz Nr.2 transformierte Klone.

### 3.4.3 Charakterisierung der RNA-silencing Mutanten

#### 3.4.3.1 Ausmaß des NHX-silencing

Von 9 isolierten Klonen mit positivem Nachweis der Zielsequenz Nr.1 im Genom, hier auch als **Gruppe 1** bezeichnet, erwiesen sich 8 in Zellkultur über mehrere Passagen als stabil. Bei den mit Zielsequenz Nr.2 transformierten Klonen, hier als **Gruppe 2** bezeichnet, waren es lediglich 6. Die transgenen Zellstämme wuchsen im Durchschnitt mit einer Wachstumsrate von 60 % (Gruppe 1) bzw. 70 % (Gruppe 2) des Wildtyps (Details siehe Anhang 7.10). Als Wildtyp für alle nachfolgenden Untersuchungen diente eine aus nicht-transformiertem Kallus frisch hergestellte Zellkultur. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden 3 Zellstämme je Gruppe ausgewählt.

Die Wirksamkeit des durch RNAi ausgelösten gene silencing in den transgenen Zellkulturen wurde mit RT-PCR bestimmt (siehe Kap.2.8.7). Wie aus Abb.35 hervorgeht, konnten deutliche Unterschiede zwischen den Expressionshöhen der vier NHX-Gene und dem Wildtyp detektiert werden. Das gene silencing unter Verwendung der Zielsequenz Nr.1 (RNAi gegen die Amilorid-Bindestelle gerichtet, siehe Kap.3.4.1) führte zu einer deutlichen Reduzierung der EcNHX1-, EcNHX3-, und EcNHX4-Transkripte, jedoch kaum von EcNHX2. Dagegen war bei der Verwendung der Zielsequenz Nr.2 (RNAi gegen die Transmembran-Sequenzen 9-12 gerichtet) keine wesentliche Absenkung des Expressionsniveaus der NHX-Gene detektierbar. Trotz der biologischen Variabilität zwischen den untersuchten Proben sprechen die Expressionsdaten dafür, dass mit der Zielsequenz Nr.1 eine deutliche Verminderung der Expression von NHX-Genen bewirkt wurde.



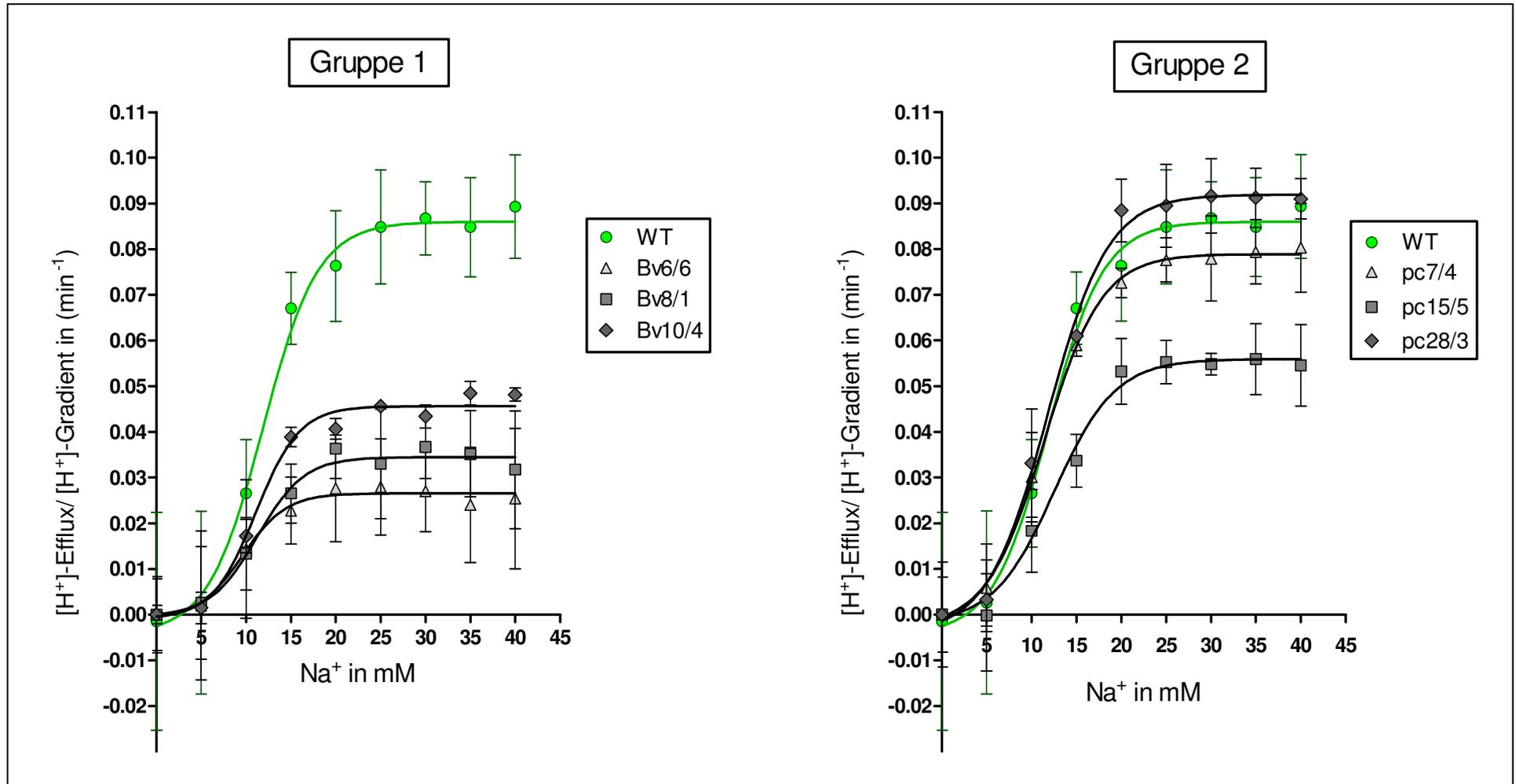
**Abbildung 35: Relative mRNA-Expression der EcnHX1-4 Gene in NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica***

**A:** semiquantitative RT-PCR auf Grundlage gleicher Mengen cDNA transgener Zellstämme der Gruppe 1 (mit Zielsequenz Nr.1 transformiert) und Gruppe 2 (mit Zielsequenz Nr.2 transformiert).

**B:** Relative mRNA-Expression bezogen auf den Wildtyp (WT gleich 100 %). Die mRNA-Expression wurde densitometrisch quantifiziert (siehe Kap.2.8.7) und mit der von Actin normalisiert. Daten sind Mittelwerte aus 4 gleichberechtigten Messungen ( $n=4$ ,  $\pm$  SD). (\*) kennzeichnen signifikante Unterschiede zum Wildtyp ( $p < 0,05\%$ ). Gruppe 1: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen, Gruppe 2: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1).

### 3.4.3.2 Wirkung des RNAi basierten silencing auf die Aktivität der NHX-Transporter

Die Funktion der vakuolären NHX-Transporter kann als ein durch  $\text{Na}^+$  ausgelöster Protonenefflux aus der Vakuole gemessen werden (siehe Kap.3.1, Abb. 24). Dazu wurde die Plasmamembran von Zellen der durch NHX-silencing gewonnenen transgenen Stämme permeabilisiert, d.h. der Tonoplast für Mikromoleküle im Aussenmedium zugänglich gemacht. In Abb.36 ist die in Vakuolen dieser Zellen messbare pH Änderung in Abhängigkeit von der anliegenden  $\text{Na}^+$ -Konzentration dargestellt. Dabei zeigen Transformanten der Gruppe 1 (RNAi gegen Amilorid-Bindestelle gerichtet, siehe Kap.3.4.1) keinen bzw. einen geringen  $\text{Na}^+$ -getriebenen Protonenefflux, während die Transformanten der Gruppe 2 (RNAi gegen Transmembran-Sequenzen 9-12 gerichtet) unter gleichen Bedingungen einen deutlichen, dem Wildtyp nahekommenden  $\text{H}^+$ -Efflux zeigen. Dies spricht für eine deutlich verminderte Expression der NHX-Transporter in Transformanten der Gruppe 1 und bestätigt die auf mRNA-Ebene gewonnenen Erkenntnisse (siehe Abb.35). Das nicht erfolgreiche silencing in transgenen Zellstämmen der Gruppe 2 wird ebenfalls auf der Funktionsebene bestätigt. Sie wurden in den folgenden Untersuchungen als Kontrolle mitgeführt, um den Verlust der Leervektor-Kontrolle zu kompensieren (siehe Kap.3.4.2).



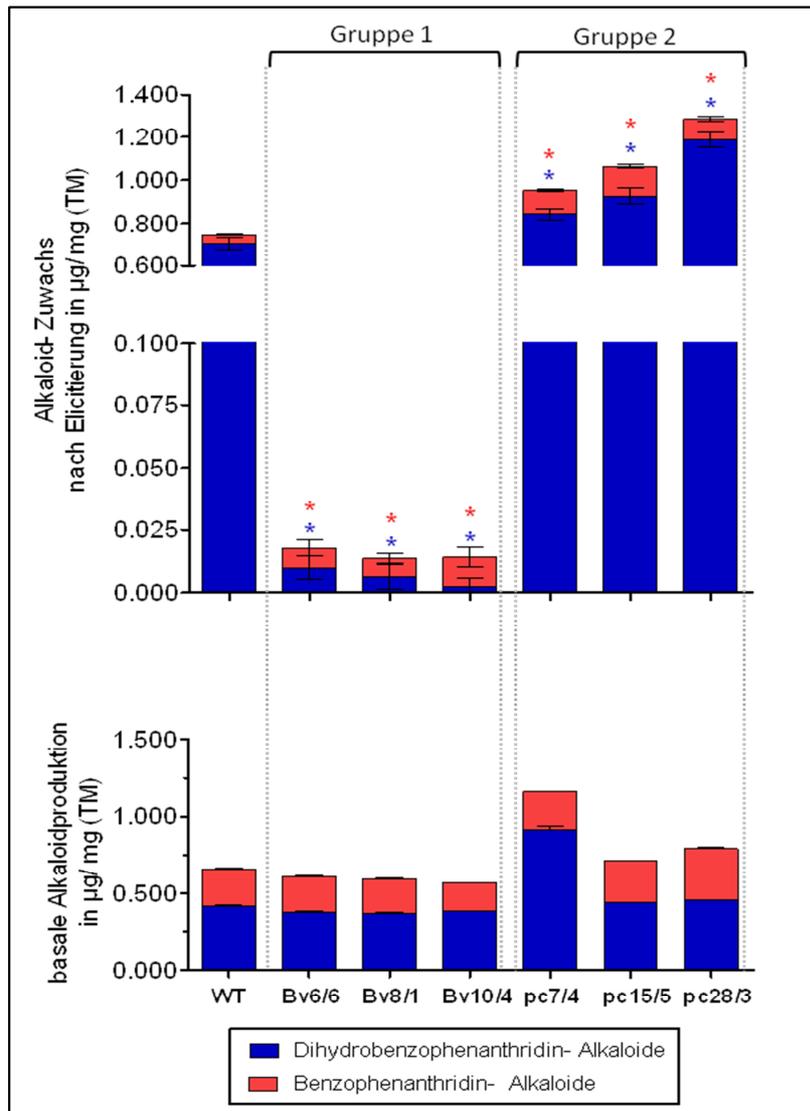
**Abbildung 36: Funktionstest der vakuolären NHX-Transporter in NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica***

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellkultur wurde mit 5mM MgATP versetzt und der vakuoläre pH nach Zugabe verschiedener  $Na^+$ -Konzentrationen gemessen (siehe Kap.2.10). Daten sind Änderungen der  $H^+$ -Konzentration pro Zeit (in  $\mu M/min$ ), gemessen als  $[H^+]$ -Ausstrom aus der Vakuole ( $[H^+]$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen Vakuole und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $H^+$ -Gradient in  $\mu M$ ). Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus 12 gleichberechtigten Messungen dar ( $n=12, \pm SD$ ). Gruppe 1: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen, Gruppe 2: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1).

### 3.5 Der Signaltransfer zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese in Zellkulturen mit RNAi-vermitteltem silencing der vakulären NHX-Antiporter

#### 3.5.1 Elicitor-ausgelöste Alkaloid-Produktion

Wie aus Abb.37 ersichtlich, zeigen NHX-silencing Transformanten der Gruppe 1 im Vergleich zum Wildtyp eine drastisch verringerte Alkaloid-Antwort auf den Elicitor-Kontakt. Die basale, nicht-induzierte Alkaloid-Bildung bleibt dagegen unverändert, d.h. die Zellen sind weiterhin grundsätzlich zur Alkaloid-Biosynthese in der Lage. Dagegen ist die Elicitor-ausgelöste Alkaloid-Bildung der NHX-silencing Transformanten der Gruppe 2 mindestens auf dem Niveau des Wildtyps. bzw. in zwei Fällen sogar erhöht. Diese Daten zeigen, dass die Absenkung der Menge an NHX-Antiportern die Elicitor-ausgelöste Überproduktion der Alkaloide herabsetzt und sprechen damit für eine essentielle Rolle dieser Transporter im Signaltransfer.



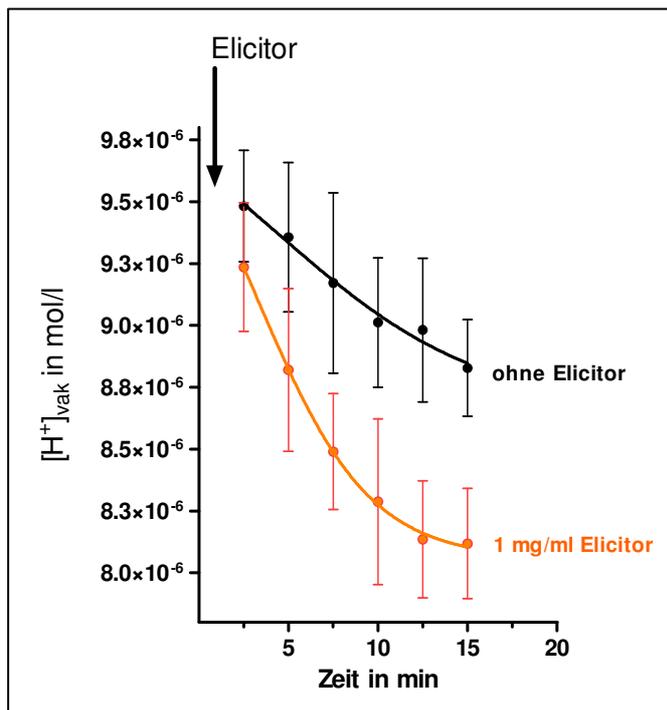
**Abbildung 37: Elicitor-ausgelöste Alkaloid-Produktion in NHX-silencing Transformanten von *Eschscholzia californica***

Die Zellkulturen wurden 30 min mit Elicitor (1 µg/ml) behandelt und die Alkaloid-Konzentration nach 48h fluorimetrisch bestimmt (siehe Kap.2.10.2). Messwerte sind Mittelwerte aus 8 gleichberechtigten Messungen (n=8, ± SD). (\*) signifikante Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (WT) (p<0,05).

Gruppe 1: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen; Gruppe 2: mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1); TM: Trockenmasse.

### 3.5.2 Messung des Elicitor-ausgelösten $H^+$ -Efflux in NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica*

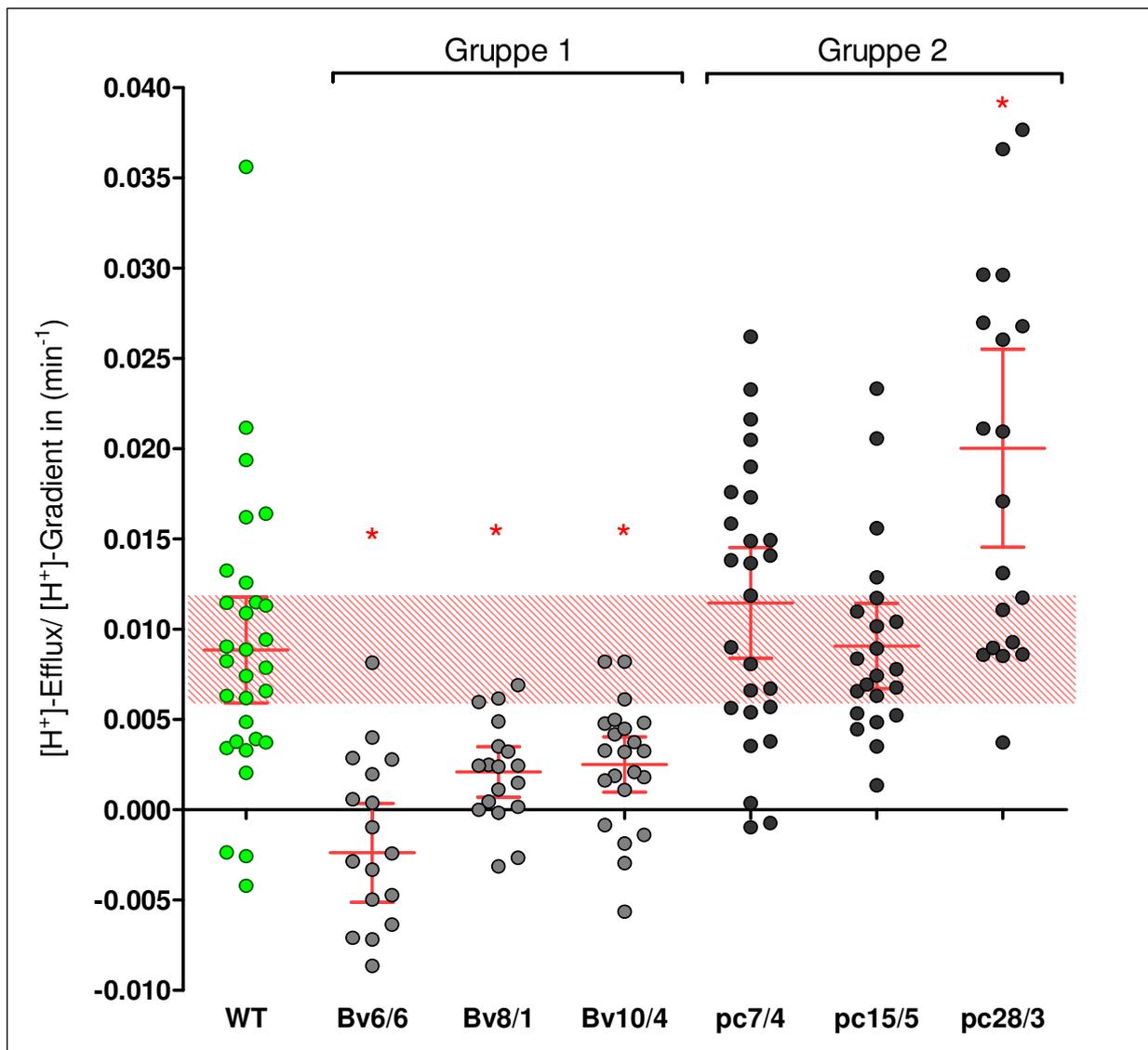
Vom Wildtyp ist bereits bekannt, dass die durch den Elicitor bewirkte Überexpression der Biosynthese-Enzyme welche zur Überproduktion der Benzophenanthridin-Alkaloide führt, durch einen Efflux vakuolärer Protonen ausgelöst wird (Roos et al., 1998). In dieser Arbeit konnte der Elicitor-ausgelöste Protonenefflux aus der Vakuole erstmals in Suspensionen intakter Zellen gemessen werden (siehe Abb.38).



**Abbildung 38:**  
Elicitor-ausgelöster Efflux vakuolärer Protonen in intakten Zellen von *Eschscholzia californica*

Zellkultur des Wildstammes wurde mit 5-Carboxyfluoreszein beladen und die vakuoläre  $H^+$ -Konzentration über den angegebenen Zeitraum nach Elicitor-Zugabe ( $\downarrow$ ) von  $1\mu\text{g/ml}$  gemessen (siehe Kap.2.10.2). Daten sind Mittelwerte aus 8 gleichberechtigten Messungen ( $n=8, \pm \text{SD}$ ).

Im Folgenden wurde geprüft, ob die ausbleibende Alkaloid-Antwort der NHX-silencing Mutanten der Gruppe 1 ihre Ursache in dem fehlenden oder verringerten  $H^+$ -Efflux hat. Abb.39 zeigt den nach Elicitorkontakt erwarteten  $H^+$ -Efflux in intakten Zellen des Wildtyps. Dieser fehlt in allen Zellstämmen der Gruppe 1. Die Stämme der Gruppe 2 dagegen reagieren wie der Wildtyp bzw. zeigen eine etwas höhere Aktivität. Trotz der bemerkenswerten Variabilität der Einzelproben (Details siehe Kap.2.10) ist sowohl der stimulierende Effekt der Elicitor-Behandlung, als auch das silencing der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter signifikant messbar. Die Parallelität dieses Befundes mit der fehlenden Elicitierung der Alkaloid-Biosynthese (s.o), belegt die essentielle Rolle der vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter und des durch sie ermöglichten Protonenefflux im Elicitor-ausgelösten Signaltransfer.

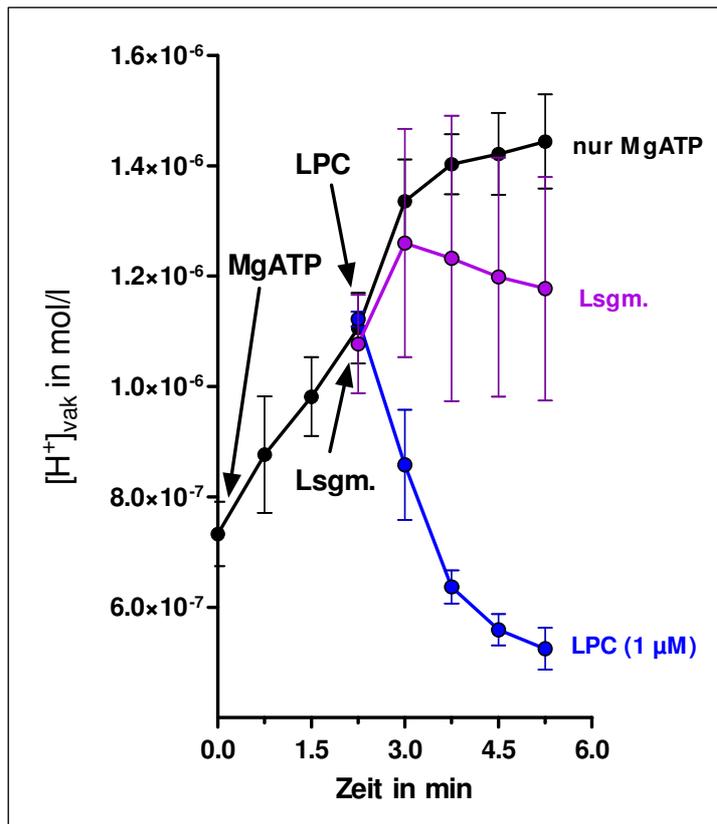


**Abbildung 39: Elicitor-ausgelöster  $H^+$ -Efflux in NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica***

Zellsuspensionen der genannten Zellstämme wurden mit 5-Carboxyfluoreszein beladen, mit Hefe-Elicitor ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) versetzt und die vakuoläre  $H^+$ -Konzentration über einen Zeitraum von 15 min bei einer externen  $\text{Na}^+$ -Konzentration von  $5\text{mM}$  gemessen (siehe Kap.2.10.2). Parallel wurde für jeden Zellstamm eine Elicitor-freie und in gleicher Weise behandelte Zellsuspensionen gemessen. Daten sind Änderungen der vakuolären  $H^+$ -Konzentration pro Zeit ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) nach Elicitor-Zugabe, gemessen als  $H^+$ -Ausstrom aus der Vakuole ( $H^+$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen Vakuole und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $[H^+]$ -Gradient in  $\mu\text{M}$ ). Die aus den Elicitor-freien Ansätzen ermittelten Werte wurden davon subtrahiert. Die einzelnen Messwerte stammen aus 16-24 gleichberechtigten Messungen. Sie werden durch Mittelwert und Konfidenzintervall ( $n=16-24$ , 95 %) charakterisiert und sind durch rote Linien gekennzeichnet. Das Konfidenzintervall des Wildtyps (WT) ist rot schraffiert dargestellt. (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (grüne Punkte) mit  $p < 0,05$ . Gruppe 1 (hellgraue Punkte): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen, Gruppe 2 (dunkelgraue Punkte): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1).

### 3.5.3 LPC-vermittelter $H^+$ -Efflux in NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica*

Die im vorigen Experiment gezeigte Stimulation der  $Na^+/H^+$ -Antiporter nach Elicitor-Kontakt wird in intakten Zellen des Wildtyps durch das von der Phospholipase  $A_2$  produzierte Signalmolekül LPC vermittelt (Viehweger et al., 2002, 2006). Dieser Befund beruht bis dato auf Messungen an *in situ* Vakuolen von Einzelzellen und konnte hier ebenfalls in Suspensionen permeabilisierter Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb.40).



**Abbildung 40:**

#### Wirkung von LPC auf *in situ* Vakuolen von *Eschscholzia californica*

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellsuspension des Wildstammes wurde mit 5 mM MgATP versetzt und die vakuoläre  $H^+$ -Konzentration gemessen (siehe Kap.2.10.2). Zum angezeigten Zeitpunkt ( $\downarrow$ ) erfolgte die Zugabe von 1  $\mu$ M Lysophosphatidylcholin (LPC) in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1:1) bzw. einer äquivalenten Menge Lösungsmittel-Gemisch ohne LPC (Lsgm.). Daten sind Unterschiede der  $H^+$ -Konzentration zur MgATP-haltigen Vergleichprobe ohne Zusatz (nur MgATP). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 gleichberechtigten Messungen ( $n=3$ ,  $\pm$  SD).

Die Verfügbarkeit von NHX-silencing Mutanten erlaubte erstmals in einer Zellsuspension zu prüfen, ob die NHX-Transporter von *Eschscholzia californica* durch LPC simulierbar sind. Das in Abb.41 dargestellte Ergebnis zeigt eine Parallele zu den durch Elicitor ausgelösten  $H^+$ -Fluxen: LPC bewirkt einen deutlichen Efflux vakuolärer Protonen im Wildtyp, nicht aber in den NHX-silencing Mutanten der Gruppe 1. Dagegen ist LPC in den Stämmen der Gruppe 2 ähnlich oder stärker wirksam als im Wildtyp. Die Variabilität der  $H^+$ -Fluxe zwischen den Einzelproben ist vergleichbar mit dem vorher gezeigten Elicitor-Experiment, d.h. die Signifikanz der messbaren Unterschiede ist gewährleistet.

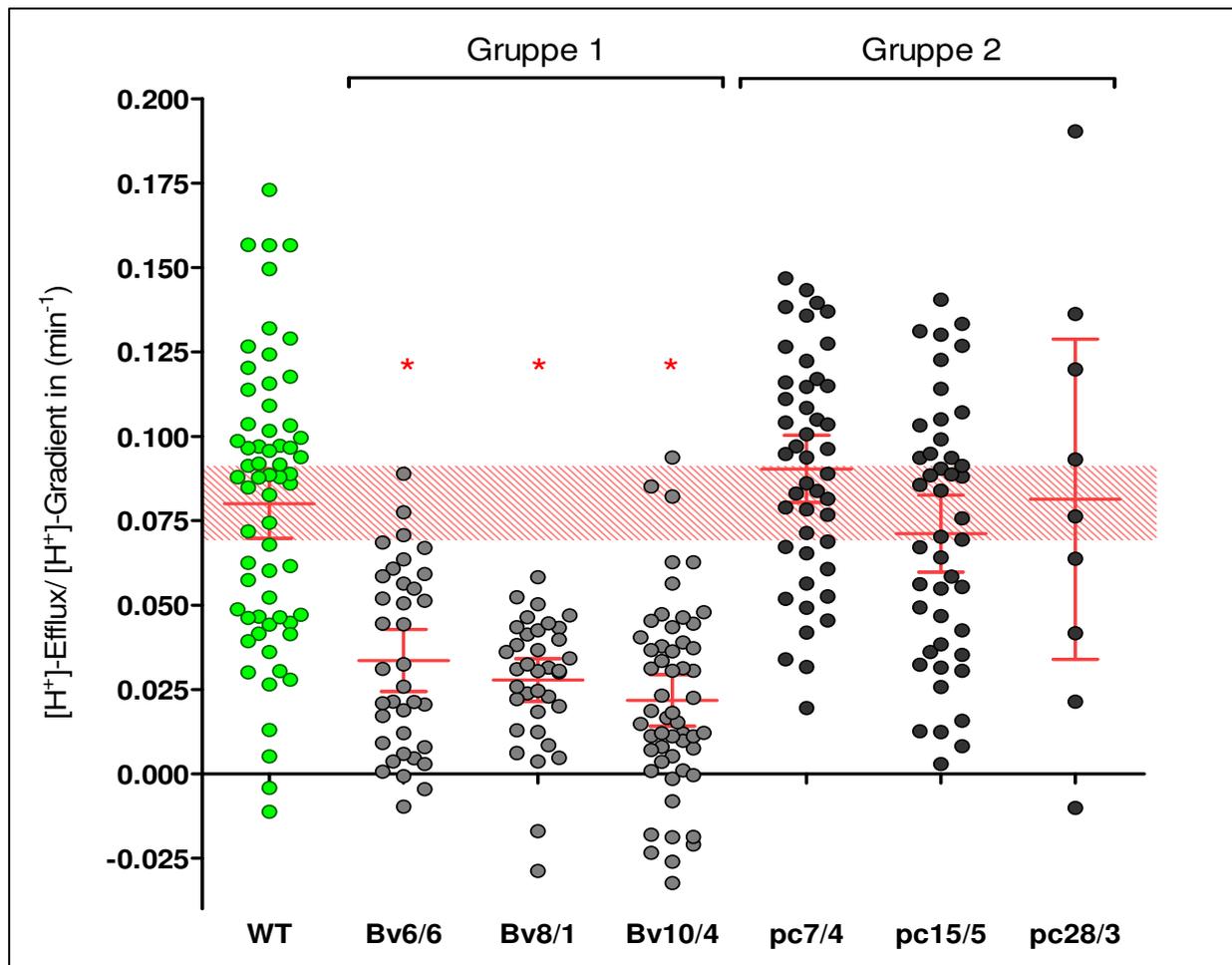


Abbildung 41: LPC- vermittelter Efflux vakuolärer Protonen in transgenen Zellstämmen von *Eschscholzia*

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellsuspensionen wurden mit 5 mM MgATP versetzt und die vakuoläre  $H^+$ -Konzentration fluorimetrisch gemessen (siehe Kap.2.10.2). Die externe  $Na^+$ -Konzentration betrug 5 mM. Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 1  $\mu$ M Lysophosphatidylcholin (LPC). Parallel wurden anstelle von LPC mit Lösungsmittel (Lsgm.) behandelte Zellsuspensionen gemessen. Die Daten sind Änderungen der vakuolären  $H^+$ -Konzentrationen pro Zeit ( $\mu$ M/min) nach LPC-Zugabe, gemessen als  $H^+$ -Ausstrom aus der Vakuole ( $H^+$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen Vakuole und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $[H^+]$ -Gradient in  $\mu$ M). Die aus den LPC-freien Ansätzen (Lsgm.) ermittelten Werte wurden davon subtrahiert. Die einzelnen Messwerte stammen aus 24-48 gleichberechtigten Messungen und sind durch Mittelwert und Konfidenzintervall ( $n=24-48$ , 95 %) charakterisiert. Das Konfidenzintervall des Wildtyps (WT) ist rot schraffiert dargestellt. (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (grüne Punkte) mit  $p < 0,05$ . Gruppe 1 (hellgraue Punkte): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.1 transformierte Zellen, Gruppe 2 (dunkelgraue Punkte): mit RNAi-vermittelnder Zielsequenz Nr.2 transformierte Zellen (siehe Kap.3.4.1).

Die in den letzten Experimenten gewonnenen Daten (Abb.37, 39 und 41) belegen die essentielle Rolle der  $Na^+/H^+$ -Antiporter im Elicitor-ausgelösten Signaltransfer zur Expression des Alkaloid-Stoffwechsels. Der Verlust an Kapazität des  $Na^+/H^+$ -Antiports führt sowohl zum Fehlen des Elicitor- bzw. LPC-ausgelösten vakuolären Protonenefflux als auch zur fehlenden Überproduktion der Alkaloide; letzteres ist ein Mass für die Expression der Rate-limitierenden Enzyme (Angelova et al. 2010).

Die bisher verwendete Strategie zur Aufklärung der NHX-Funktionen basierte auf dem knockdown möglichst vieler bzw. aller NHX-Transporter. Sie erlaubte keine Aussage, welche der NHX-Isoformen durch LPC-aktivierbar und damit am Signaltransfer beteiligt sind. Eine selektive Analyse ist wegen der hohen Ähnlichkeit der Isoformen über den Weg des gene silencing nur mit hohem Aufwand möglich. Selbst bei erfolgreicher selektiver Ausschaltung einer Antiporter-Spezies würde die Analyse auf der Aktivitätsebene wahrscheinlich durch die verbleibenden Isoformen gestört. Deshalb erfolgte die Suche nach LPC-sensitiven Isoformen über die heterologe Expression einzelner NHX-Gene in Hefezellen.

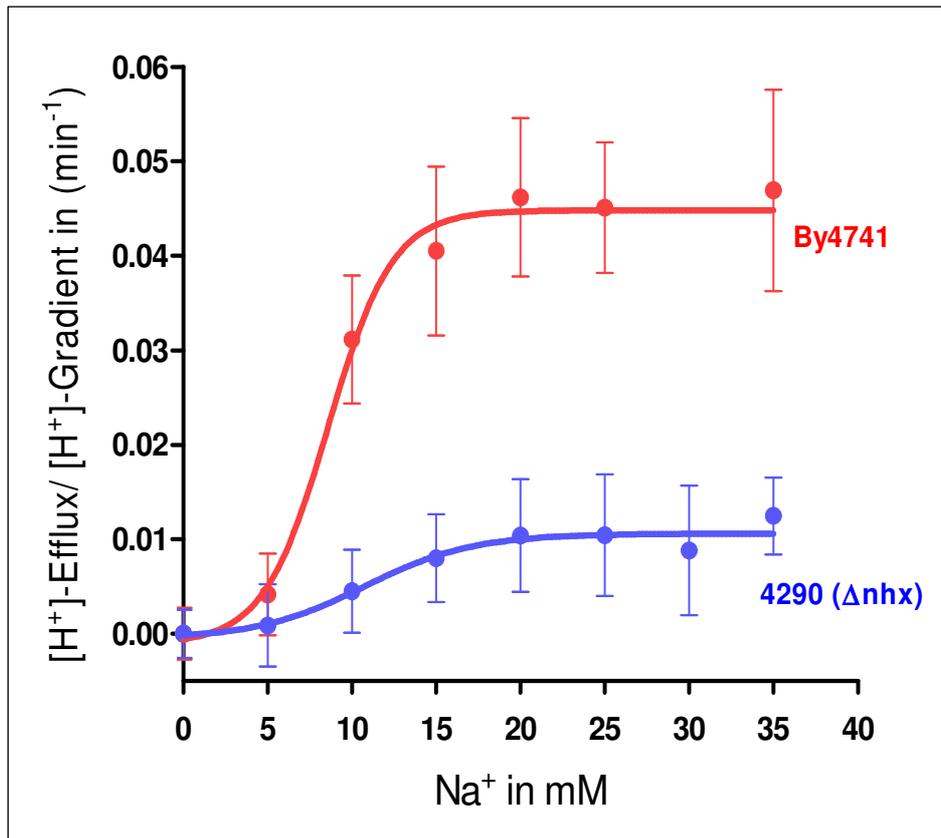
### 3.6 Heterologe Expression von EcNHX-Antiporter in Hefezellen

#### 3.6.1 Ausgangspunkte

Die Expression einzelner EcNHX-Gene in Hefezellen erfolgte mit Hilfe eines Vektors, der das NHX-Gen unter die Kontrolle des mit Galaktose induzierbaren GAL1-Promotors stellte (siehe Kap.2.8.23). Um Störungen durch  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter der Hefe zu vermeiden, wurde die funktionelle Komplementation einer  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante angestrebt (siehe Kap.1.3.5). Dazu erwies sich in Vorversuchen die Deletionsmutante 4290 des *Saccharomyces*-Stammes By4741 als geeignet, da sie folgende Eigenschaften aufweist:

1. Permeabilisierbarkeit der Plasmamembran durch das auch in *Eschscholzia californica* verwendete Verfahren (siehe Kap.2.10.4).
2. ausreichende Akkumulation des pH-Indikators 5-Carboxyfluoreszein in den Vakuolen (siehe Kap.2.10.4)
3. Der Stamm By4741 zeigt einen gut messbaren,  $\text{Na}^+$ -getriebenen Efflux vakuolärer Protonen. Dabei tritt eine ähnliche Abhängigkeit von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration auf wie in *in situ* Vakuole von *Eschscholzia californica* (siehe Abb.10, Viehweger et al., 2002). Diese  $\text{Na}^+$ -abhängige pH-Änderung ist in der  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante (4290) nahezu vollständig ausgeschaltet (siehe Abb. 42)

Die Deletionsmutante 4290 ( $\Delta\text{nhx}$ ) bietet aufgrund der vorgestellten Eigenschaften einen geeigneten Hintergrund für die Expression und Charakterisierung der aus *Eschscholzia californica* stammenden  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter. Die dabei erzeugten rekombinanten Hefe-Stämme sind in Kap.2.8.23.4 aufgelistet.



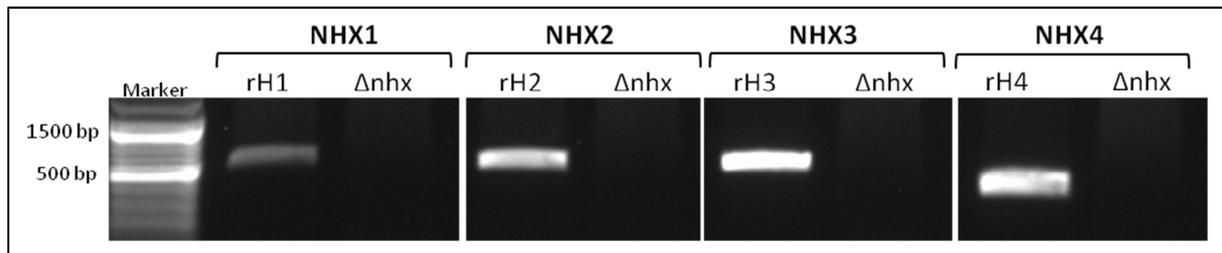
**Abbildung 42: Funktionstest des genuinen NHX-Transporters von *Saccharomyces cerevisiae***

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Zellsuspensionen (siehe Kap.2.10.4) des **By4741**-Stammes (mit genuinem ScNHX1-Transporter) und dessen  $\Delta nhx$ -null-Mutante (**4290**) wurden mit 5 mM MgTAP versetzt und die vakuoläre/provakuoläre  $H^+$ -Konzentration nach Zusatz verschiedener  $Na^+$ -Konzentrationen fluorimetrisch gemessen (siehe Kap.2.10.2). Daten sind Änderungen der vakuolären/provakuolären  $H^+$ -Konzentration pro Zeit ( $\mu M/min$ ) nach  $Na^+$ -Zusatz, gemessen als  $H^+$ -Ausstrom aus den vakuolären/provakuolären Kompartimenten ( $H^+$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen vakuolären/provakuolären Kompartimenten und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $[H^+]$ -Gradient in  $\mu M$ ). Die aus einer  $Na^+$ -freien Vergleichprobe ermittelten Werte wurden davon subtrahiert. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus 12 gleichberechtigten Messungen dar ( $n=12, \pm SD$ ).

### 3.6.2 Nachweis der heterologen Expression von EcNHX-Transportern in rekombinanten Stämmen der $\Delta nhx$ -Nullmutante

#### 3.6.2.1 Nachweis der NHX-Transkripte von *Eschscholzia californica* im Transkriptom rekombinanter Hefestämme

Wie aus Abb.43 hervorgeht, ermöglichte der durch Galaktose induzierte Promotor (GAL1) die kontrollierte Expression aller EcNHX-ORF's in den vier rekombinanten Hefestämmen. Die höchsten Expressionslevel an heterologen Transkripten wurden für EcNHX3 und 4 festgestellt.



**Abbildung 43: Expression der EcNHX1-4 Transkripte in rekombinanten Hefestämmen (rH1-4)**

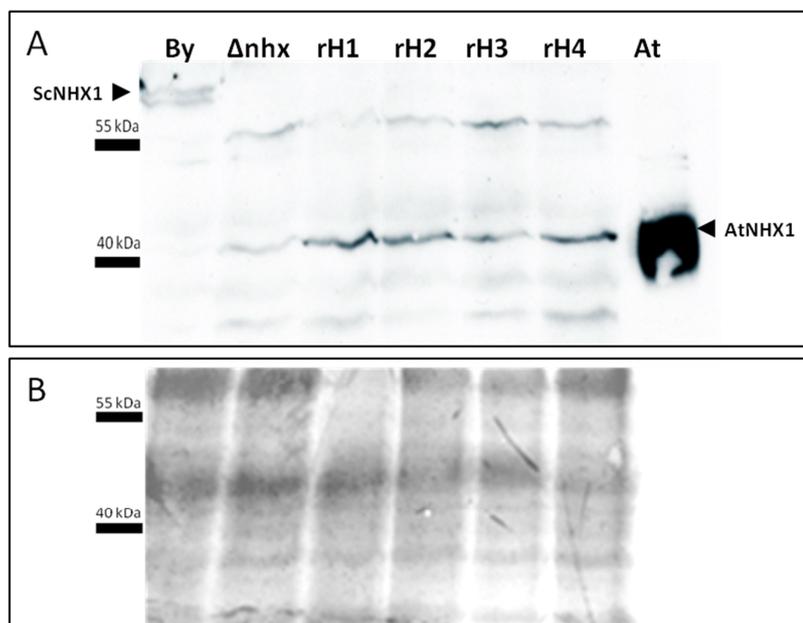
Isoformspezifische RT-PCR unter Verwendung gleicher Mengen cDNA aus rekombinanten Hefestämmen (zur selektiven Expression des NHX1/2/3/4-Gens aus *Eschscholzia californica*) und der  $\Delta nhx$ -Nullmutante (4290) aus *Saccharomyces cerevisiae* nach vorheriger Induktion der EcNHX-Expression durch Galaktose. Zum Nachweis gleicher Mengen cDNA diente das Histon H1 (Details siehe Kap.2.8.7).  $\Delta nhx$ :  $\Delta nhx$ 1-Nullmutante (4290), **rH1-4**: rekombinante  $\Delta nhx$ 1-Nullmutante, mit der hinzugewonnenen Fähigkeit zur selektiven Expression eines aus *Eschscholzia californica* stammenden NHX-Gens (NHX1/2/3/oder 4).

### 3.6.2.2 Nachweis der EcNHX-Proteine in rekombinanten Hefestämmen

In den transformierten Hefestämmen erwies sich der immunologische Nachweis der NHX-Proteine als erfolgreich. Dazu wurde die Membranfraktion der rekombinanten Hefestämme isoliert und die NHX-Proteine nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem gegen das AtNHX1-Protein von *Arabidopsis thaliana* gerichteten Antiserum (siehe Kap.2.9.8) nachgewiesen. Dieses Antiserum erlaubte zwar in der Tonoplastenfraktion von *Eschscholzia californica* keine klare Detektion der NHX-Proteine (siehe Anhang 7.11), vor dem Hintergrund der Hefe-Membranproteine wurden jedoch eindeutig Banden im erwarteten Größenbereich erkannt (siehe Abb.44). Dies spricht für eine Expression der NHX-Proteine aus *Eschscholzia californica* in den transformierten Hefezellen.

**Abbildung 44:**  
**Western blot zum Nachweis der EcNHX1-4 Proteine nach heterologer Expression in Hefe**

**A:** Die Expression der NHX-Proteine aus *Eschscholzia californica* wurde mit 2 %igem Galaktose-haltigen Medium für eine Dauer von 4 Stunden induziert (siehe Kap.2.8.23.3) und die Gesamtheit aller Membranproteine isoliert (siehe Kap.2.9.1). Jeweils 30  $\mu$ g Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE getrennt (siehe Kap.2.9.4) und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die immunologische Detektion der NHX-Proteine erfolgte mit einem anti-AtNHX1-Antiserum (siehe Kap.2.9.7) Als interne Kontrolle diente das in 5  $\mu$ g



Tonoplastenprotein aus *Arabidopsis thaliana* (**At**) detektierte AtNHX1-Protein ( $\blacktriangleleft$ AtNHX1). **By:** By4741-Hefestamm mit genuinem NHX-Protein (**ScNHX1**  $\blacktriangleright$ ),  $\Delta nhx$ :  $\Delta nhx$ 1-Nullmutante (4290), **rH1-4**: rekombinante  $\Delta nhx$ 1-Nullmutante, mit der hinzugewonnenen Fähigkeit zur selektiven Expression eines aus *Eschscholzia californica* stammenden NHX-Gens (NHX1/2/3/oder 4).

**B:** Ponceau-Färbung zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen (siehe Kap.2.9.6).

### 3.6.2.3 Funktionstest der rekombinanten NHX-Proteine aus *Eschscholzia californica* in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Funktion der rekombinanten NHX-Antiporter aus *Eschscholzia californica* in Hefe wurde durch die bereits in der pflanzlichen Zellkultur bewährte Messung der  $\text{Na}^+$ -abhängige Änderung der vakuolären  $\text{H}^+$ -Konzentration, untersucht (siehe Kap.3.4.3.2). Zuvor wurde das Protokoll zur Permeabilisierung der Plasmamembran und zum Beladen der Vakuole mit 5-Carboxyfluoreszein auf die Besonderheiten der Hefezelle angepasst (siehe Kap.2.10.4). Aus Abb.45 geht hervor, dass mit dem hier entwickelten Verfahren, der vakuoläre  $\text{H}^+$ -Efflux auch in den transformierten und permeabilisierten Hefezellen quantifiziert werden kann. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante (4290) gegenüber dem Wildstamm (By4741) einen sehr geringen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Protonenefflux aufweist (siehe Abb.42). Dieser Unterschied konnte durch die Expression der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus *Eschscholzia californica* ganz oder teilweise kompensiert werden. Daraus folgt, dass die pflanzlichen NHX-Transporter in Hefe nicht nur auf Gen- und Proteinebene exprimiert werden, sondern auch prinzipiell ein korrektes targeting zu den vakuolären Kompartimenten der Hefezelle erfahren. Damit standen für die abschließenden Untersuchungen zur Wirksamkeit von LPC vier Hefestämme zur Verfügung, die jeweils einen der vier vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus *Eschscholzia californica* als rekombinantes, funktionsfähiges Protein enthielten.

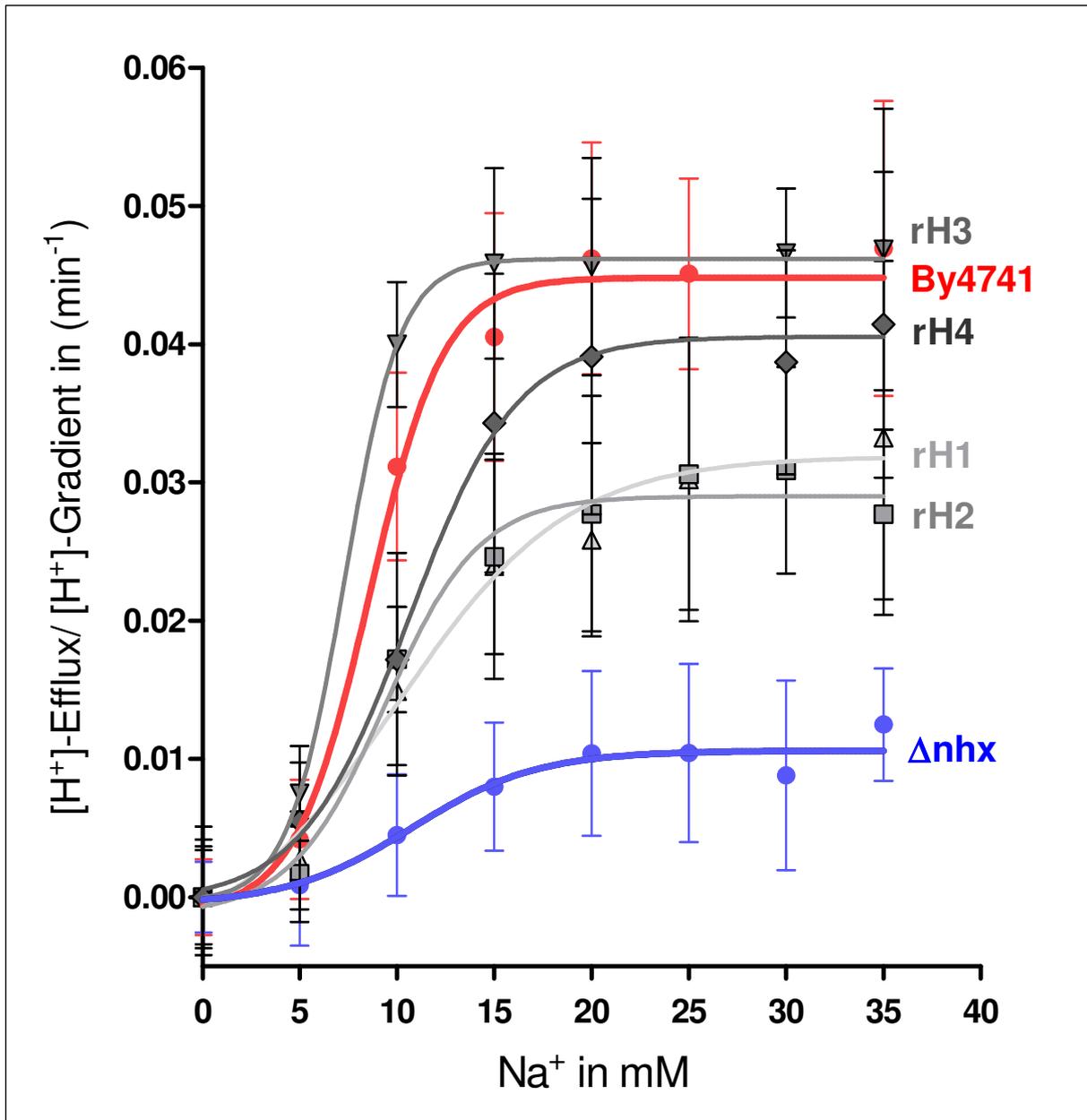


Abbildung 45: Funktionstest der vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus *Eschscholzia californica* in rekombinanten Hefestämmen von *Saccharomyces cerevisiae*

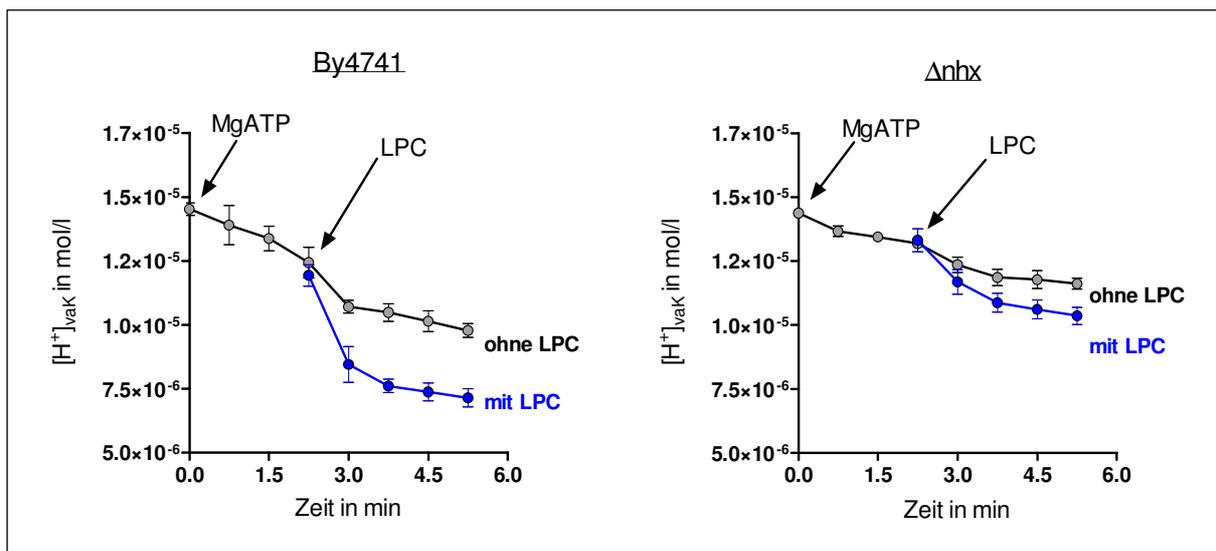
Die Expression EcNHX-Gene in den rekombinanten Hefestämmen wurde zunächst durch Galaktose induziert (siehe Kap.2.8.23.3). Die Zellsuspensionen wurden mit 5-Carboxyfluoreszein beladen, die Plasmamembranen permeabilisiert (siehe Kap.2.10.3) und nach Zusatz von 5 mM MgATP, die vakuoläre  $\text{H}^+$ -Konzentration nach Zusatz verschiedener  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen gemessen (siehe Kap.2.10.2). Daten sind Änderungen der vakuolären  $\text{H}^+$ -Konzentration pro Zeit ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) nach  $\text{Na}^+$ -Zusatz, gemessen als  $\text{H}^+$ -Ausstrom aus den vakuolären/provakuolären Kompartimenten ( $\text{H}^+$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen vakuolären/provakuolären Kompartimenten und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $[\text{H}^+]$ -Gradient in  $\mu\text{M}$ ). Die aus der  $\text{Na}^+$ -freien Vergleichsprobe ermittelten Werte wurden davon subtrahiert. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus 12 gleichberechtigten Messungen dar ( $n=12$ ,  $\pm$  SD). **By4741**: Wildtyp-Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit genuinem ScNHX1, **Δnhx**: zum By4741-Hefestamm zugehörige Δnhx1-Nullmutante (4290), **rH1-4**: rekombinante Δnhx1-Nullmutante, mit der hinzugewonnenen Fähigkeit zur selektiven Expression eines aus *Eschscholzia californica* stammenden NHX-Gens (NHX1 (  $\Delta$ )/2 (  $\square$ )/3 (  $\nabla$ )/oder 4 (  $\blacklozenge$ )).

### 3.6.3 Reaktion der rekombinanten EcNHX-Antiporter auf LPC

Abschließend wurde geprüft, welcher der rekombinant exprimierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus *Eschscholzia californica* durch LPC stimulierbar ist.

Dazu wurden zunächst Vorversuche mit dem verwendeten Hefestämmen By4741 und seiner  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante (4290) durchgeführt, um nicht-toxische Konzentrationen an LPC zu ermitteln und auszuschließen, dass LPC in Hefezellen einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Verlust von  $\text{H}^+$  aus der vakuolären/provakuolären Kompartimenten auslöst. Dabei wurde bereits berichtet, dass im verwendeten Stamm By4741 nach  $\text{Na}^+$ -Zusatz ein Efflux von Protonen messbar ist (siehe Abb.42).

Ausgangspunkt für die Untersuchung von rekombinanten Hefestämmen war die Feststellung, dass LPC in der als Wirtszelle dienenden  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante keinen bzw. nur einen geringen  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{H}^+$ -Efflux auslöst. Im Wildstamm (By4741) ist dagegen deutlicher Effekt von LPC nachweisbar (siehe Abb.46). Offenbar ist auch der genuine  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter der Hefe (ScNHX1) durch LPC stimulierbar, was für einen zwischen Pflanze und Pilz konservierten Wirkort spricht.

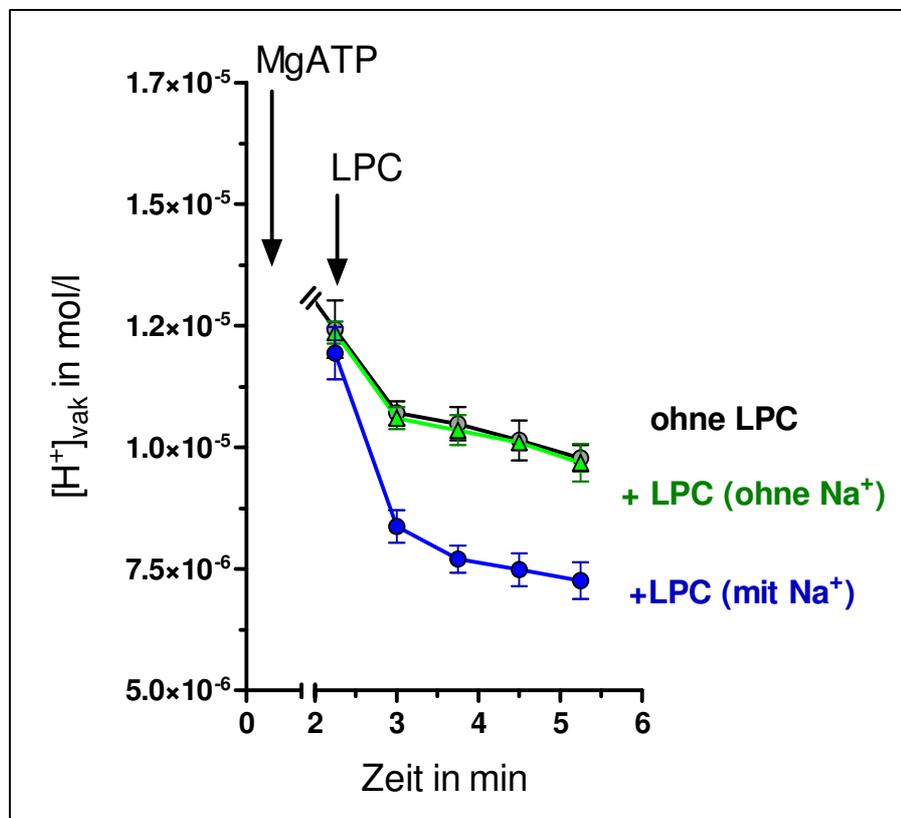


**Abbildung 46: LPC-vermittelter Protonenefflux in *Saccharomyces cerevisiae***

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte Hefezellen (siehe Kap.2.10.4) wurde unter Anwesenheit von 5 mM  $\text{Na}^+$  mit 5 mM MgATP versetzt und die vakuoläre  $\text{H}^+$ -Konzentration gemessen (siehe Kap.2.10.2). Beim angezeigten Zeitpunkt ( $\downarrow$ ) erfolgte der Zusatz von 2  $\mu\text{M}$  Lysophosphatidylcholin (LPC) in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1:1). Daten sind Mittelwerte aus 3 gleichberechtigten Messungen ( $n=3$ ,  $\pm$  SD) und beschreiben die von der LPC-freien Vergleichsprobe (Zusatz einer äquivalenten Menge Lösungsmittel-Gemisch anstelle von LPC) verschiedenen  $\text{H}^+$ -Konzentrationen nach LPC-Zusatz. By4741: Wildtyp-Hefestamm mit genuinen ScNHX1-Transporter,  $\Delta\text{nhx}$ : zum By4741-Hefestamm zugehörige  $\Delta\text{nhx1}$ -Nullmutante (4290).

Ein Hinweis für die selektive Wirkung von LPC auf die NHX-Transporter ist die  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit des LPC-vermittelten Protonenefflux, d.h. die stimulierende Wirkung von LPC ist nur in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  nachweisbar (siehe Abb.47). Damit kann ausgeschlossen werden, dass unter den hier verwendeten Bedingungen LPC einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Verlust vakuolärer Protonen auslöst, d.h. auf einem anderen Weg als über  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter.

Für den stimulierenden Effekt von LPC auf vakuoläre NHX-Transporter aus *Eschscholzia californica* in Hefe wurden Konzentrationen zwischen 2 und 4  $\mu\text{M}$  als optimal ermittelt. Diese Konzentrationen verursachen weder (wesentlichen) Schäden an der Barrierefunktion des Tonoplasten noch an dessen Energetisierung, was an der andauernden Akkumulation des 5-Carboxyfluoreszeins nachweisbar ist (siehe Kap.2.10.4).

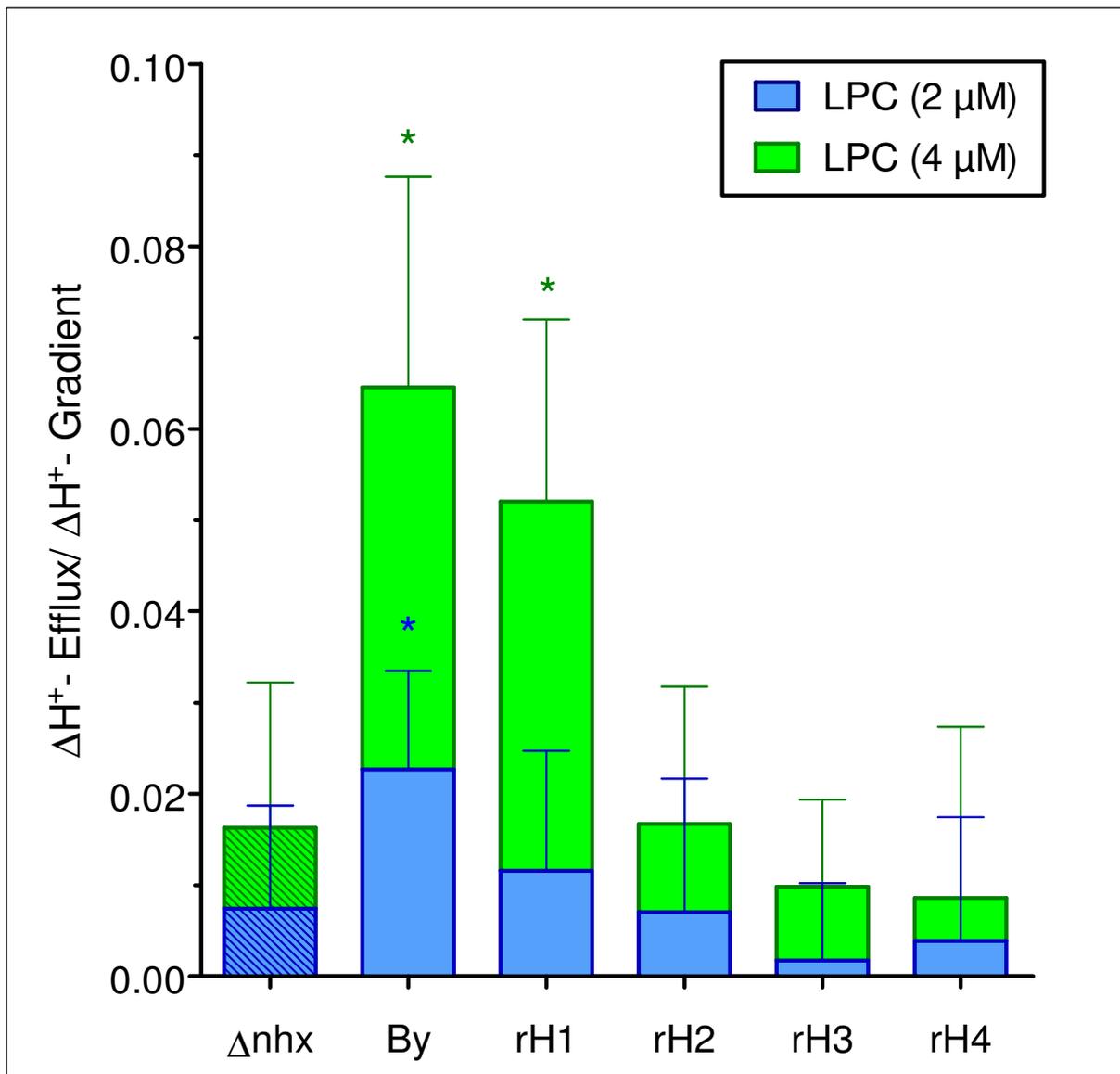


**Abbildung 47:  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit des LPC-vermittelten Protonenefflux in Hefe**

Mit 5-Carboxyfluoreszein beladene und permeabilisierte By4741-Hefezellen (siehe Kap.2.10.4) wurde in  $\text{Na}^+$ -haltiges (**mit 5 mM  $\text{Na}^+$** ) und  $\text{Na}^+$ -freies (**ohne  $\text{Na}^+$** ) ErhaltungsmEDIUM aufgenommen, und nach Zusatz von 5 mM MgATP die vakuoläre/provakuoläre  $\text{H}^+$ -Konzentration fluorimetrisch gemessen (siehe Kap.2.10.2). Beim angegebenen Zeitpunkt ( $\downarrow$ ) erfolgte die Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Lysophosphatidylcholin (**+LPC**) in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1:1). Die Daten stellen Mittelwerte aus 3 gleichberechtigten Messungen dar ( $n=3$ ,  $\pm\text{SD}$ ) und beschreiben die von der  $\text{Na}^+$ -haltigen aber LPC-freien Vergleichsprobe (**ohne LPC**) d.h. unter Zusatz einer äquivalenten Menge Lösungsmittel-Gemisch anstelle von LPC) verschiedenen  $\text{H}^+$ -Konzentrationen nach LPC-Zugabe. By4741: Wildtyp-Hefestamm mit genuinem ScNHX1-Transporter.

Die zur selektiven Betrachtung der vakuolären NHX-Transporter aus *Eschscholzia californica* generierten rekombinanten Hefestämmen zeigen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Reaktion auf LPC. Aus Abb.48 wird deutlich, dass nur in dem mit EcNHX1-transformiertem Hefestamm eine signifikante Stimulation des Protonenefflux durch LPC gegenüber der  $\Delta nhx1$ -Nullmutante nachweisbar ist. Der Unterschied zu den mit EcNHX2, EcNHX3 oder EcNHX4 transformierten Hefezellen ist dagegen nicht signifikant. Damit ist EcNHX1 mit großer Wahrscheinlichkeit der gesuchte Antiporter, welcher den Elicitor-ausgelösten pH-shift zur Induktion der Alkaloid-Biosynthese ermöglicht.

Zugleich spricht der selektive Effekt des LPCs für dessen präzise Interaktion mit dem EcNHX1-Protein und macht unspezifische Wirkungen auf andere Transporter oder Membrankomponenten unwahrscheinlich.



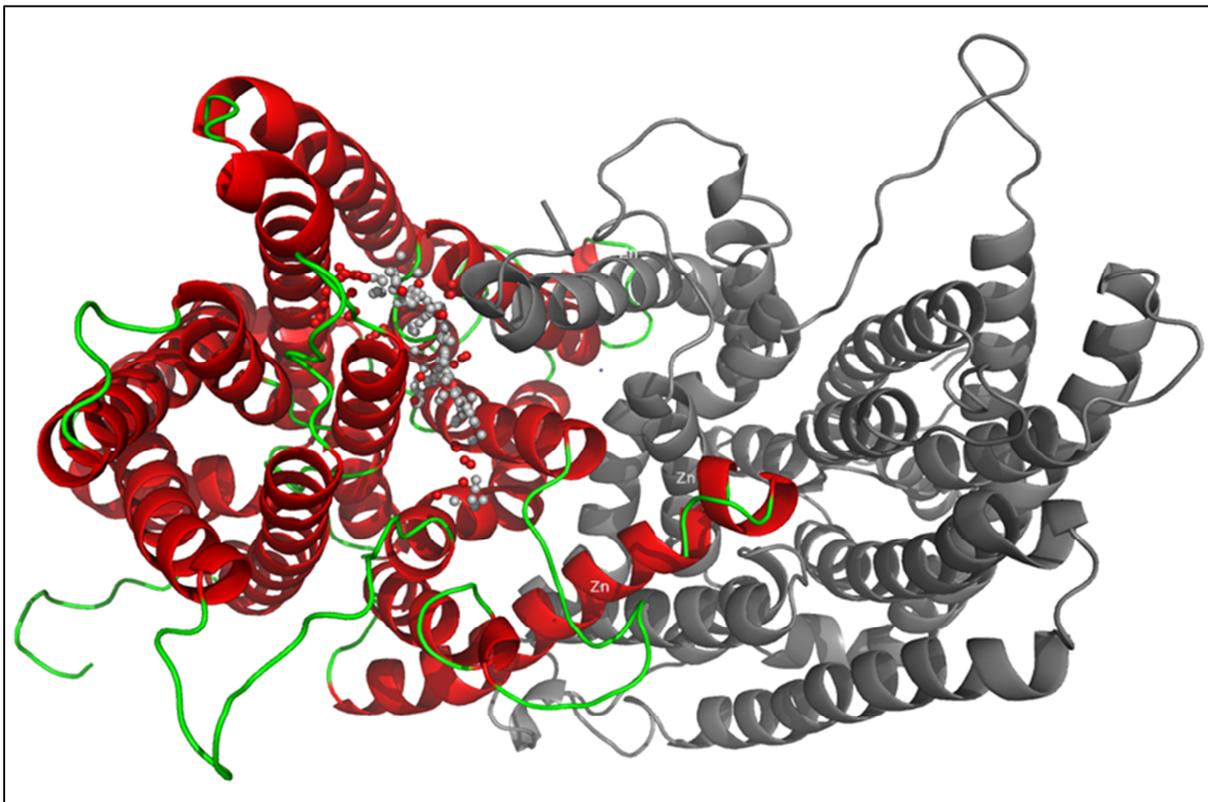
**Abbildung 48: Stimulation der rekombinanten NHX-Transporter aus *Escherichia coli* durch LPC in Hefe**

Die Expression der EcNHX-Transporter in den rekombinanten Hefestämmen (rH1-4) wurde zunächst 4 Stunden durch Galaktose induziert (siehe Kap.2.8.23.3). Die Stämme wurden mit 5-Carboxyfluoreszein beladen, die Plasmamembran permeabilisiert und nach Zusatz von 5 mM MgATP, die vakuolären/provakuolären  $H^+$ -Konzentrationen fluorimetrisch gemessen (siehe Kap.2.10.2). Nach 2 min erfolgte die Zugabe von 2 oder 4  $\mu$ M Lysophosphatidylcholin (LPC) unter Anwesenheit von 5 mM  $Na^+$ . Parallel wurden anstelle von LPC mit Lösungsmittel (Lsgm.) behandelte Zellsuspensionen gemessen. Dargestellt sind Änderung der vakuolären/provakuolären  $H^+$ -Konzentration pro Zeit ( $\mu$ M/min) nach LPC-Zugabe, gemessen als  $H^+$ -Austrom aus den vakuolären/provakuolären Kompartimenten ( $H^+$ -Efflux) und bezogen auf die Protonendifferenz zwischen vakuolären/provakuolären Kompartimenten und Suspensionspuffer zu Beginn der Messung ( $H^+$ -Gradient in  $\mu$ M). Die für die LPC-freien Vergleichsproben (s.o.) ermittelten Werte wurden davon subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 12-16 gleichberechtigten Messungen ( $n=12-16$ ,  $\pm$ SD). (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede gegenüber der  $\Delta nhx$ -Nullmutante (schraffiert) mit  $p < 0,05$ . By: By4741-Hefestamm mit genuinem ScNHX1-Transporter,  $\Delta nhx$ : dem By4741-Hefestamm zugehörige  $\Delta nhx$ -Nullmutante (4290), rH1-4: rekombinante  $\Delta nhx$ -Nullmutante, mit der hinzugewonnenen Fähigkeit zur selektiven Expression eines aus *Escherichia coli* stammenden NHX-Gens (NHX1/2/3/ oder 4).

### 3.7 Struktur der LPC-Bindedomäne (3D modelling)

Die nahezu selektive Stimulierbarkeit des NHX1-Antiporters aus *Eschscholzia californica* durch LPC ließ eine spezifische Bindungsstelle für das Signalmolekül in diesem Membranprotein vermuten, welche in den anderen drei NHX-Proteinen fehlen sollte.

Es wurde daher versucht, 3D-Modelle der NHX-Antiporter aus *Eschscholzia californica* zu erstellen, um docking-Studien mit LPC zu ermöglichen (Kooperation mit Dr. Brandt, IPB Halle). Hierzu wurden die Kristallstrukturdaten des bakteriellen Antiporters NapA von *Thermus thermophilus* als template benutzt (siehe Einleitung 1.3.3). Unter Verwendung der vier, in dieser Arbeit untersuchten NHX-Transkripte aus *Eschscholzia californica* und ihren *in silico* ermittelten Peptidsequenzen, wurden vier 3D-Modelle erstellt von denen EcNHX1 in Abb.49 dargestellt ist.



**Abbildung 49: Homo-dimeres Struktur-Modell des vakuolären NHX1-Antiporters von *Eschscholzia californica* mit potentieller LPC-Bindestelle**

Das Homologie-Modell wurde nach der Kristallstruktur von NapA (4BWZ) aus *Thermus thermophilus* (Lee et al., 2013) erstellt. Das angedockte LPC ist als gepunktete Struktur im linken Monomer (rot) dargestellt.

Bei docking-Studien zeigte das Modell von NHX1 (Abb.51A) eine nahezu ideale Bindungsstelle für LPC mit präzise platzierten Seitenketten für die Fixierung der für LPC typischen Molekülteile, wie:

1. der Phosphat-Gruppe durch K397 und Q266,
2. des quaternären Stickstoffs durch E263,
3. der freien OH-Gruppe durch T400 und
4. der Fettsäure-Kette durch zwei freie Phenylalanin-Reste.

Dagegen erscheint eine Bindung von LPC an die Isoformen EcNHX2-4 aufgrund von Sequenz-Unterschiede in der LPC-Binderegion wenig wahrscheinlich (siehe Abb.50). In NHX3 ist auf Position 266 Glutaminsäure statt Glutamin vorhanden, damit existiert eine starke Salzbrücke zum Lysin 397, wodurch die Bindung von Phosphat unmöglich wird (Abb.51B). Selbst wenn man die Möglichkeit einer Öffnung dieser Ionenbeziehung durch die Phosphat-Gruppe des LPC-Moleküls in Betracht zieht, würde dessen Abstoßung durch Glutaminsäure keine Bindung erlauben.

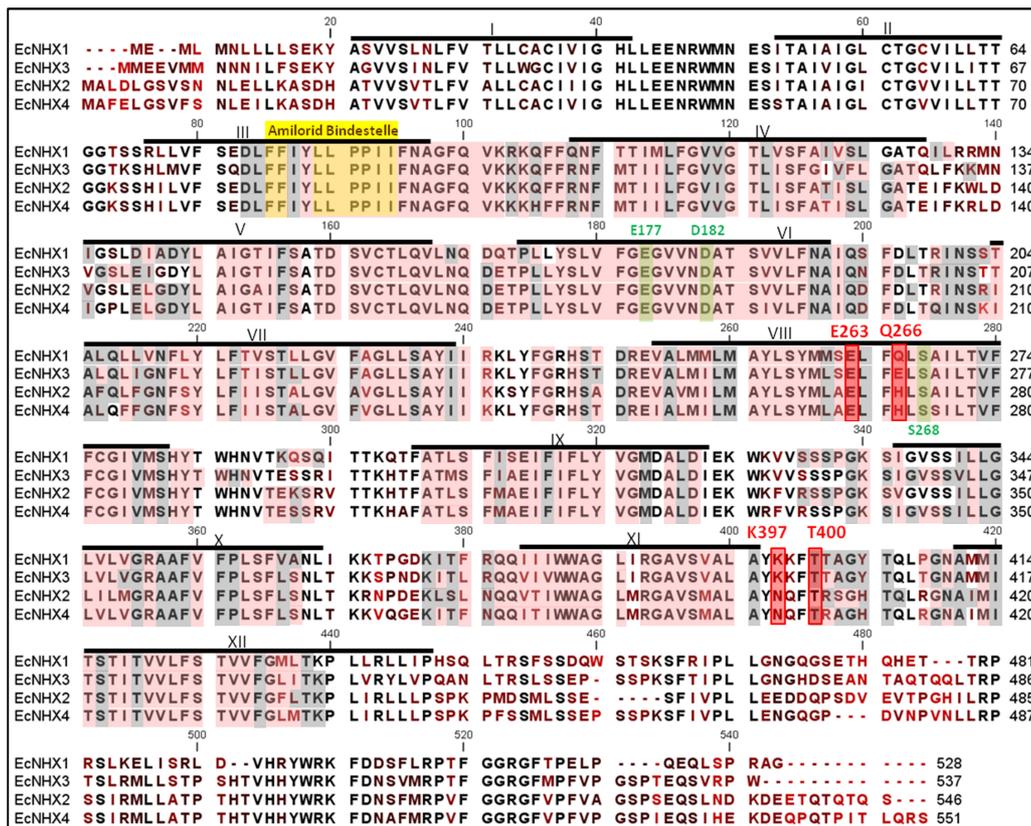
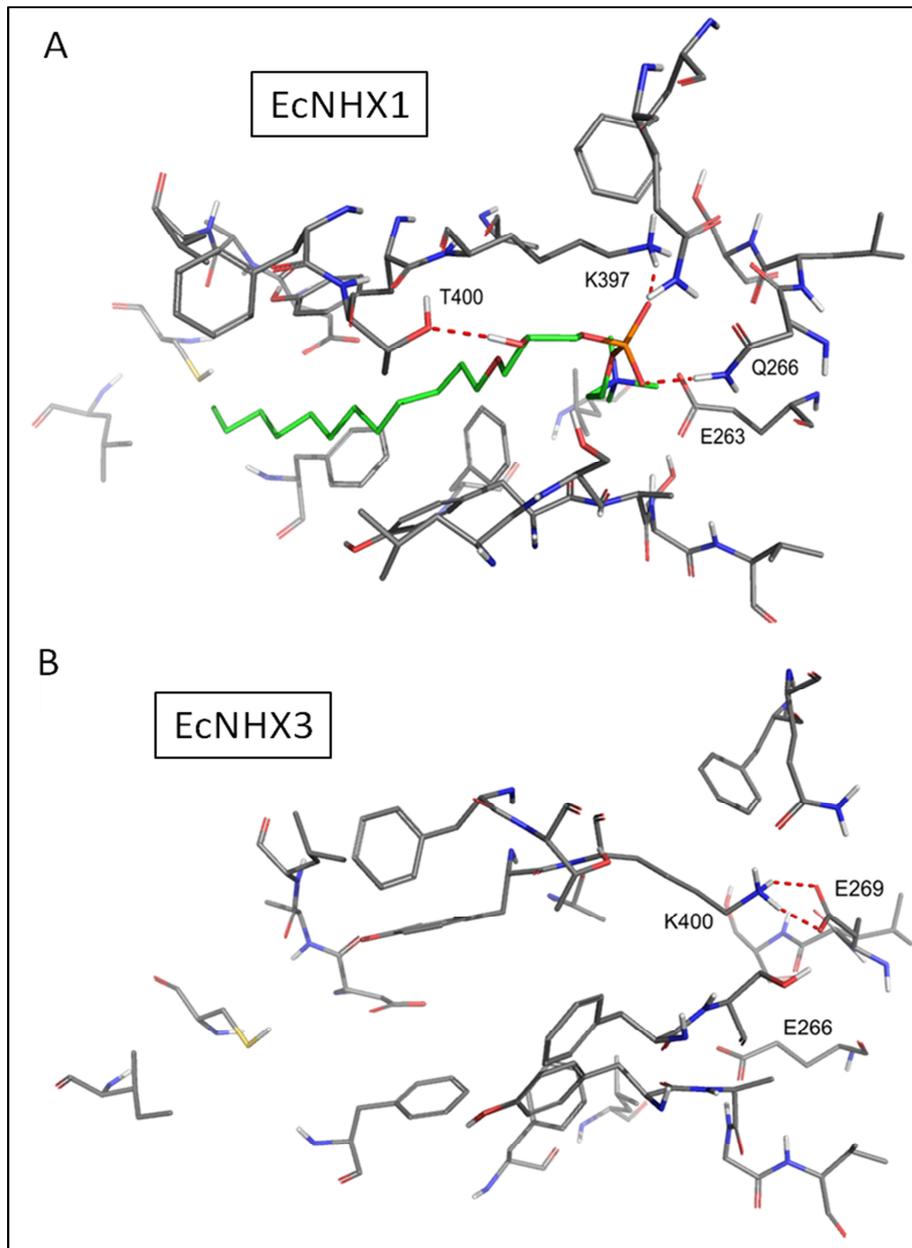


Abbildung 50: Vergleich der potentiellen LPC-Bindedomäne unter den vier NHX-Proteinsequenzen von *Eschscholzia californica*

Die Aminosäuren sind von schwarz (hohe Übereinstimmung) bis dunkelrot (niedrige Übereinstimmung) dargestellt. Die pfam00999 Domäne ist mit rosa (hoch konserviert) und grauen Kästen (wenig konserviert) gekennzeichnet. Die Amilorid-Bindestelle ist mit einem gelben Kasten gekennzeichnet. Die an der Bindung von LPC beteiligten Aminosäurereste (E263, Q266, K397, T400) sind mit roten Kästen gekennzeichnet. Die an der Kationenbindung beteiligten hochkonservierten Aminosäurereste (E177, D182, S268) sind mit grünen Kästen gekennzeichnet.

Bei den Antiportern EcNHX2 und EcNHX4 ist dagegen Lysin an Position 397 durch Asparagin ersetzt, wodurch die Fixierung der Phosphatgruppe durch das Fehlen der kationischen Position unmöglich wird (Abb.50).



**Abb.51:**  
Docking-Modell von LPC in NHX-Transportern von *Escherichia californica*

**A:** Docking von LPC (grüne Kohlenstoffkette) am NHX1-Transporter von *Escherichia californica* (**EcNHX1**).

**B:** Salzbrücke zwischen E269 und K400 im NHX3-Transporter von *Escherichia californica* (**EcNHX3**) verhindert die Erkennung der Phosphat-Gruppe (orange in A).

Die vorgenannten docking-Studien unterstützen damit die physiologischen Daten zur selektiven Stimulation von EcNHX1 durch das Signalmolekül LPC. Das auf einer konservierten Grundstruktur aufgebaute 3D-Modell bestätigt, dass allein EcNHX1 zu einer hochaffinen Bindung von LPC in der Lage ist. Damit sind zumindest einige der ermittelten Sequenzunterschiede zwischen den NHX-Antiportern von entscheidender Bedeutung für die physiologische Funktion.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die NHX-Antiporter von *Eschscholzia californica* und ihre Rolle im pH-ausgelösten Signaltransfer

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen kaum Zweifel daran, dass der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter EcNHX1 aus *Eschscholzia californica* durch LPC stimuliert wird und daraus ein Netto-Efflux vakuolärer Protonen ins Zytoplasma entsteht. Damit wurde auf DNA- und Proteinebene ein zentrales Element des LPC/pH-Signalwegs zur Auslösung der Alkaloid-Biosynthese identifiziert. Die aktuellen Daten fügen sinnvoll in die aus früheren Arbeiten unserer Gruppe charakterisierten Signalschritte ein: der Elicitor-Kontakt an der Plasmamembran aktiviert eine Phospholipase A2 (Heinze et al., 2007, 2013; Viehweger et al., 2006) und löst damit einen transienten peak von LPC aus (Viehweger et al., 2003; Schwartze and Roos, 2008). Dieser second messenger bewirkt nach seiner raschen Diffusion zum Tonoplasten die Stimulation von NHX1 (Weigl et al. in preparation) und damit einen Ausstrom vakuolärer Protonen, die einen transienten pH-Abfall im Zytoplasma bewirken (Roos et al., 1998; Viehweger et al., 2002, 2006).

Die essentielle Rolle des pH-shifts für den Signaltransfer des Alkaloid-Stoffwechsel war bisher nur mit Hilfe experimenteller pH-Änderungen gezeigt worden, welche die Expression des Rate-limitierenden Biosynthese-Enzyms der 4-OMT und die Überproduktion der Alkaloide auslösten (Viehweger et al., 2006; Angelova et al., 2010). Offenbar ist dabei die verbliebene Kapazität von EcNHX1 entscheidend: die NHX-silencing Mutanten der Gruppe 1 zeigen eine deutliche verminderte Expression dieses Antiporters; auch innerhalb dieser Gruppe gibt es einen Zusammenhang zwischen der (geringen) Rest-Aktivität von EcNHX1 und der Elicitierbarkeit der Alkaloid-Biosynthese (Abb. 37).

Die selektive Stimulation von EcNHX1 d.h.nur eines der vier in *Eschscholzia californica* identifizierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter durch LPC wurde in einem „fremden“ genetischen und zellulären Hintergrund, d.h. in nicht-pflanzlichen Zellen ohne Benzophenanthridin-Biosynthese nachgewiesen. Damit können Einflüsse anderer Komponenten der Pflanze auf diesen Transportschritt ausgeschlossen werden: etwa regulierende bzw. kompensierende Reaktionen der anderen EcNHX-Antiporter oder weiterer Effektoren des Protonentransports in *Eschscholzia californica*, ebenso wie ein feedback der gebildeten Alkaloide auf die gemessenen Protonenfluxe.

Die für die Stimulation dieses  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters erforderliche LPC-Konzentration von etwa  $2 \mu\text{M}$  stimmt gut mit dem LPC-peak im Zytoplasma von Elicitor-behandelten Zellen von *Eschscholzia californica* überein, welcher auf  $1,9 \mu\text{M}$  geschätzt wurde (Viehweger et al., 2002). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die aktivierende Funktion von LPC auf den Antiporter direkt gerichtet ist, und nicht der Vermittlung anderer aus *Eschscholzia californica* stammender Moleküle bedarf. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion von EcNHX1 mit Proteinen der Hefe-Vakuole stattfindet.

Die hier vorgestellten Ergebnisse haben erstmals einem molekular definierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter eine Funktion im Signaltransfer zur Auslösung des Sekundärstoffwechsels zugewiesen.

Nach der Auffindung von LPC als Signal in *Eschscholzia californica* (Viehweger et al., 2002) wurde eine Signalfunktion dieses Moleküls bei der Mykorrhiza von Pflanzenwurzeln postuliert, d.h. durch Pilze gebildetes LPC wurde als Induktor von pflanzlichen Phosphat-Transportern vorgeschlagen (Drissner et al., 2007). Diese Interpretation erscheint zumindest zweifelhaft, da eine solche Induktion experimentell nur mit LPC-Konzentrationen von mindestens  $100 \mu\text{M}$  nachgewiesen werden konnte, für welche membranzerstörende Wirkungen durch andere Labors klar gezeigt wurden (Viehweger et al., 2002; Schwartze and Roos, 2008). LPC in dieser Konzentration könnte ebensogut zur Permeabilisierung einiger Zellen und dem Verlust von Phosphat führen, welches dann in bekannter Weise die Transporter induziert.

Dieses Problem weist darauf hin, dass bei der Charakterisierung einer Signalwirkung von LPC eine sorgfältige Trennung von den auf die Membraneigenschaften gerichteten Wirkungen des Lysolipids erfolgen muss. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Stimulation der NHX-Antiporter von *Eschscholzia californica* stützt sich hinsichtlich der Spezifität auf eine *in situ* Analyse des  $\text{Na}^+$ -abhängigen, vakuolären Protonentransports, bei der Lysolipide mit einer anderen Kopfgruppe als Glycerol (Serin, Äthanolamin, Inositol) unwirksam waren und LPC Konzentration  $> 10 \mu\text{M}$  zum Verlust der Barriere-Funktion der Vakuole führten (Viehweger et al., 2002). Die vorliegende Arbeit hat mit dem Nachweis der selektiven Wirksamkeit des LPC auf EcNHX1 und der Modellierung einer molekular definierten Bindestelle dieser Verbindung erstmals die Rolle eines Signalmoleküls mit bekanntem Angriffspunkt zugeordnet.

#### 4.2 Die NHX-Antiporter von *Eschscholzia californica* und ihre Evolution

Die aus dem Genom von *Eschscholzia californica* stammenden  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter konnten unter Erhalt ihrer katalytischen Funktion in Hefezellen transformiert und als funktionsfähige Proteine exprimiert werden. Dies zeigt, dass zumindest ein erheblicher Teil dieser Proteine exprimiert, als intrinsisches Membranprotein gefaltet und in der korrekten Orientierung in den Tonoplasten eingebaut wurde (siehe Kap.1.3.5) und stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (Hernández et al., 2009).

Damit deutet sich eine Gemeinsamkeit der pflanzlichen NHX-Proteine mit den in Hefezellen vorhandenen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern an. Diese wird durch die Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Signalmolekül LPC verstärkt: wie in Abb.48 gezeigt wurde, führt LPC in gleicher Konzentration zu einer ähnlichen Stimulation des genuinen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters der Hefe (ScNHX1) und des rekombinanten pflanzlichen Antiporters EcNHX1.

Interessanterweise besitzen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (und vermutlich die meisten Pilze) nur eine Isoform des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters in ihrem Endosom bzw. provakuolärem Kompartiment. Das codierende Gen gehört wie das der pflanzlichen NHX-Transporter zur CPA1-Superfamilie und befindet sich nahe am Ursprung des entsprechenden Stammbaums in Abb.2. Im Detail zeigt der Hefe-Antiporter etwas höhere Ähnlichkeit mit der Untergruppe AtNHX5/6 als mit der Untergruppe AtNHX1-4, zu welcher die aus *Eschscholzia californica* klonierten Antiporter gehören. Die Stimulierbarkeit durch LPC könnte also bereits in einem gemeinsamen Vorläufer der NHX-Antiporter von Pflanzen und Pilzen angelegt sein.

#### 4.3 Weiterführende Aspekte

Die hier vorgestellten Ergebnisse bieten einen Ausgangspunkt für zahlreiche experimentelle Strategien zur weiteren Aufklärung der Rolle der NHX-Transporter als Signalgeber für die Auslösung der Phytoalexin-Produktion. Folgende Arbeitsrichtungen erscheinen u.a. sinnvoll:

- 1) die **Struktur-Wirkungsbeziehung der LPC-Bindedomäne** und der Mechanismus der LPC-ausgelösten Aktivitätsänderung der Antiporter.

Das 3D modelling gibt erste Hinweis für eine LPC-Bindedomäne im EcNHX1-Protein. Dies ist ein guter Ausgangspunkt für die zielgerichtete Mutagenese der Positionen K397, Q266, E263 und T400 in EcNHX1. Damit könnte der molekulare Wirkmechanismus von LPC am Antiporter aufgeklärt werden. Hierfür bieten z.B. allosterische Veränderungen des NHX-Moleküls oder die postulierten Veränderungen der Affinität für  $\text{Na}^+$  einen Arbeitshypothese.

**2) der Austausch-Vorgang in der Ganzzelle.**

Inwieweit kann die Funktion von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{K}^+$  (oder andere Alkali-Kationen) ersetzt werden kann und welches dieser Kationen wird tatsächlich im Austausch für Protonen transportiert. Die hier nachgewiesene  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit des  $\text{H}^+$ -Efflux in permeablen Zellen beweist noch nicht die Art des Austausch-Vorgangs in der Ganzzelle.

**3) Interaktionen der NHX-Transporter mit anderen Membrankomponenten.**

Um alle möglichen Interaktoren aus der Wirtszelle auszuschließen bzw. selektiv zu testen, könnte das NHX-Protein in Proteoliposomen definierter Zusammensetzung eingebracht werden. Damit bietet sich zugleich ein Ansatz, die Abhängigkeit des  $\text{H}^+$ -Efflux von einem experimentell festgelegten  $\text{Na}^+$ - und/oder pH-Gradienten festzustellen.

**4) die Regulation der EcNHX1-Expression.**

Das Expressionsniveau des Transporters sollten auf seine Abhängigkeit von Wachstum, Zellzyklus oder Differenzierungsgrad untersucht werden. Damit könnte geprüft werden, ob der NHX-Transporter entwicklungsabhängig exprimiert wird und sich daraus eine Anpassung des elicitor-ausgelösten Signalwegs an bestimmte Entwicklungsstadien ergibt. An Ganzpflanzen könnten Experimente zur Gewebeverteilung der NHX-Transkripte unternommen und damit festgestellt werden, ob sich der LPC-sensitive Antiporter EcNHX1 darin von den anderen Isotypen unterscheidet. Denkbar wäre z.B. eine Colokalisation mit den Enzymen des Alkaloid-Stoffwechsels. Dies wäre ein Beitrag zur Klärung der Frage, ob die LPC-Abhängigkeit von EcNHX1 eine regulatorische Anpassung an den Alkaloid-Stoffwechsel widerspiegelt.

## 5. Zusammenfassung

**5.1.** In Zellkulturen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholzia californica*) kann die Überproduktion von Benzophenanthridin-Alkaloiden durch einen Glykoprotein-Elicitor ausgelöst werden. Die zugrunde liegende Signalkette, welche von einer Elicitor-aktivierten Phospholipase A2 ausgeht und zur Expression von Biosynthese-Enzymen führt, enthält den temporären Efflux von Protonen aus der Vakuole als zentrales Ereignis. Die molekulare Basis für diesen nur mikroskopisch beobachteten pH-shift war bisher ungeklärt.

**5.2.** Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter am Tonoplasten zu identifizieren und ihre Beteiligung am pH-abhängigen Signaltransfer zu prüfen. Diese Aufgabe erforderte methodische Vorarbeiten, um die kontinuierliche Messung des vakuolären pH in Zellsuspensionen durch fluorescence ratioing zu ermöglichen. Dies gelang nach gezielter Akkumulation des pH Indikators 5-Carboxyfluoreszein während der Inkubation als Diacetat-Acetoxy-methylester.

**5.3.** Die vakuolären  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter gehören zur CPA1-Superfamilie der Ionentransporter in Eukaryoten und sind an der Homöostase des zellulären pH und der monovalenten Kationen essentiell beteiligt. Basierend auf konservierten Gensequenzen aus der Untergruppe der pflanzlichen NHX-Gene, konnten durch RT-PCR- und RACE-gestützte Suchverfahren in *Eschscholzia californica* vier ORF's identifiziert werden, die für die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter EcNHX1-4 codieren. Alle vier NHX-Gene werden durch erhöhten NaCl-Gehalt im Aussenmedium induziert. Die *in silico* abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen eine hohe Homologie zu den bekannten NHX-Sequenzen höherer Pflanzen. Sie enthalten jedoch mehrere Spezifika, die eine klare Abtrennung von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern anderer Pflanzen ergeben.

**5.4.** Durch RNAi-basiertes gene silencing wurde eine deutliche Absenkung des Expressionsniveaus der Antiporter EcNHX1-3 erreicht. Die dafür verwendete Gensequenz war gegen die hochkonservierte Domäne der Amilorid-Bindestelle gerichtet. Die so erhaltenen stabilen Zellstämme zeigen im Unterschied zum Wildtyp keinen pH-shift nach Elicitorkontakt und keine Überexpression von Enzymen Alkaloid-Stoffwechsels. Diese Daten belegen die essentielle Rolle von NHX-Antiportern im Signaltransfer, erlaubten aber nicht den Nachweis der Beteiligung individueller Antiporter.

**5.5.** Zur Charakterisierung individueller Antiporter wurden die einzelnen NHX-Gene von *Eschscholzia californica* in einem *Saccharomyces*-Stamm exprimiert, welcher defizient für ScNHX1 war, den einzigen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter dieser Hefezellen. In allen Fällen gelang die funktionelle Komplementierung der  $\Delta$ nhx1-Nullmutante, wodurch vier *Saccharomyces*-Stämme mit einem durch Na<sup>+</sup>-auslösaren Efflux vakuolärer Protonen entstanden.

**5.6.** Unter den transgenen Hefestämmen reagierte nur die mit EcNHX1 transformierte Variante auf das Signalmolekül Lysophosphatidylcholin (LPC), welches in *Eschscholzia californica* durch die Elicitor-aktivierte Phospholipase A2 gebildet wird und den Efflux vakuolärer Protonen auslöst. Diese und weitere Daten identifizieren EcNHX1 mit hoher Wahrscheinlichkeit als den direkt am Signaltransfer beteiligten Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter in *Eschscholzia californica*.

**5.7.** Die selektive Aktivierung von EcNHX1 durch LPC wurde durch molecular modelling unterstützt. Basierend auf einem bakteriellen NHE-template, welches die Hauptelemente der CPA1-Antiporter enthält, wurden 3D-Modelle der EcNHX-Antiporter errechnet, welche docking-Studien mit LPC ermöglichten. Nur das für EcNHX1 erstellte Modell erlaubte eine selektive Bindung von LPC, die anderen Antiporter zeigen Aminosäure-Austausche, welche die Bindung dieses Signalmoleküls erschweren oder unmöglich machen.

**5.8.** Insgesamt sprechen die erhaltenen Ergebnisse für die Existenz eines distinkten NHX-Antiporters in *Eschscholzia californica*, der durch LPC aktiviert wird und dadurch einen temporären Efflux vakuolärer Protonen auslösen kann. Diese Aktivierbarkeit fehlt den anderen drei in *Eschscholzia californica* exprimierten NHX-Isoformen, tritt aber im einzigen NHX-Homologon von *Saccharomyces cerevisiae* auf. Möglicherweise wurde diese Eigenschaft während der Evolution von *Eschscholzia californica* konserviert, da sie den Selektionsvorteil der spezifischen Auslösbarkeit der Phytoalexin-Biosynthese mit sich bringt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adler, G., Blumwald, E. and Bar-Zvi, D.** (2010). The sugar beet gene encoding the sodium/proton exchanger 1 (BvNHX1) is regulated by a MYB transcription factor. *Planta* 232, 187-195.
- Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasnyanski, S., Kumar, S. and Thompson, W. F.** (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissue using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protoc* 5, 2320-2325.
- Ali, R., Brett, C. L., Mukherjee, S. and Rao, R.** (2004). Inhibition of sodium/proton exchange by Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 4498-4506.
- Amtman, A., Sanders, D.** (1999). Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29, 75-112.
- An, R., Chen, Q. J., Chai, M. F., Lu, P., Su, Z., Qin, Z. X., Chen, J. and Wang, X. C.** (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *Plant J.* 49, 718-728.
- Angelova, S., Buchheim, M., Frowitter, D., Schierhorn, D. and Roos, W.** (2010). Overproduction of phytoalexins in California Poppy cells is associated with the co-expression of biosynthetic and stress-protective enzymes. *Mol. Plant* 5, 927-939.
- Angiosperm Phylogeny group (APGII)** (2003). An update of the angiosperm phylogeny group classification of orders and families of flowering plants. *Bot. J. Lin. Soc.* 141: 399-436.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. and Blumwald, E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.
- Apse, M. P., Sottosanto, J. B. and Blumwald, E.** (2003). Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J.* 36, 229-239.
- Apse, M. P. and Blumwald, E.** (2007). Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters* 581, 2247-2254.
- Ballesteros, E., Blumwald, E., Donaire, J. P. and Belver, A.** (1997). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower root induced by NaCl stress. *Physiol. Plant.* 99, 328-334.
- Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. and Potier, S.** (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2749-2758.
- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu Q., Fujji, H., Pan, S., et al.** (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol. Cell Biol.* 27, 7781-7790.
- Bhandal, I. S. and Malik, C. P.** (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Int. Rev. Cyt.* 110, 205-254.

- Blaha, G., Stelzi, U., Spahn, C. M. T., Agrawal, R. K., Frank, J. and Nierhaus, K. H.** (2000). Preparation and functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Meth. Enzym* 317, 292-309.
- Blom-Zandstra, M., Vogelzang, S. A. and Veen, B. W.** (1998). Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. *J. Exp. Bot.* 49, 1863-1868.
- Blumwald, E., Aharon, G. S. and Apse, M. P.** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 140-151.
- Brett, C. L., Donowitz, M. and Rao, R.** (2005a). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, 223-239.
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. and Rao, R.** (2005b). The yeast endosomal  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 16, 1369-1405.
- Brini, F., Gaxiola, R. A., Berkowitz, G. A. and Masmoudi, K.** (2005). Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 347-354.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D. T., Lepetit, M., Gosti, F. and Casse, F.** (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/ $\text{H}^+$  exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggest a role in K homeostasis. *Plant J.* 39, 834-846.
- Chanroj, S., Lu, Y., Padmanaban, S., Nanatani, K., Uozumi, N., Rao, R. and Sze, H.** (2011). Plant-specific cation/ $\text{H}^+$  exchanger 17 and its homologs are endomembran  $\text{K}^+$  transporters with roles in protein sorting. *J. Biol. Chem.* 286, 33931-33941.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F. and Sze, H.** (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/ $\text{H}^+$  antiporters from algae to flowering plants. *Fron.Plant Sci.* 3: doi: 10.3389/fpls.2012.00025.
- Chauhan, S., Forsthoefel, N., Ran, Y., Quigley, F., Nelson, D. E. and Bohnert, H. J.** (2000).  $\text{Na}^+$ /myo-inositol symporters and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 24, 511-522.
- Choe, S.** (2002). Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 115-121.
- Cuin, T. A., Miller, A. J., Laurie, S. A. and Leigh, R. A.** (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J. Exp. Bot.* (in press).
- Darley, C. P., Wuytswinkel, O. C. M., Van der Woude, K., Mager, W. H. and De Boer, A. H.** (2000). *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitiv electroneutral  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. *Biochem. J.* 351, 241-249.
- Davenport, R. J., Tester, M.** (2000). A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* 122, 823-834.
- Demidchik, V., Davenport, R. J., Tester, M.** (2002). Nonselective cation channels. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53, 67-107.
- Drew, M. C. and Läuchli, A.** (1987). The role of the mesocotyl in sodium exclusion from the shoot of *Zea mays* L. (cv. Pioneer 3906). *J. Exp. Bot.* 38, 409-418.

- Drissner, D., Kunze, G., Callwaaert, N., Gehring, P., Tamasloukht, M., Boller, T., Felix, G., Amrhein, N. and Bucher, M.** (2007). Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* 318, 265-267.
- Fukada, A., Nakamura, A. and Tanaka, Y.** (1999). Molecular cloning and expression of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 149- 155.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. et al.** (2004a). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in rice. *Plant Cell Physiol.* 45, 146-159.
- Fukuda, A., Chiba, K., Maeda, M., Nakamura, A., Maeshima, M and Tanaka, Y.** (2004b). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase,  $\text{H}^+$ -ATPase subunit A, and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* 55, 585-594.
- Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito, N. and Iida, S.** (2000). Colour-enhancing protein in blue petals: Spectacular morning glory blooms rely on a behind-the-scenes proton exchanger. *Nature* 407, 581.
- Gabarino, J. and DuPont, F. M.** (1989). Rapid induction of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol.* 89, 1-4.
- Garciadeblás, B., Benito, B. and Rodriguez-Navarro, A.** (2001). Plant cells express several stress calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant Soil* 235, 181-192.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grifasi, P., Alpier, S. L. and Fink, G. R.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Acad. Sci. USA* 96, 1480-1485.
- Gerchman, Y., Rimon, A., Venturi, M. and Padan, E.** (2001). Oligomerization of NhaA, the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry* 40, 3403-3412.
- Hamada, A., Shono, M., Xia, T., Ohta, M., Hayashi, Y., Tanaka, A. and Hayakawa, T.** (2001). Isolation and characterization of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol. Biol.* 46, 35-42.
- Hanana, M., Cagnac, O., Yamaguchi, T., Hamdi, S., Ghorbel, A. and Blumwald, E.** (2007). Grape berry (*Vitis vinifera* L.) Cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant Cell Physiol.* 48, 804-811.
- Hasegawa, P. M., Bressen, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463-499.
- Heinze, M., Steighardt, J., Gesell, A., Schwartze, W. and Roos, W.** (2007). Regulatory interaction of the  $G\alpha$  protein with phospholipase A2 in the plasma membrane of *Eschscholzia californica*. *Plant J.* 52, 1041-1051.
- Heinze, M., Herre, M., Massalski, C., Hermann, I., Conrad, U. and Roos, W.** (2013). Signal transfer in the plant plasma membrane: phospholipase A<sub>2</sub> is regulated via an inhibitory  $G\alpha$  protein and cyclophilin. *Biochem. J.* 450, 497-509.

- Hernández, A., Jiang, X., Cubero, B., Nieto, P. M., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M.** (2009). Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/H<sup>+</sup> antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast. *J. Biol. Chem.* 284, 14276-14285.
- High, S. and Dobberstein, B.** (1992). Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins." *Curr Opin Cell Biol.* 4, 581-6.
- Higinbotham, N.** (1973). Electropotentials of plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 24, 25- 46.
- Hilger, D., Jung, H., Padan, E., Wegener, C., Vogel, K. P., Steinhoff, H. J. and Jeschke, G.** (2005). Assessing oligomerization of membrane proteins by four-pulse DEER: pH-dependent dimerization of NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *E. coli*. *Biophys J.* 89, 1328-1338.
- Hilger, D., Polyhach, Y., Padan, E., Jung, H. and Jeschke, G.** (2007). Highresolution structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter dimer obtained by pulsed EPR distance measurements. *Biophys. J.* 93, 3675-3683.
- Internetquellen:**
- <http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>
- <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract>
- <http://www.fermentas.com/doubledigest>
- <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/ph-indicators/probes-useful-at-near-neutral-ph.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>
- <http://www.yeastgenome.org/>
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R.** (2001). Structure of the RCK domain from *E. coli* K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29, 593-601.
- Johansen, J. G. and Cheeseman, J. M.** (1983). Uptake and distribution of sodium and potassium by corn seedlings. I. Role of the mesocotyl in 'sodium exclusion'. *Plant Physiol.* 73, 153-158.
- Kagami, T. and Suzuki, M.** (2005). Molecular and functional analysis of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene of *Rosa hybrid*. *Genes Gent. Syst.* 80, 121-128.
- Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A. and Zhu, J. K.** (2006). The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18816-18821.
- Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S. and Sychrova, H.** (2001). Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* 40, 656-668.

- Landau, M., Herz, K., Padan, E. and Ben-Tal, N.** (2007). Model structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1). Functional and clinical implications. *J. Biol. Chem.* 282, 37854-37863.
- Lee, C., Kang, H. J., von Ballmoos, C., Newstead, S., Uzdavinys, P., Dotson, D. L., Iwata, S., Beckstein, O., Cameron, A. D., Drew, D.** (2013). A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport. *Nature* 501, 573-577.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Cubero, B., Quintero, F. J., Pardo, J. M.** (2005). Function of endosomal NHX antiporters on plant K nutrition. Society of Experimental Biology Annual Main Meeting. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A. 141, 342.
- Li, W. Y., Wong, F. L., Tsai, S. N., Phang, T. H., Shao, G. and Lam, H. M.** (2006). Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (By)-2 cells. *Plant Cell Environ.* 29, 1122-1137.
- Lui, H., Wang, Q., Yu, M., Zhang, Y., Wu, Y. and Zhang, H.** (2008). Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively overexpressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage root. *Plant Cell Environ.* 31, 1325-1334.
- 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. *Ann. Bot.* 84, 123-133.
- Maeshima, M.** (2000). Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 37-51.
- Mukherjee, S., Kallay, L., Brett, C. L. and Rao, R.** (2006). Mutational analysis of the intermembranous H10 loop of yeast NHX1 reveals a critical role in ion homeostasis and vesicle trafficking. *Biochem. J.* 398, 97-105.
- Muller, M.L., and Taiz, L.** (2002) Regulation of the lemon-fruit V-ATPase by variable stoichiometry and organic acids. *J. Membr. Biol.* 185, 209–220.
- Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M.** (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. Oxford Univers. Press: Nucleic Acids Research 22, 5767-5768.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008). Mechanism of salinity tolerance. *Anu. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681.
- Nui, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M.** (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K. and Kanazawa, H.** (2005). Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, Nha1, using isolated secretory vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1712, 185-196.
- Ohnishi, M., Fukada-Tanaka, S., Hoshino, A., Takada, J., Inagaki, Y. and Iida, S.** (2005). Characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene InNHX2 and comparison of InNHX2 with InNHX1, which is responsible for blue coloration by increasing the vacuolar pH in Japanese Morning Glory. *Plant Cell Physiol.* 46, 259-267.
- Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T., et al.** (2002). Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* 532, 279-282.

- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P. A., Marin-Manzano, M. C., Pardo, J. M. and Belver, A.** (2009). The plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of  $\text{Na}^+$  between plant organs. *Plant Cell Environm.* 32, 904-916.
- Padan, E.** (2008). The enlightening encounter between structure and function in the NhaA  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Trends Biochem. Sci.* 33, 435-443.
- Padmanaban, S., Chanroj, S., Kwak, J., Li, X., Ward, J. M. and Sze, H.** (2007). Participation of endomembran cation/ $\text{H}^+$  exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiol.* 144, 82-93.
- Panahi, B., Moshtaghi, N., Torktaz, I., Panahi, A. and Roy, S.** (2012). Homology modeling and structural analysis of NHX Antiporter of *Leptochloa fusca* (L.). *J. Proteomics Bioinform.* 5, 9.
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O. and Quintero, F. J.** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57, 1181-1199.
- Qiu, Q. S., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Zhu, J. K. and Schuhmaker, K. S.** (2003).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 1041-1052.
- Qiu, Q. S., Guo, Y., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Schuhmaker, K. S. and Zhu, J. K.** (2004). Regulation of the vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in *Arabidopsis thaliana* by salt-overly sensitive (SOS) pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 207-215.
- Quintero, F. J., Blatt, M. R. and Pardo, J. M.** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters. *FEBS Lett.* 471, 224-228.
- Rimon, A., Tzuberly, T. and Padan, E.** (2007). Monomers of NhaA  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *Escherichia coli* are fully functional yet dimers are beneficial under extreme stress conditions at alkaline pH in the presence of  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ . *J. Biol. Chem.* 282, 26810-26821.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas R., Aranda M. N., Baghour, M., Cagnac, O. and Venema, K.** (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Landes Biosci.* 4, 265-276.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Jiang, X. J., Gálvez, F. J., Aranda, M. N., Cubero, B. and Venema, K.** (2008). Overexpression of the tomato  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.* 179, 366-377.
- Roos, W.** (2000). Ion mapping in plant cells- Methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210, 347-370.
- Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M and Schumann, B.** (1998). Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol.* 118, 349-364.

- Roos, W., Viehweger, K., Dordschbal, B., Schumann, B., Evers, S., Steighardt, J. and Schwartze, W.** (2006). Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways- The case of *Eschscholzia californica*. *J. Plant Physiol.* 163, 369-381.
- Roosild, T. P., Miller, S., Booth, I. R. and Choe, S.** (2002). A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell* 109, 781-791.
- Rubio, F., Gassmann, W. and Schroeder, J. L.** (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Sci.* 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. and Hasegawa P. M.** (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 98, 14150-14155.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467
- Saier, M. H. Jr.** (2000). A functional- phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 354-411.
- Sato, Y. and Sakaguchi, M.** (2005). Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family. *J. Biochem.* 138, 425-431.
- Schuhmacher, H.-M., Gundlach, H., Fiedler, F., Zenk, M. H.** (1987). Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis of *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports* 6, 410-413.
- Schwartze, W. and Roos, W.** (2008). The signal molecule lysophosphatidylcholine in *Eschscholzia californica* is rapidly metabolized by reacylation. *Planta* 229, 183-191.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J. K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6896-6901.
- Shi, H. and Zhu, J. K.** (2002a). Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 50, 543-550.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Zhu, J. K.** (2002b). The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants. *Plant Cell* 14, 465-477.
- Shone, M. G. T., Clarkson, D. T., Sanderson, J.** (1969). The absorption and translocation of sodium by maize seedlings. *Planta* 86, 301-314.
- Sottosanto, J. B., Gelli, A. and Blumwald, E.** (2004). DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J.* 40, 752-771.
- Sychrova, H., Ramirez, J. and Pena, A.** (1999). Involvement Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 167-172.

- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Conejero, G., Li, X., Twell, D., Ward, J. M. and Hirschi, K. D.** (2004). Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development. *Plant Physiol.* 136, 2532-2547.
- Taglicht, D., Padan, E. and Schuldiner, S.** (1991). Overproduction and purification of a functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter coded by NhaA (ant) from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 11289-11294.
- Tang, R., Li, C., Xu, K., Du, Y. and Xia, T.** (2010). Isolation, functional characterization, and expression pattern of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene TrNHX1 from *Trifolium repens* L. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28, 102-111.
- Tester, M. and Davenport, R.** (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Anna. Bot.* 91, 503-527.
- Tsunekawa, K., Shijuku, T., Hayashimoto, M., Kojima, Y. Onai, K., Morishita, M., Ishiura, M., Kuroda, T., Nakamura, T., Kobayashi, H., Sato, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Omata, T. and Uozumi, N.** (2009). Identification and characterization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nhas3 from the thylakoid membrane of the *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 284, 16513-16521.
- Tyerman, S. D., Skerret, M.** (1999). Root ion channels and salinity. *Sci. Hort.* 78, 175-235.
- Uozumi, N. Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker E. P., Nakamura, T. and 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 Physiol.* 122, 1249-1259.
- Vasekina, A. V., Yershov, P. V., Reshetova, O. S., Tikhonova, T. V., Lunin, V. G., Trofimova, M. S. and Babakov, A. V.** (2005). Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from Barley: identification and response to salt stress. *Biochemistry (Mosc)* 70, 100-107.
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P. and 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. *J. Biol. Chem.* 278, 22453-22459.
- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and 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. *J. Biol. Chem.* 277, 2417-2418.
- Veenhoff, L. M., Heuberger, E. H. and Poolman, B.** (2002). Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27, 242-249
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., García-Ramírez, L. and Pantoja, O.** (2005). Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na<sup>+</sup> transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139, 1507-1517.
- Verma, D., Singla-Pareek, S. L., Rajagopol, D., Reddy, M K. and Soory, S. K.** (2007). Functional validation of a novel isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J. Biosci.* 32, 621-628.

- Viehweger, K.** (2003). Der Protonentransport an der Vakuole - Ein Signalschritt zur Auslösung der Biosynthese von Benzophenanthridin- Alkaloiden in *Eschscholzia californica*. Dissertation an der MLU- Halle- Wittenberg. urn:nbn:de:gbv:3-000004901.
- Viehweger, K., Dordschbal, B. and Roos, W.** (2002). Elicitor-activated phospholipase A<sub>2</sub> generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H<sup>+</sup> pool for pH signaling via the activation of Na<sup>+</sup>-dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14, 1509-1525.
- Viehweger, K., Schwartze, W., Schumann, B., Lein, W. and Roos, W.** (2006). The Gα protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* 18, 1510-1523.
- Vothknecht, U. C. and Westhoff, P.** (2001). Biogenesis and origin of the thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 91-101.
- Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. and Shigekawa, M.** (2000). A novel topological model of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1. *J. Biol. Chem.* 275, 7942-7949.
- Walker, D. J., Leigh, R. A. and Miller, A. J.** (1996). Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10510-10514.
- Weigl, S., Brandt, W., Langhammer, R. and Roos, W.** (2015). A vacuolar proton-cation exchanger generates pH-signals for the expression of secondary metabolism in *Eschscholzia californica*. manuscript in preparation.
- Wells, K. M. and Rao, R.** (2001). The yeast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 is an N-linked Glycoprotein. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 276, 3401-3407.
- White, P. J.** (1999). The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Tr. Plant Sci.* 4, 245-246.
- Wilson, C. and Shannon, M. C.** (1995). Salt-induced Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Sci.* 107, 147-157.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. and Provart, N. J.** (2007). An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 8, 718.
- Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M. L. and Jeschke, W. D.** (1991). The role of the stem in the partitioning of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in salt-treated barley. *J. Exp. Bot.* 42, 697-704.
- Wu, C. A., Yang, G. D., Meng, Q. W. and Zheng, C. C.** (2004). The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol.* 45, 600-607.
- Wyn Jones, R. G., Brady, C. J. and Spears, J.** (1979). Ionic and osmotic relations in plant cell. In: Laidman, D. L., Wyn Jones, R. G., eds. *Recent advances in the biochemistry of cereals*. London: Acad. Press, 63-103.
- Xia, T., Apse, M. P., Aharon, G. S. and Blumwald, E.** (2002). Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant* 116, 206-212.

- Xue, Z. Y., Zhi, D. Y., Xue, G. P., Thang, H., Zhao, Y. X. and Xia, G. M.** (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* 167, 849-859.
- Yamaguchi, T., Aharon, G. S., Sottosanto, J. B. and Blumwald, E.** (2005). Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca<sup>2+</sup>- and pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16107-16112.
- Yamaguchi, T., Apse, M. P., Shi, H. and Blumwald, E.** (2003). Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12510-12515.
- Yeo, A. R., Läuchli, A., Kramer, D. and Gullasch, J.** (1977). Ion measurements by x-ray microanalysis in unfixed, frozen, hydrated plant cells of species differing in salt tolerance. *Planta* 134, 35-38.
- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B. Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., et al.** (2002). Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 46, 407-415.
- Yoshida, S., Kawachi, M., Mori, M., Maeshima, M., Kondo, M., Nishimura, M., et al.** (2005). The involvement of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers in the change of petal colour during flower opening of Morning Glory, *Ipomea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Plant Cell Physiol.* 46, 407-415.
- Yoshida, K., Miki, N., Momonoi, K., Kawachi, M., Katou, K., Okazaki, Y., Uozumi, N., Maeshima, M. and Kondo, T.** (2009). Synchrony between opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proc. Jpn. Acad.* 85(6), 187-197.
- Zaharan, H. H., Marín-Manzano, M. C., Sánchez-Raya, A. J., Bedmar, E. J., Venema, K. and Rodríguez-Rosales, M. P.** (2007). Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants. *Physiol. Plant* 131, 122-130.
- Zhang, C., Hicks, G. R. and Raikhel, N. V.** (2014). Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking. *Font. Plant Scien.*, doi: 10.3389/fpls.2014.00476.
- Zhang, G. H., Su, Q., An, L. J. and Wu, S.** (2008). Characterization and expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 117-126.
- Zhang, H.-X. and Blumwald, E.** (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotech.* 19, 765-768.
- Zhang, H.-X., Hodson, J. N., Williams, J. P. and Blumwald, E.** (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12832-12836.
- Zheng, N., Gierasch, L.M.** (1996). "Signal sequences: the same yet different." *Cell.* 86, 849-52.

- Zhu, J.-K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *An. Rev. Plant Biol.* 53, 247-273.
- Zörb, C., Noll, A., Karl, S., Leib, K., Yan, F. and Schubert, S.** (2004). Molecular characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. *J. Plant Physiol.* 162, 55-66.
- Zybaïlov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. and Wijk, K. J.** (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3, e1994. doi: 10.1371/journal.pone.0001994

## 7. Anhang

### 7.1 Auflistung der:

#### 7.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism <sup>®</sup> 377 DNA Sequenzer	Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Agarose-Gelelektrophorese-System	Roth (Karlsruhe, D)
Analysenwaagen L2200P/H160/R16P-D1	Sartorius (Göttingen, D)
Autoklav Systec 2540 ELV	Tuttnauer (Breda, NL)
Autoklav Varioklav 400E	H+P Labortechnik (Oberschleissheim, D)
Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Bio-Rad (München, D)
Digitalkamera Camedia E10	Olympus (Hamburg, D)
Gefrierschrank	Gorenje (München, D)
Gefriertruhe	Sanyo (München, D)
Molecular Manager Gel Doc <sup>®</sup> XR <sup>+</sup>	Bio Rad (München, D)
Heizplatte Monotherm	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CH)
Hybridisierungsflasche (38x75mm)	LabMarket GmbH (Mannheim, D)
Hybridisierungsöfen Enviro-Genie	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Kühlschrank Foron	EFS Hausgeräte (Duisburg, D)
Lichtkasten Color Control	BIOTEC-Fischer (Reiskirchen, D)
Magnetrührer Monotherm	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CH)
Microplate Fluorescence Reader FLX800	BioTek Instruments (Winooski, USA)
Mini Trans Blot Elektrophorese-Apparatur	Bio Rad (München, D)
Multitron Pro Inkubationsschüttler	Infors HT (Bottmingen, CH)
Nano Photometer P-300	Implen (München, D)
PCR Maschine Mastercycler <i>Gradient</i>	Eppendorf (Hamburg, D)
PCR Maschine Progene SI 1202	Techne (Cambridge, USA)
pH-Meter pMX3000	WTW (Weilheim, D)
Schnellkochtopf	WMf (Geislingen an der Steige, D)
Schüttelmaschine AK 85	Novotron (Ludwigsburg, D)
Schüttelmaschine	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Schüttler KS 500	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Sequenzierer	ABI (Foster City, USA)
Spannungsgeber E832 und E443	Consort (Turnhout, B)
Spektralphotometer	Pharmacia (Uppsala, SE)
Spektrometer Ultrospec II/Genequant 1300	GE Healthcare (Freiburg, D)
Sterilbank LF MRF	Steag Laminar Flow Prozesstechnik (Reutlingen, D)
Sterilisator HST 5020/3020	MLW (Medizin- und Labortechnik Werke, ehem. DDR)
Temperierbarer Schüttler VORTEMP	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermomixer	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
Transilluminator C-20M	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Ultraschallbad Sonorex TK52H	Bandelin Schalltec GmbH (Morfelden-Walldorf, D)
Ultra-Turrax T8	IKA Werke (Staufen, D)
Ultrazentrifuge TL 100 und Optima LE-80 K	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Ultrazentrifuge K23 D	MLW (Medizin- und Labortechnik Werke, ehem. DDR)
Vakuumpumpe Typ PM 16763-860.3	RNF Neuberger (Freiburg, D)
Vibrax-Schüttler	VWR (Darmstadt, D)
Vortex-Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries (New York, USA)
Vortex MS 2- IKA	IKA Werke (Staufen, D)
Zellmühle ZM1000	Retsch (Hahn, D)
Zentrifuge 3K12	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
Zentrifuge EBA 21	Sigma (Osterode am Harz, D)

### 7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Filter Discs, Durchmesser 24 mm	Munktell & Filtrak GmbH (Barenstein, D)
ECL <sup>®</sup> Western Blotting Detection- Reagenz	GE Healthcare (Freiburg, D)
Gold Mikrocarrrier, 1,0 µm	Bio-Rad (München, D)
Hybond ECL für Western Blotting	GE Healthcare (Freiburg, D)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Freiburg, D)
Low Cross Buffer	Candor Bioscience (Weisensberg, D)
Makrocarrier	Bio-Rad (München, D)
Fixierer, Entwickler	Kodak (Rochester, USA)
Rupture Disks, 1100 psi	Bio-Rad (München, D)
Stopping Screens	Bio-Rad (München, D)
Whatman Blotting Papier	GE Healthcare (Freiburg, D)

### 7.1.3 Software

Software	Hersteller
CLC- Viewer 7.0.2	Qiagen Company (Hilden, D)
Clone Manager	Sci ED- Software (Morrisville, USA)
GraphPad Prism <sup>®</sup> 5.0	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Optimas <sup>®</sup> 5.0	Adept Turkney (Sydney, AU)

### 7.1.4 Kitsysteme

Kitsysteme	Hersteller
BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Big Dye <sup>®</sup> Terminator Kit	Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
CloneJET <sup>®</sup> PCR Cloning Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Freiburg, D)
Gateway <sup>®</sup> Technology with Clonase <sup>®</sup> II- Kit	Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
GenJET <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
GeneJET <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Marathon <sup>®</sup> cDNA Amplification Kits	Clontech Laboratories, Inc. (Saint-Germain-en-Laye,F)
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kits	Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
PolyAtract <sup>®</sup> mRNA Isolation System III	Promega (Mannheim, D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAGEN <sup>®</sup> PCR Cloning Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAprep Spin <sup>®</sup> Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
RevertAid <sup>®</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase- Kits	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Roche <sup>®</sup> PCR Mastermix	Roche (Basel, CH)
Zymoclean <sup>®</sup> Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (Freiburg, D)

## 7.2 Zusammensetzung von Nährmedien

### Pflanzenzellen

Für die Kultivierung von Pflanzenzellen in Form von Zellkultur oder Kalluszellen wurden folgende Nährmedien verwendet:

<b>Linsmaier/Skoog-Medium:</b>	KNO <sub>3</sub>	1,9 g/l
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	332 mg/l
	MgSO <sub>4</sub>	180 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
	myo- Inositol	100 mg/l
	KJ	83 mg/l
	FeNaEDTA	36,7 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,9 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
	Thiaminhydrochlorid	0,4 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
Hormone:	2, 4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,22 mg/l
	1- Naphtylessigsäure	0,186 mg/l
C- Quelle:	Sucrose	30 g/l
pH- Wert:	pH 6,0	(1N KOH)
Sterilisation:	20 min bei 121 °C autoklavieren	

<b><u>M21-Medium:</u></b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65 g/l
	KNO <sub>3</sub>	1,9 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	332 mg/l
	MgSO <sub>4</sub>	180 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
	myo-Inositol	100 mg/l
	KJ	83 mg/l
	FeNaEDTA	36,7 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,9 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	8,6 mg/l
	Calciumpantothenat	5,0 mg/l
	Nicotinsäureamid	0,5 mg/l
	Thiaminhydrochlorid	0,4 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
Hormone:	2, 4-Dichlorphenoxyessigsäure	1 mg/l
	1-Naphtylessigsäure	0,186 mg/l
C-Quelle:	Sucrose	30 g/l
Agar:	Agar	9 g/l
pH-Wert:	pH 6,0	(1N KOH)
Sterilisation:	20 min bei 121 °C autoklavieren	

**Hefezellen**

Für die Kultivierung von Hefezellen wurden die folgenden Nährmedien verwendet:

<b>Vollmedium:</b>	Aminosäure-Stammlösung	5 ml
	Glucose 20% (m/V)	10 ml
	YNB-Lösung (1,2x)	add 100 ml
	(Agar)	2,0 g
<b>Minimalmedium:</b>	-URA-Stammlösung	5 ml
	Glucose 20% (m/V)	10 ml
	YNB-Lösung (1,2x)	add 100 ml
	(Agar)	2,0 g
<b>YNB- Lösung (1,2x):</b>	YNB*	8,1g
	ddH <sub>2</sub> O	add 1 liter
20min bei 121 °C autoklavieren		

<b>Aminosäure-Stammlösung:</b>	Adenin	140 mg
	Uracil	480 mg
	Histidin	480 mg
	Tryptophan	480 mg
	Arginin	480 mg
	Methionin	480 mg
	L-Leucin	360 mg
	L-Isoleucin	360 mg
	L-Lysin	360 mg
	L-Valin	360 mg
	L-Threonin	360 mg
	Phenylalanin	600 mg
	ddH <sub>2</sub> O	625 ml
10 min autoklavieren		

**-URA-Mix:** Aminosäure-Stammlösung ohne Uracil

---

YNB\*: yeast nitrogen base w/o aminoacids

### 7.3 Oligonukleotide zur Anwendung in:

#### 7.3.1 Standard- und RACE-PCR

Die in der Arbeit verwendeten Primer (Tab.3) wurden von Biomers (Ulm, D) synthetisiert. Die Sequenzinformationen stammten:

1. ... für **degenerierte Primer** aus der Arbeit von Xia, T. et al., 2002
2. ... für **Konsensus-Primer** aus konservierten Bereichen bekannter pflanzlichen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter und wurden hiervon abgeleitet (Abb. 27).
3. ... von Sequenzergebnissen der PCR-gestützten Suche nach NHX-ORF's abgeleitet (siehe Kap.3.2, Abb.26).

Basis Primer					
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	GC %	
<u>Degenerierte Primer:</u>					
1*	Bv_deg_for	5'ccw ccs atyatm ttc aat gca ggb ttt ca'3	29 bp	?°C	43 %
2*	Bv_deg_rev	5'tma caa cac cyt cdc cra aha cma gac tgt a'3	31bp	?°C	44%
<u>Konsensus-Primer:</u>					
3*	pcC_for	5'atc ttc ctt tat gtt ggt atg gat gcc'3	27 bp	59°C	40 %
4*	pcC_rev	5'acc aaa cac cac tgt get gaa aag'3	24 bp	57°C	45 %
<u>Standard-Primer:</u>					
<i>forward Primer</i>					
5*	Ec30(20)_for	5'cca ccg att ata ttc aat gc'3	20 bp	55°C	33 %
6*	EcIII (20)_for	5'ttc ggc gag ggt gtt gtt aa'3	32 bp	64°C	40 %
7*	start 2_for	5'gtg aag aag aag caa ttt ttc'3	21 bp	46°C	33 %
8*	start 5_for	5'act taa gtg gaa caa ttc agc'3	21 bp	46°C	38 %
9*	M4_for	5'tca tct tct tga gga gaa tgc atg gat gaa'3	30 bp	64°C	40 %
10*	bank 49 start	5'atg atg gag gaa gta atg atg aat aat ata'3	33 bp	64°C	45 %
11*	nested amilorid_for	5'cag gag gaa caa gtt cac gtt tat tag tgt'3	30 bp	59°C	40 %
<i>reverse Primer</i>					
6*	EcIII(20)_rev	5'tta aca aca ccc tgc ccg aa'3	20 bp	57°C	50 %
8*	start 5_rev	5'gct gaa ttg ttc cac tta agt'3	20 bp	46 °C	38 %
12*	C4_rev	5'cca aat acc act gtg ctg aaa aga aca aca gt'3	32 bp	64°C	24 %
13*	C5_rev	5'gta ctg gtt atc ata ata gca ttt cca cgt ag'3	32 bp	58°C	40 %

Tabelle 3: Liste der in der Standard-PCR verwendeten Primer

## Race-Primer

Adapter-Primer					
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	GC %	
Marathon <sup>®</sup> Adapter-Primer:					
AP1	5'cca tcc taa tac gac tca cta tag ggc'3	27 bp	57°C	48 %	
AP2	5'act cac tat agg gct cga gcg gc'3	23 bp	60°C	56 %	
5'Race-Primer					
<u>EcNHX1</u>					
15*:	5'Race_Ec30/EcIII_rev	5'gtgt agc acc taa cga aac aat tgc gaa gg'3	30 bp	65°C	46 %
	nested 5'Race_Ec30/EcIII_rev	5'gaa tac caa tgt acc aac aac acc aaa cag c'3	31 bp	65°C	45 %
16*:	N-Term_rev	5'gga ttc gtt cac cca teg att ctc ctc'3	27 bp	64°C	51 %
	nested N-Term_rev	5'tct cct caa gaa gat gac caa taa caa cag a'3	31 bp	61°C	38 %
17*:	M9_rev	5'gag cac cac tga tgt ggc gtc att gac aac acc'3	33 bp	73°C	54%
	nested M9_rev	5'tat agt tcc gat tgc aag ata atc ggc gat a'3	31 bp	64°C	38%
18*:	M12_rev	5'aga acc aat att cat tct tct aag tat ttg'3	30 bp	53°C	26%
	nested M12/1_rev	5'aca att gcg aag gat acc aat gta cca act'3	30 bp	63°C	40%
<u>EcNHX2</u>					
19*:	M8_rev	5'cca ccg acg tag cat cgt taa cga ctc ctt ccc'3	34 bp	74°C	58 %
	nested M8_rev	5'aag tag tgg ttc atc ttg att tag cac'3	31 bp	60°C	38 %
<u>EcNHX4</u>					
20*:	M11_rev	5'agg acc gat atc caa cct ctt aaa tat ttc'3	30 bp	59°C	36 %
	nested M11/1_rev	5'atg gtg gca aag gat att aat gtg cca act'3	30 bp	64°C	40 %

3'Race-Primer					
<u>EcNHX1</u>					
21*:	C6_for	5'ctc aat att act agg tct ggt ttt ggt c'3	28 bp	54°C	39 %
	nested C6_for	5'aaa ccc cgg ggg ata aaa tta cct ttc gg'3	29 bp	68°C	48 %
<u>EcNHX2</u>					
22*:	C7_for	5'ttc gat act gct agg gtt aat tct gat g'3	28 bp	57°C	39 %
	nested C7_for	5'gga atc cgg atg aaa agc tca gct taa at'3	29 bp	63°C	41 %
<u>EcNHX3</u>					
23*:	bank 49_3'Race_for	5'gaa gtc tcc taa tga taa aat tac ttt aag gc'3	32 bp	56°C	31 %
	nested bank 49_3'Race_for	5'atg atc aga ggt gca gta tct gtc gca ctt'3	30 bp	64°C	46 %
<u>EcNHX4</u>					
24*:	GW_3'End_1_for	5'cag ttc aca agg gca ggg cat act caa'3	27 bp	65°C	51 %
	nested GW_3'End_1_for	5'cta cgt gga aat gct att atg ata acc'3	27 bp	54°C	37 %
25*:	C8_for	5'ttc aat act gct agg ctt ggt tct ggt t'3	28 bp	61°C	42 %
	nested C8/3_for	5'ttt gat gcg agg cgc tgt gtc tat ggc act'3	30 bp	71°C	53 %
26*:	3'Final_for	5'ccc tgt gaa cct cct ccg tcc atc cag'3	27 bp	69°C	62 %
	nested 3'Final_for	5'cgc atg ctc ctt gct acc cca acc cat'3	27 bp	70°C	59 %

Tabelle 4: Liste der in der RACE-PCR verwendeten Primer

### 7.3.2 Semiquantitative RT-PCR

#### Isoformspezifische Primer

Die isoformspezifischen Primer wurden mit Hilfe des Primer3-Programms auf Basis der spezifischen C-Termini von EcNHX1-4 entworfen. Mit Hilfe des Clone Manager (Sci ED-Software) wurden Primer mit hohe Schmelztemperaturen entworfen, um unspezifische Primer-Bindungen auszuschließen. Die Primer laueteten wie folgt:

Isoformspezifische Primer					
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	Zyklen	Fragment
<u>EcNHX1:</u>					
RT_NHX1_for	5'agg tct ggt ttt ggt cgg ac'3	20 bp	58°C	29, 30	556 bp
RT_NHX1_rev	5' acc ctg cac gag gac tta gt'3	20 bp			
<u>EcNHX2:</u>					
RT_NHX2_for	5' tct gat ggg aag agc agc tt'3	20 bp	58°C	28, 29, 30	523 bp
RT_NHX2_rev	5' acc cag caa caa agg gaa ca '3	20 bp			
<u>EcNHX3:</u>					
RT_NHX3_for	5' ggt gag ctc agt att gct gg '3	20 bp	58°C	30, 31	525 bp
RT_NHX3_rev	5' taa acc ctc gcc ctc caa ac '3	20 bp			
<u>EcNHX4:</u>					
RT_NHX4_for	5' ggt ggg ctg gtt tga tgc ga '3	20 bp	58°C	30, 30	410 bp
RT_NHX4_rev	5' gga caa aac ctc gac cac ca '3	20 bp			
<u>Actin (EST:337427):</u>					
Actin_for	5'tat aat gag ctt cgt tgg c'3	19 bp	55 °C	30, 32, 33	300 bp
Actin_rev	5'cat gag cgc att gtc aaa t'3	19 bp			
<u>Histon H1:</u>					
HHT1_064_for	5'gct tct aag gct gcc aga aa'3	23 bp	55 °C	30	318 bp
HHT1_382_rev	5'cca act tga tat cct tct ttt tgg'3	20 bp			

Tabelle 5: Liste der in der RT-PCR verwendeten Primer

### 7.3.3 Kontroll-PCR (Flanken)

Die für die flankenübergreifende Kontroll-PCR verwendeten Primer sind wie folgt aufgelistet:

Kontroll-PCR (Flanken)				
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	GC %
<u>Vektor-Primer:</u>				
Kan_for	5'ggc gac ttt tga acg cgc aa'3	20 bp	61 °C	55
p35S_rev	5'tcc tcg gat tcc att gcc ca'3	20 bp	60 °C	55
<u>Zielsequenz Nr.1:</u>				
Insert_Bv_rev	5'aat cgg cga tct cca aag aa'3	20 bp	54 °C	45
<u>Zielsequenz Nr.2:</u>				
pcC_for	5'atc ttc ctt tat gtt ggt atg gat gcc'3	27 bp	59 °C	40

Tabelle 6: Liste der in der Kontroll-PCR verwendeten Primer

### 7.3.4 Kolonie-PCR

Für die Selektion erfolgreich Plasmid-tragender *E.coli*-Kolonien wurden je nach Vektor unterschiedliche Primer und Antibiotika eingesetzt. Eine Übersicht lautet wie folgt:

Vektorspezifische Primer			
Bezeichnung	Sequenz	Länge	Selektion
<b>pDrive-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>Kanamycin</b>
M13 forward (-20)	5'gta aaa cga cgg cca g'3	16 bp	
<i>reverse Primer</i>			
M13 reverse	5'cag gaa aca gct atg ac'3	17 bp	
<b>pJET1.2/blunt-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>Ampicillin</b>
pJET1.2 forward	5'cga ctc act ata ggg aga gcg gc'3	23 bp	
<i>reverse Primer</i>			
pJET1.2 reverse	5'aga aca tgc att ttc cat ggc agc'3	24 bp	
<b>pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>Spectinomycin</b>
GW1	5'gtt gca aca aat tga tga gca atg c'3	25 bp	
<i>reverse Primer</i>			
GW2	5'gtt gca aca aat tga tga gca att a'3	25 bp	
<b>pK7GWIWG2(II)-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>Spectinomycin</b>
4F	5'ttg cgg act cta gca tgg'3	18 bp	
2F	5'aac ctt acc tca tca ttt'3	18 bp	
<i>reverse Primer</i>			
3R	5'atc aca tag tgc ggc cgc c'3	18 bp	
1R	5'aca tta caa ttt act att'3	18 bp	
<b>BlueKSm-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>Ampicillin/ lacZ</b>
M13forward (-20)	5'gta aaa cga cgg cca g'3	16 bp	
<i>reverse Primer</i>			
M13 reverse	5'cag gaa aca gct atg ac'3	17 bp	
<b>p416GAL1-Vektor:</b>			
<i>forward Primer</i>			<b>-URA3</b>
GAL1	5'ggg gta att aat cag cga agc gat'3	24 bp	
<i>reverse Primer</i>			
p35S	5'tcc tcg gat tcc att gcc ca'3	20 bp	

Tabelle 7: Liste der vektorspezifischen Primer zur Anwendung in der Kolonie-PCR

### 7.3.5 In-Fusion<sup>®</sup>HD Klonierung

Die in der In-Fusion<sup>®</sup>HD-Klonierung verwendeten Primer zur Klonierung der vollständigen EcNHX1-Sequenz und Anfügen der XbaI/EcoRI-Schnittstellen wurden mit Hilfe des folgenden Programms (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>) konstruiert. Sie lauteten wie folgt:

<b>In-Fusion Primer</b>				
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	GC %
<u>EcNHX1:</u>				
5'UTR_for	5'gga tca tca taa gtt gag ttg aga atg gaa atg'3	33 bp	63 °C	36 %
3'UTR_rev	5'ata agc ttc ttg aat cag tta ccc tgc acg ag'3	32 bp	63 °C	40 %
Infusion 1_for	5'tgg cgg ccg ctc tag aat gga aat gtt gat gaa tct'3	36 bp	77°C	47 %
Infusion 2_rev	5'gct tga tat cga att ctt acc ctg cac gac gac tta'3	36 bp	69°C	44 %

Tabelle 8: Liste der in der In-Fusion HD Klonierung verwendeten Primer

### 7.3.6 Klonierung der EcNHX2-4-ORF's

Die für die Klonierung der vollständigen EcNHX2-4 Sequenzen und anschließenden Anfügen der XbaI/XhoI-Schnittstellen verwendeten Primer lauteten wie folgt:

<b>Primer zur EcNHX2-4-Klonierung</b>				
Bezeichnung	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub>	GC %
<u>EcNHX2:</u>				
<i>forward Primer</i>				
EcNHX2_start_for	5'atg gct ctc gat ctt ggc tct gtt tgc'3	27 bp	65°C	51 %
EcNHX2_XbaI_for	5'ggg tct aga atg gct ctc gat ctt ggc tc'3	29 bp	66°C	55 %
<i>reverse Primer</i>				
EcNHX2_stop_rev	5'tta gct ttg tgt ttg cgt ttg tgt ttc'3	27 bp	60°C	37 %
EcNHX2_XhoI_rev	5'atc tgc agt tag ctt tgt gtt tgc gtt tg'3	29 bp	63°C	41%
<u>EcNHX3:</u>				
<i>forward Primer</i>				
EcNHX3_start_for	5'atg atg gag gaa gta atg atg aat aat ata'3	33 bp	55°C	24 %
EcNHX3_XbaI_for	5'cgt cta gaa tga tgg agg aag taa tga tg'3	29 bp	59°C	41 %
<i>reverse Primer</i>				
EcNHX3_stop_rev	5'tta cca tgg acg aac act ttg ttc agt t'3	28 bp	60°C	39 %
EcNHX3_XhoI_rev	5'acc tgc agt tac cat gga cga aca ct'3	26 bp	60°C	50 %
<u>EcNHX4:</u>				
<i>forward Primer</i>				
EcNHX4_start_for	5'atg gct ttt gag ctt ggc tct gtt ttc tct'3	30 bp	65°C	43 %
EcNHX4_XbaI_for	5'tat tct aga atg gct ttt gag ctt ggc tct'3	30 bp	62°C	40 %
<i>reverse Primer</i>				
EcNHX4_stop_rev	5'tca aga tct ctg taa agt tat tgg tgt ttg tgg'3	33 bp	62°C	36 %
EcNHX4_XhoI_rev	5'cgc ctc gag tca aga tct ctg taa agt tat'3	30 bp	61°C	43 %

Tabelle 9: Liste der Primer zur Klonierung der für EcNHX2-4 codierenden Sequenzen

## 7.4 Puffer und Marker zur Anwendung in:

### 7.4.1 DNA-Elektrophorese

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Stammlösungen für die DNA-Elektrophorese in Agarosegelen lauteten wie folgt:

**Ethidiumbromid-Stammlösung:**

Ethidiumbromid	10 mg
Ethanol 96% (V/V)	1 ml

**50x TAE-Puffer:**

Tris	121g
Na <sub>2</sub> EDTA	9,3g
Essigsäure	28,5ml
ddH <sub>2</sub> O	add 500 ml
	pH 8,3

**1x TAE-Puffer:**

50x TAE- Puffer	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	add 1 liter

**10xLadepuffer:**

Na <sub>2</sub> EDTA	80mM
Glycerol	50% (V/V)
Bromphenolblau	0,4% (m/V)
Xylencyanol	0,4% (m/V)

Die verwendeten DNA-Größenmarker sind im Folgenden aufgeführt:

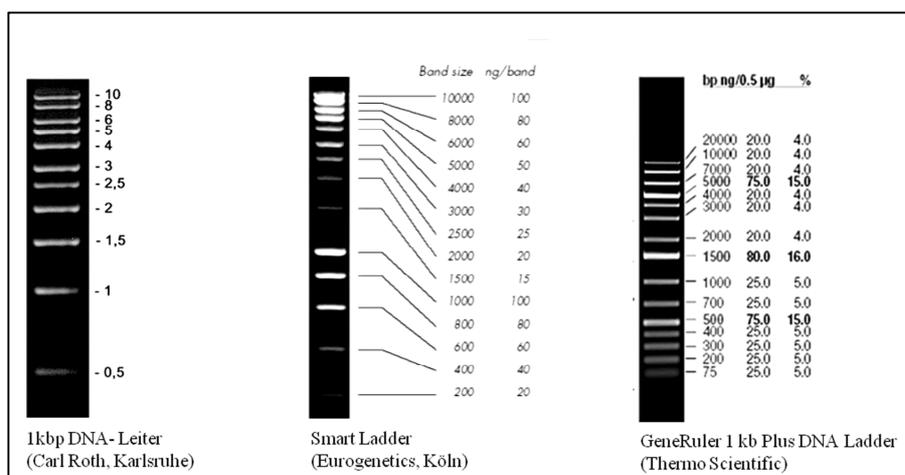


Abbildung 52: DNA-Größenmarker

### 7.4.2 Extraktion von Membranproteinen aus Hefe

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Extraktion von Membranproteinen aus Hefezellen lautet wie folgt:

<u>B60-Puffer:</u>	HEPES	50 mM
	Kaliumacetat	60 mM
	Magnesiumacetat	5 mM
	Glycerophosphat	20 mM
	Natriumfluorid	1 mM
	DTT	1 mM
	Glycerol	10 % (m/V)
	Triton X 100	0,05 % (m/V)
	<u>Proteinase Inhibitor complete</u>	1 Tbl.
	mit KOH	pH 7,3
<u>CHS-Stammlösung:</u>	CHS*	1 % (m/V)
	CHAPS*	6 % (m/V)
	B60- Puffer	
<u>CHS-Puffer:</u>	CHS-Stammlösung	20 µl
	B60-Puffer	80 µl

\* CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, CHS = Cholesterylhemisuccinat

### 7.4.3 Extraktion von Tonoplasten-Proteinen aus Pflanzenzellen

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Extraktion von Tonoplasten-Proteinen aus Pflanzenzellen lautet wie folgt:

<u>Homogenisierungsmedium:</u>	Sorbitol	0,25 M
	Tris- acetat, pH 7,5	50 mM
	PVP*	1 % (m/V)
	EGTA-Lösung, 0,1 M (pH 7,5)	1 mM
	DTT*	2 mM
	ρ-APMSF*-Stammlösung	20 µM
<u>Sucrose/Tris-Puffer:</u>	Sucrose	0,5 M
	Tris-acetat, pH 7,5	20 mM
	EGTA-Lösung, 0,1 M (pH 7,5)	1 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM
	DTT*	2 mM
<u>Sorbitol/Tris-Puffer:</u>	Sorbitol	0,25 M
	Tris-acetat, pH 7,5	20 mM
	EGTA-Lösung, 0,1 M (pH 7,5)	1 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM
	DTT*	2 mM
<u>ρ-APMSF-Stammlösung:</u>	ρ-APMSF*	20 mM
	DMSO	

- erst vor Gebrauch zusetzen -

(\*) ρ-APMSF=4-Amidinophenylmethansulfonylfluorid; EGTA=Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure; DTT=Dithiothreitol; PVP= Polyvinylpyrrolidon

### 7.4.4 SDS-PAGE

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Durchführung der SDS-PAGE lautet wie folgt:

<u>5x Ladepuffer:</u>	Tris/HCl, pH 8,0	0,25 M
	Glycerol	25 % (m/V)
	SDS*-Lsg., 20% (m/V)	7,5 % (V/V)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	12,5 % (V/V)
	Bromphenolblau	2,5 mg

<u>10x Laufpuffer:</u>	Tris	0,25 M
	Glycin	2,5 M
	SDS*	1 % (m/V)

<u>Sammelgel (6 %):</u>	Rotiphorese <sup>®</sup> 30 (Roth)	0,67 ml
	SG-Puffer	1,0 ml
	ddH <sub>2</sub> O	2,33 ml
	APS*-Lsg., 10 % (m/V)	40,0 $\mu$ l
	TEMED*	8,0 $\mu$ l

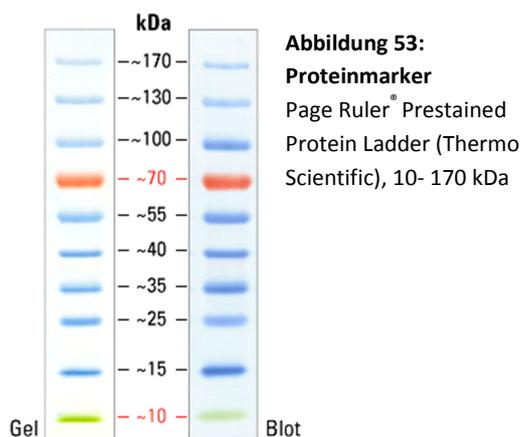
<u>Trenngel (12 %):</u>	Rotiphorese <sup>®</sup> 30 (Roth)	4,0 ml
	TG- Puffer	2,5 ml
	ddH <sub>2</sub> O	3,5 ml
	APS*- Lsg., 10 % (m/V)	100,0 $\mu$ l
	TEMED*	20,0 $\mu$ l

<u>SG-Puffer:</u>	Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 M
	SDS*- Lsg., 20 % (m/V)	0,4 % (V/V)
	pH 6,8	

<u>TG-Puffer:</u>	Tris/HCl (pH 8,8)	2,0 M
	SDS*-Lsg., 20 % (m/V)	0,5 % (V/V)
	pH 8,8	

\* SDS = Sodiumdodecylsulfat, APS = Ammoniumsulfat, TEMED = Tetramethylethylendiamin

Als Protein-Größenmarker diente der im Folgenden beschriebene Marker:



### 7.4.5 Immuno-Detektion

Die in der Immuno-Detektion verwendeten Puffer und Antikörper-Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>1x TBST-Puffer:</u>	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05 % (m/V)
<u>Primärantikörper-Lösung:</u>	$\alpha$ - AtNHX1- Antikörper (aus Hase)	1:500
	Milchpulver	2,5 % (m/V)
	in TBST- Puffer	
<u>Sekundärantikörper-Lösung:</u>	$\alpha$ -rabbit-Antikörper	1: 3000
	Milchpulver	2,5 % (m/V)
	in TBST-Puffer	

---

HRP\* =horse raddish peroxidase ( Meerrettich-Peroxidase)

## 7.5 Reaktionsansätze:

### 7.5.1 Kontroll-PCR (Flanken)

Die Bedingungen für die PCR als Transformationsnachweis von *Eschscholzia californica* lauteten wie folgt:

<u>Mastermix:</u>	gen.DNA	150 ng
	10x PCR- Reaktionspuffer	2,0 $\mu$ l
	forward Primer, 100 $\mu$ M (1:5)	1,0 $\mu$ l
	reverse Primer, 100 $\mu$ M (1:5)	1,0 $\mu$ l
	dNTPs (10mM)	0,4 $\mu$ l
	<i>segenetic</i> Taq Polymerase	0,2 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	add 20 $\mu$ l
<u>PCR-Programm:</u>	94°C	7 min
	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
		x 1
		x 35
		x 1

### 7.5.2 In-Fusion<sup>®</sup>HD-Klonierung

Der Ansatz zum für den Restriktionsverdau des pBlueScript II-Vektors lautete wie folgt:

<u>Restriktionsverdau:</u>	Tango-Puffer	12 $\mu$ l
	XbaI (Fast <sup>®</sup> Digest)	2 $\mu$ l
	EcoRI (Fast <sup>®</sup> Digest)	1 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l
	pBKS (260 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
	Gesamtansatz	60 $\mu$ l

Die Bedingungen der ersten PCR zur klonierung der vollständigen EcNHX1- Sequenzen lauteten wie folgt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	cDNA (1:100)	5,0 µl	
	5'UTR_for, 100 µM (1:5)	1,0 µl	
	3'UTR_rev, 100 µM (1:5)	1,0 µl	
	10x <i>Pfu</i> Buffer + MgSO <sub>4</sub>	2,0 µl	
	dNTP Mix (10mM)	0,5 µl	
	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5u/µl)	0,2 µl	
	<hr/>		
ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl		
<u>PCR-Programm:</u>	95°C	5 min	x 1
	95°C	45 sec	
	50°C	45 sec	
	72°C	1,5 min	x 40
	72°C	10 min	x 1

Die Bedingungen für die zweite PCR zum Anfügen der XbaI/EcoRI-Schnittstellen lauteten wie folgt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	PCR- Produkt (1:10)	5,0 µl	
	Infusion 1, 100 µM	0,5 µl	
	Infusion 2, 100 µM	0,5 µl	
	5x HF Buffer	10,0 µl	
	dNTP Mix (10mM)	0,5 µl	
	Phusion DNA Polymerase (2u/µl)	0,5 µl	
	<hr/>		
ddH <sub>2</sub> O	add 50 µl		
<u>PCR-Programm:</u>	98°C	5 min	x 1
	98°C	10 sec	
	50°C	30 sec	
	72°C	45 sec	x 40
	72°C	10 min	x 1

Die eigentliche In-Fusion<sup>®</sup>HD-Klonierung erfolgte nach folgendem Ansatz:

<u>In-Fusion®HD- Klonierung:</u>	5x HD In-Fusion Enzyme Premix	2 µl
	linear. pBKS <i>XbaI/EcoRI</i> (90 ng/µl)	2 µl
	In-Fusion-Produkt (30-40 ng/µl)	4 µl
	ddH <sub>2</sub> O	2 µl
	<hr/>	
Gesamtansatz	10 µl	

### 7.5.3 Klonierung der EcNHX2-4-ORF's

Die Bedingungen der PCR zur Amplifizierung der vollständigen EcNHX2-4 Sequenzen lauteten wie folgt:

<u>PCR- Ansatz:</u>	cDNA (1:100) bzw. PCR-Produkt (1:10)	5 µl
	5x HF Buffer	4 µl
	EcNHX_start_for, 100 µM	0,5 µl
	EcNHX_stop_rev, 100 µM	0,5 µl
	dNTPs, 10 mM	0,4 µl
	Phusion DNA Polymerase (2 u/µl)	0,2 µl
	<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl	

<u>PCR-Programm:</u>	98°C	30 sec	x 1
	98°C	10 sec	
	60°C	30 sec	
	72°C	1 min	x 35
	72°C	10 min	x 1

Das Anfügen der Restriktionsschnittstellen XbaI und XhoI an die amplifizierten EcNHX2-4-Fragmente wurde nach folgendem Ansatz und dem gleichen PCR-Programm (s.o.) durchgeführt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	EcNHX-ORF (1:10)	5 µl
	5x HF Buffer	10 µl
	EcNHX_XhoI_for, 100 µM	0,5 µl
	EcNHX_XbaI_rev, 100 µM	0,5 µl
	dNTPs, 10 mM	1,0 µl
	Phusion DNA Polymerase (2 u/µl)	0,5 µl
	ddH <sub>2</sub> O	add 50 µl

## 7.6 Vektorkarten:

### 7.6.1 Destination-Vektor

Der pK7GWIWG2(II)-Vektor wird durch folgende Vektor-Karte beschrieben:

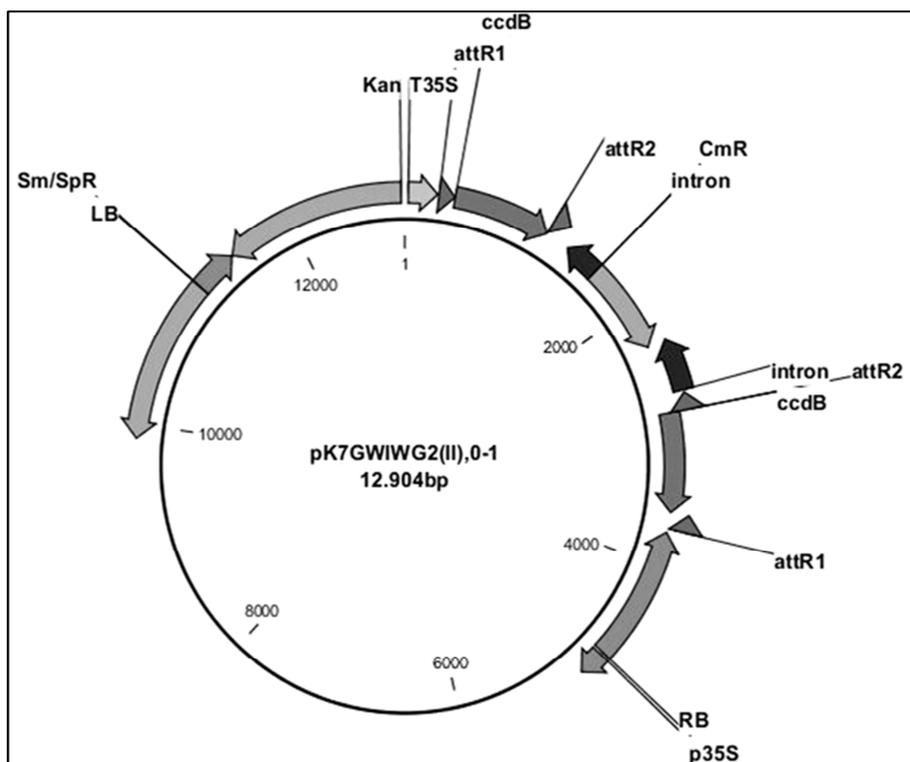


Abbildung 54: Vektorkarte des RNAi-vermittelnden pK7GWIWG2(II)-Vektors

## 7.6.2 Hefe-Expressionsvektor

Der p416GAL1-Vektor (Mumberg et al., 1994) wird durch folgende Vektor-Karte beschrieben:

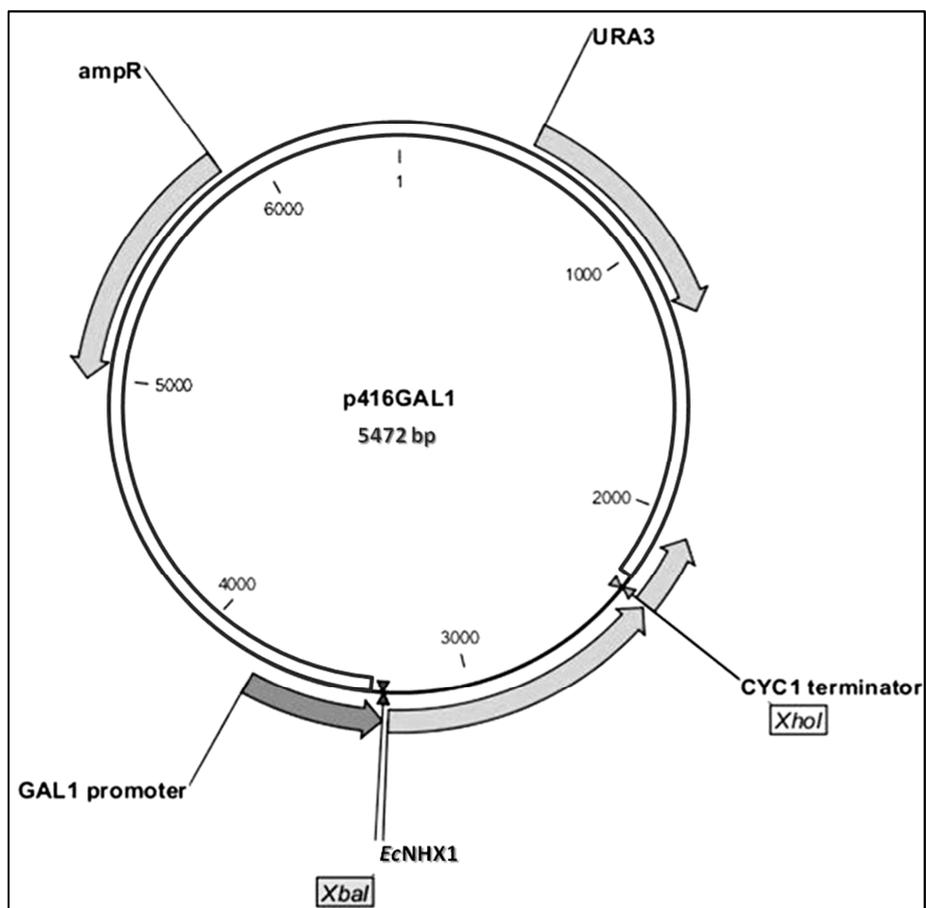


Abbildung 55: Vektorkarte des p416GAL1-Expressionsvektors für die heterologe Genexpression in Hefe

## 7.7 Verwendete Spezies in Chanroj et al., 2012:

## 7.7.1 Abbildung 1

Tabelle 10: Tab.1 aus dem supplemental data von Chanroj et al., 2012 wurde hier in die Abschnitte I-IV unterteilt (aus <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract>)

I					
TabS1-sumlist1d-jan24-12					
Gene Name	Species (Common Name)	Seq. ID	Protein/Gene ID No.	CPA Gene Fam	(eu/pro)
<b>1. CPA1 (Cation/proton antiporter superfamily 1)</b>					
<b>1.1. NhaP/SOS1</b>					
<b>1.1.a. Prokaryote NhaP</b>					
EcNhaP	Escherichia coli str. K12 substr. W3110	578	BAA36046.2	CPA1/NHA	p
KpNhaP	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578	577	A6TAW2.1	CPA1/NhaP	p
MetjaNAH1	Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661	426	Q60362	CPA1/NhaP1	archae
MetjaNAH2	Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661	422	Q58916	CPA1/NhaP2	archae
SeNhaP	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee str. CDC 577	577	ZP_04655971.1	CPA1/NhaP	p
<b>1.1.b. Cyanobacteria NhaP</b>					
Ava_1069	Anabaena variabilis ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	517	Q3ME93	CPA1/NhaP2	p-c
Ava_2041	Anabaena variabilis ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	520	Q3MBH3	CPA1/NhaP1	p-c
Ava_2740	Anabaena variabilis ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	629	Q3M9I3	CPA1/NhaP	p-c
CyaNhaP	Cyanothece sp. PCC 7424	641	ACK69888.1	CPA1	p-c
CyaNhaP1	Cyanothece sp. ATCC 51142	522	YP_001803311.1	CPA1	p-c
CyaNhaP2	Cyanothece sp. ATCC 51142	540	ACB53401.1	CPA1	p-c
GviNhaP	Gloeobacter violaceus PCC 7421	437	NP_924705.1	CPA1/NhaP	p-c
NosNhaP1	Nostoc punctiforme PCC 73102	523	ACC80804.1	CPA1/NhaP	p
NosNhaP2	Nostoc punctiforme PCC 73102	517	ACC84670.1	CPA1/NhaP	p
SynNhaP1	Synechocystis sp. PCC 6803	527	NP_441245.1	CPA1/NhaP	p-c
SynNhaP2	Synechocystis sp. PCC 6803	540	NP_441812.1	CPA1/NhaP	p-c
<b>1.1.c. Eukaryote NhaP</b>					
ScNHA1	Saccharomyces cerevisiae S288c (budding yeast)	985	NP_013239.1	CPA1/NHA	e-fungi
AtSOS1/NHX7	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	1147	AT2G01980.1	CPA1/NhaP	e-plant
AtNHX8	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	757	AT1G14660.1	CPA1/NhaP	e-plant
CreNHX5	Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green alga)	2265	Cre01.g034150.t1.2	CPA1/NhaP-NHX	e-plant
OsaNHX7	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	1149	LOC_Os12g44360.2	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
PpaNHX8	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	1154	Pp1s12_8V6.1	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
PpaNHX9	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	1061	Pp1s15_101V6.1	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
SmoNHX6	Selaginella moellendorffii (club moss), early vascular plant	1025	74518	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
SmoNHX7	Selaginella moellendorffii (club moss), early vascular plant	940	75049	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
VcaNHX5	Volvox carteri (green alga), Volvocales (Chlorophyte)	2291	94755	CPA1/NhaP-SOS	e-plant
<b>1.2. Eukaryote NHX/NHE</b>					
<b>1.2.a. Intracellular NHX</b>					
DhNHX1	Debaryomyces hansenii (fungi)	671	AAT37494.2	CPA1/NHX	e-fungi
KINHX1	Kluyveromyces lactis (fungi)	614	CAH02001.1	CPA1/NHX	e-fungi
ScNHX1	Saccharomyces cerevisiae S288c (budding yeast)	633	Q04121.1	CPA1/NHX-IC	e-fungi
AtNHX5	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	522	AT1G54370.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
AtNHX6	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	536	AT1G79610.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
CreNHX2	Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green alga)	767	Cre13.g589800.t1.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
CreNHX3	Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green alga)	836	Cre02.g144550.t1.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
CreNHX4	Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green alga)	796	Cre16.g671250.t1.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
OsaNHX5	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	550	LOC_Os09g11450.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
OsaNHX6	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	462	LOC_Os09g30446.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
PpaNHX5	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	574	Pp1s233_97V6.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
PpaNHX6	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	617	Pp1s158_27V6.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
PpaNHX7	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	544	Pp1s78_189V6.1	CPA1/NHX-endo	e-plant
SmoNHX4	Selaginella moellendorffii (club moss), early vascular plant	488	163708	CPA1/NHX-endo	e-plant
SmoNHX5	Selaginella moellendorffii (club moss), early vascular plant	500	76526	CPA1/NHX-endo	e-plant
VcaNHX4	Volvox carteri (green alga), Volvocales	517	90258	CPA1/NHX-endo	e-plant
<b>1.2.b. Vacuolar NHX</b>					
DicdiNhe1	Dictyostelium discoideum AX4 (slime mold), protist	674	Q552S0.1	CPA1/NHE	e-protist
DicdiNhe2	Dictyostelium discoideum AX4 (slime mold), protist	687	ADV31333.1	CPA1/NHE	e-protist
AtNHX1	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	539	AT5G27150.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
AtNHX2	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	547	AT3G05030.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
AtNHX3	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	530	AT5G55470.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
AtNHX4	Arabidopsis thaliana var Col. (thale cress) plant-dicot	504	AT3G06370.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
CreNHX1	Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green alga)	745	Cre12.g526701.t1.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
OsaNHX1	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	536	LOC_Os07g47100.2	CPA1/NHX-vac	e-plant
OsaNHX2	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	546	LOC_Os11g42790.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
OsaNHX3	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	545	LOC_Os05g05590.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
OsaNHX4	Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot	529	LOC_Os06g21360.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
PpaNHX1	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	560	Pp1s31_203V6.1	CPA1/NHX-vac	e-plant
PpaNHX2	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	548	Pp1s207_23V6.2	CPA1/NHX-vac	e-plant
PpaNHX3	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	562	Pp1s169_48V6.2	CPA1/NHX-vac	e-plant
PpaNHX4	Physcomitrella patens (moss), non-vascular plant	564	Pp1s113_117V6.2	CPA1/NHX-vac	e-plant

## II

SmoNHX1	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	546	230648	CPA1/NHX-vac	e-plan
SmoNHX2	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	518	231555	CPA1/NHX-vac	e-plan
SmoNHX3	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	315	97180	CPA1/NHX-vac	e-plan
<b>2. CPA2</b>					
<b>2.1a. Prokaryote &amp; Eukaryote NhaA, KEF/KEA</b>					
CaNapA	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	393	NP_347084.1	CPA2/KEA	p
EhNapA	<i>Enterococcus hirae</i>	383	AAA24781.1	CPA2/KEA	p
BcGerN	<i>Bacillus cereus</i> Q1	387	ACM12098.1	CPA2/Kef	p
BcGerN	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	387	AF246294_2 ? But in colour	CPA2/Kef	p
CbGerN	<i>Clostridium botulinum</i> E3 str. Alaska E43]	410	YP_001921374.1	CPA2/Kef	p
EcKefB	<i>Escherichia coli</i> str. K12 substr. W3110	601	BAE77940.1	CPA2/Kef	p
EcKefC	<i>Escherichia coli</i> str. K12 substr. W3110	620	BAB96615.1	CPA2/Kef	p
KpKefB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884	601	EEW38651.1	CPA2/Kef	p
KpKefC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	621	YP_002240489.1	CPA2/Kef	p
SeKefB	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125	601	YP_002245350.1	CPA2/Kef	p
SeKefC	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Paratyphi A str. AKI	620	YP_002140929.1	CPA2/Kef	p
MjNAP	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	388	Q58671.1	CPA2/NapA	p
EcNhaA	<i>Escherichia coli</i> str. K12 substr. W3110	388	BAB96592.1	CPA2/NHA	p
KpNhaA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. rhinoscleromatis ATCC 13884	407	ZP_06017981.1	CPA2/NhaA	p
SeNhaA	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhi	388	CAD01194.1	CPA2/NhaA	p
VvNapA	<i>Victivallis vadensis</i> ATCC BAA-548	456	ZP_06241471.1	CPA2/KEA	p
OluNhaA	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901 (partial)	380	XP_001416499.1	CPA2/NhaA	euk
MpuNhaA	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545 (picoeukaryote alga)	490	XP_003059059	NhaA	euk
<b>2.1b. Cyanobacteria NapA, Kef, KEA</b>					
Ava_0089	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	543	Q3MH21	CPA2/Nha2	p-c
Ava_1464	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	485	Q3MD49	CPA2/NhaS3	p-c
Ava_2102	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	432	Q3MBB2	CPA2/Nha1	p-c
Ava_3029	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	453	Q3M8P7	CPA2/NhaS3	p-c
Ava_3086	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	773	Q3M8J1	CPA2/Kef/KEA	p-c
Ava_3545	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	681	Q3M784	CPA2/NhaS5	p-c
Ava_4587	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	712	Q3M4A2	CPA2/NhaS5	p-c
CyaNhaS3	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424	473	ACK73084.1	CPA2/NhaS3	p-c
CyaNhaS5	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	692	YP_003890098.1	CPA2/NhaS5	p-c
Gvi-S3-like	<i>Gloeobacter violaceus</i>	419	Q7NN97	CPA2/KEA	p-c
NosNhaS3	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	470	BAB73260.1	CPA2/NhaS3	p
NosNhaS5	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	712	NP_484700.1	CPA2/NhaS5	p
Synel-NhaS5	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	421	YP_171916.1	CPA2/KEA	p-c
SynNhaS3	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	461	NP_442262.1	CPA2/NhaS3	p-c
SynNhaS5/NapA	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	698	BAA10378.1	CPA2/KEA	p-c
<b>2.1c. Eukaryote KEA/Kef</b>					
Bos-TMCO3	<i>Bos taurus</i>	677	AAI40628.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
Brafi-KEA-II	<i>Branchiostoma floridae</i>	720	EEN49498.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
Ciona-TMCO3	<i>Ciona intestinalis</i> (tunicates)	606	XP_002124358.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
HsCRA_a	<i>Homo sapiens</i> (human)	677	EAX09212.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
HsCRA_c	<i>Homo sapiens</i> (human)	434	EAX09214.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
Triad-KEA-II	<i>Trichoplax adhaerens</i> (placozoa)	688	XP_002116276.1	CPA2/KEA-II	e-metazoa
AtKEA1	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	1193	AT1G01790.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
AtKEA2	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	1174	AT4G00630.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
AtKEA3	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	638	AT4G04850.1	CPA2/KEA-Ib	e-plant
AtKEA4	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	593	AT2G19600.1	CPA2/KEA-II	e-plant
AtKEA5	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	569	AT5G51710.1	CPA2/KEA-II	e-plant
AtKEA6	<i>Arabidopsis thaliana</i> var Col. (thale cress) plant-dicot	598	AT5G11800.1	CPA2/KEA-II	e-plant
CreKEA1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (unicellular green alga)	1062	Cre04.g220200.t1.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
CreKEA2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (unicellular green alga)	801	Cre16.g687450.t1.1	CPA2/KEA-Ib	e-plant
CreKEA3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (unicellular green alga)	876	Cre12.g493000.t1.1	CPA2/KEA-II	e-plant
PpaKEA1	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	1262	Pp1s2_217V6.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
PpaKEA2	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	1194	Pp1s262_91V6.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
PpaKEA3	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	1407	Pp1s31_202V6.1	CPA2/KEA-Ia	e-plant
PpaKEA4	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	981	Pp1s16_337V6.1	CPA2/KEA-Ib	e-plant
PpaKEA5	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	938	Pp1s114_83V6.1	CPA2/KEA-Ib	e-plant
PpaKEA6	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	628	Pp1s81_93V6.1	CPA2/KEA-II	e-plant
PpaKEA7	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	628	Pp1s113_104V6.1	CPA2/KEA-II	e-plant
SmoKEA1	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	627	127003	CPA2/KEA-1a	e-plant
SmoKEA2	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	613	51301	CPA2/KEA-Ib	e-plant
SmoKEA3	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	508	51970	CPA2/KEA-II	e-plant
SmoKEA4	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	472	62260	CPA2/KEA-II	e-plant

## III

OsaKEA1	<i>Oryza sativa</i> var <i>japonica</i> (rice) plant-monocot	1155	LOC_Os04g58620.1	CPA2-KEA-Ia	e-plant
OsaKEA2	<i>Oryza sativa</i> var <i>japonica</i> (rice) plant-monocot	792	LOC_Os12g42300.1	CPA2-KEA-Ib	e-plant
OsaKEA3	<i>Oryza sativa</i> var <i>japonica</i> (rice) plant-monocot	628	LOC_Os06g36590.1	CPA2-KEA-Iia	e-plant
VcaKEA1	<i>Volvox carteri</i> (green alga), Volvocales	584	61085	CPA2-KEA-Ia	e-plant
VcaKEA2	<i>Volvox carteri</i> (green alga), Volvocales	593	68169	CPA2-KEA-Ib	e-plant
VcaKEA3	<i>Volvox carteri</i> (green alga), Volvocales	765	94337	CPA2-KEA-II	e-plant
<b>2.2a. Prokaryote NhaS4/CHX</b>					
MyxaNhaS4	<i>Mycococcus xanthus</i> DK 1622 (gliding mycobacteria)	715	ABF92456.1	CPA2/NhaS4	p
<b>2.2b. Cyanobacteria NhaS4/CHX</b>					
Ava_1632	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (Nostoc sp. PCC 7937)	723	Q3MCN1	CPA2/NhaS4	p
GviNhaS4	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	736	BAC88753.1	CPA2/NhaS4	p
GviNhaS4-like	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	749	NP_925334.1	CPA2/NhaS4	p
NosNhaS4	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	736	ACC82770.1	CPA2/NhaS4	p
Synel-NhaS4	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	715	YP_171685	CPA2/NhaS4	p
SynNhaS4	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	410	NP_440311.1	CPA2/NhaS4	p
<b>2.2.c. Eukaryote CHX/KHA/NhaS4</b>					
AsporKha1	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 (fungi)	895	BAE55587.1	CPA2/KHA	e-fungi
DhKHA1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (fungi)	822	CAL69581.1	CPA2/KHA	e-fungi
DhNHA1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (fungi)	940	CAL45290.1	CPA2/KHA	e-fungi
KIKHA1	<i>Kluyveromyces lactis</i> (fungi)	781	CAH00437.1	CPA2/KHA	e-fungi
KINHA1	<i>Kluyveromyces lactis</i> (fungi)	901	CAH00898.1	CPA2/KHA	e-fungi
Neucr-KHA1	<i>Neurospora crassa</i> OR74A (filamentous fungi)	932	EAA31097.1	CPA2/KHA	e-fungi
ScKHA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c (budding yeast)	873	P40309.1	CPA2/KHA	e-fungi
SCHPO_KHA1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h- (fission yeast)	898	Q9P711.1	CPA2/KHA	e-fungi
Ustma_KHA1	<i>Ustilago maydis</i> 521 (fungi)	974	XP_760918.1	CPA2/KHA	e-fungi
DicdiNhe3	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 (slime mold), protist	786	ADV31334.1	CPA2/CHX-NhaS4	e-protist
DicdiNhe4	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 (slime mold), protist	1008	ADV31335.1	CPA2/CHX-NhaS4	e-protist
SpraCHX1	<i>Spirogyra praetensis</i> (green alga), Zygnematales (incomplete, 1:792)	792	spra-Contig421 (Delwiche)	CPA2/CHX	e-plant
PpaCHX1	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	845	Pp1s123_30V6.1	CPA2/CHX	e-plant
PpaCHX2	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	828	Pp1s162_22V6.1	CPA2/CHX	e-plant
PpaCHX3	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	889	Pp1s270_2V6.1	CPA2/CHX	e-plant
PpaCHX4	<i>Physcomitrella patens</i> (moss), non-vascular plant	952	Pp1s375_26V6.1	CPA2/CHX	e-plant
SmoCHX1	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	798	80221	CPA2/CHX	e-plant
SmoCHX2	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	796	231581	CPA2/CHX	e-plant
SmoCHX3	<i>Selaginella moellendorffii</i> (club moss), early vascular plant	775	50946	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX01	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	786	AT1G16380.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX02	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	784	AT1G79400.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX03	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	823	AT5G22900.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX04	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	818	AT3G44900.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX05	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	816	AT1G08150.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX06a	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	819	AT1G08140.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX06b	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	825	AT1G08135.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX07	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	618	AT2G28170.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX08	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	848	AT2G28180.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX09	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	801	AT5G22910.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX10	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	784	AT3G44930.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX11	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	672	AT3G44920.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX12	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	706	AT3G44910.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX13	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	832	AT2G30240.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX14	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	830	AT1G06970.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX15	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	822	AT2G13620.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX16	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	812	AT1G64170.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX17	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	821	AT4G23700.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX18	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	811	AT5G41610.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX19	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	801	AT3G17630.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX20	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	843	AT3G53720.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX21	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	736	AT2G31910.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX23	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	868	AT1G05580.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX24	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	860	AT5G37060.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX25	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	858	AT5G58460.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX26	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	780	AT5G01680.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX27	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	733	AT5G01690.1	CPA2/CHX	e-plant
AtCHX28	<i>Arabidopsis thaliana</i> var <i>Col.</i> (thale cress) plant-dicot	802	AT3G52080.1	CPA2/CHX	e-plant
OsaCHX01	<i>Oryza sativa</i> var <i>japonica</i> (rice) plant-monocot	831	LOC_Os02g58660.1	CPA2/CHX	e-plant
OsaCHX02	<i>Oryza sativa</i> var <i>japonica</i> (rice) plant-monocot	818	LOC_Os08g43690.1	CPA2/CHX	e-plant

IV						
OsaCHX03	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	828	LOC_Os09g37300.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX04	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	823	LOC_Os12g44300.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX05	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	835	LOC_Os05g39600.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX06	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	789	LOC_Os12g01820.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX07	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	802	LOC_Os11g01820.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX08	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	826	LOC_Os08g02450.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX09	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	840	LOC_Os12g02840.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX10	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	823	LOC_Os11g03070.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX11	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	454	LOC_Os05g31730.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX12	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	845	LOC_Os05g02240.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX13	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	781	LOC_Os03g61290.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX14	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	791	LOC_Os05g19500.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX15	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	803	LOC_Os12g42200.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX16	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	875	LOC_Os05g40650.1	CPA2/CHX		e-plant
OsaCHX17	<i>Oryza sativa var japonica (rice) plant-monocot</i>	876	LOC_Os01g60140.1	CPA2/CHX		e-plant
<b>2.2.d. Eukaryote CPA2- NHA family</b>						
HsNHA2	Homo sapiens (human), NHE10, NHEDC2	537	NP_849155.2	CPA2/NHA		e-metazoa

## 7.7.2 Abbildung 2

Tabelle 11: Tab. 2 aus dem supplemental data von Chanroj et al., 2012 wurde hier in die Abschnitte I-V unterteilt (aus <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00025/abstract>)

I			PF00027:C yclic PF00999: nucleotide- Na/H exch binding aa subclade			
Organism	Name	DbXref				
<b>Prokaryote</b>						
Escherichia coli str. K12	EcNhaP	BAA36046.2			578	
Klebsiella pneumoniae	KpNhaP	A6TAW2.1			577	
Salmonella enterica	SeNhaP	ZP_04655971.1			577	
Synechocystis sp. PCC 6803	SynNhaP1	NP_441245.1				
Synechocystis sp. PCC 6803	SynNhaP2	NP_441812.1				
<b>Fungi</b>						
Debaryomyces hansenii (fungi)	DhNHX1	AAT37494.2			671	AtNHX5/6
Kluyveromyces lactis (fungi)	KINHX1	CAH02001.1			614	AtNHX5/6
Saccharomyces cerevisiae S288	ScNHX1	Q04121.1			633	AtNHX5/6
<b>Protist/Ameoba</b>						
Dictyostelium discoideum AX4	DicdiNhe1	Q552S0.1			674	
	DicdiNhe2	ADV31333.1			687	
<b>I. Green Algae</b>						
Chlamy reinhardtii [Cre]	CreNHX1	Cre12.g526701.t1.1	(29 - 483)		744	AtNHX1/2/3/4
	CreNHX2	Cre13.g589800.t1.1	(29 - 456)		766	AtNHX5/6
	CreNHX3	Cre02.g144550.t1.1	(6 - 427)		835	AtNHX5/6
	CreNHX4	Cre16.g671250.t1.1	(31 - 493)		795	AtNHX5/6
	CreNHX5	Cre01.g034150.t1.2	(74 - 497)		2264	AtNHX7/8
	CreNHX6	Cre24.g769600.t1.1				AtNHX1/2/3/4
Volvox carteri [Vca]	VcaNHX1	34043			197	AtNHX1/2/3/4
	VcaNHX2	33849			200	AtNHX1/2/3/4
	VcaNHX3	34613			114	AtNHX5/6
	VcaNHX4	90258			516	AtNHX5/6
	VcaNHX5	94755	(54 - 485)		2290	AtNHX7/8
	VcaNHX?	87299			3165	AtNHX7/8

## II

II. Early land plants						
Physcomitrella patens [Ppa]	PpaNHX1	Pp1s31_203V6.1	(31 - 450)		559	AtNHX1/2/3/4
	PpaNHX2	Pp1s207_23V6.2	(31 - 445)		547	AtNHX1/2/3/4
	PpaNHX3	Pp1s169_48V6.2	(30 - 448)		561	AtNHX1/2/3/4
	PpaNHX4	Pp1s113_117V6.2	(30 - 447)		563	AtNHX1/2/3/4
	PpaNHX5	Pp1s233_97V6.1	(33 - 452)		573	AtNHX5/6
	PpaNHX6	Pp1s158_27V6.1	(32 - 440)		616	AtNHX5/6
	PpaNHX7	Pp1s78_189V6.1	(32 - 436)		543	AtNHX5/6
	PpaNHX8	Pp1s12_8V6.1	(25 - 441)	(758 - 848)	1153	AtNHX7/8
	PpaNHX9	Pp1s15_101V6.1	(30 - 380)	(698 - 788)	1060	AtNHX7/8
Selaginella moellendorffii [Smo]	SmoNHX1	230648	(31 - 449)		545	AtNHX1/2/3/4
	SmoNHX2	231555	(31 - 440)		517	AtNHX1/2/3/4
	SmoNHX3	97180	(1 - 315)		314	AtNHX1/2/3/4
	SmoNHX4	163708	(30 - 438)		487	AtNHX5/6
	SmoNHX5	76526	(33 - 441)		499	AtNHX5/6
	SmoNHX6	74518	(19 - 437)	(749 - 839)	1024	AtNHX7/8
	SmoNHX7	75049	(33 - 448)	(763 - 852)	940	AtNHX7/8
III. Monocot						
Brachypodium distachyon [Bdi]	BdiNHX1	Bradi1g18360.1	(31 - 450)		543	AtNHX1/2/3/4
	BdiNHX2	Bradi4g11500.1	(21 - 443)		543	AtNHX1/2/3/4
	BdiNHX3	Bradi2g36000.1	(25 - 444)		545	AtNHX1/2/3/4
	BdiNHX4	Bradi1g42740.1	(25 - 446)		528	AtNHX1/2/3/4
	BdiNHX5	Bradi4g27340.1	(41 - 496)		582	AtNHX5/6
	BdiNHX6	Bradi4g33420.1	(1 - 378)		463	AtNHX5/6
	BdiNHX7	Bradi4g17380.1	(12 - 385)		719	AtNHX7/8
	BdiNHX8	Bradi4g00290.1	(10 - 426)	(745 - 835)	1138	AtNHX7/8
Oryza sativa [Osa]	OsaNHX1	LOC_Os07g47100.2	(24 - 443)		535	AtNHX1/2/3/4
	OsaNHX2	LOC_Os11g42790.1	(22 - 444)		545	AtNHX1/2/3/4
	OsaNHX3	LOC_Os05g05590.1	(25 - 444)		544	AtNHX1/2/3/4
	OsaNHX4	LOC_Os06g21360.1	(26 - 434)		528	AtNHX1/2/3/4
	OsaNHX5	LOC_Os09g11450.1	(42 - 463)		549	AtNHX5/6
	OsaNHX6	LOC_Os09g30446.1	(85 - 407)		461	AtNHX5/6
	OsaNHX7	LOC_Os12g44360.2	(12 - 428)	(739 - 829)	1148	AtNHX7/8
Sorghum bicolor [Sbi]	SbiNHX1	Sb09g003590.1	(23 - 437)		540	AtNHX1/2/3/4
	SbiNHX2	Sb05g025700.1	(19 - 439)		541	AtNHX1/2/3/4
	SbiNHX3	Sb02g042190.1	(26 - 440)		442	AtNHX1/2/3/4
	SbiNHX4	Sb10g012140.1	(26 - 426)		509	AtNHX1/2/3/4
	SbiNHX5	Sb02g019500.1	(42 - 449)		536	AtNHX5/6
	SbiNHX6	Sb02g028040.1	(35 - 377)		476	AtNHX5/6
	SbiNHX7	Sb08g023290.1	(13 - 429)	(739 - 829)	1137	AtNHX7/8
Zea mays [Zma]	ZmaNHX01	GRMZM2G027851_T01	(26 - 445)		539	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX02	GRMZM2G063492_T01	(23 - 443)		546	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX03	AC233967.1_FGP003			596	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX04	GRMZM2G311165_T01	(20 - 391)		411	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX05	GRMZM2G037342_P02	(22 - 444)		546	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX06	GRMZM2G118019_T01	(27 - 448)		530	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX07	GRMZM2G420979_P02	(27 - 427)		428	AtNHX1/2/3/4
Zea mays [Zma]	ZmaNHX08	GRMZM2G067747_T01	(42 - 449)		536	AtNHX5/6
Zea mays [Zma]	ZmaNHX09	GRMZM2G013627_P02			383	AtNHX5/6
Zea mays [Zma]	ZmaNHX10	GRMZM2G098494_T01	(11 - 519)	(829 - 919)	1228	AtNHX7/8
		GRMZM2G137367_T01				
		GRMZM2G455171_T02				

## III

IV. Dicot						
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX1	AcoGoldSmith_v1.018625m	(21 - 441)		532	AtNHX1/2/3/4
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX2	AcoGoldSmith_v1.004054m	(5 - 395)		491	AtNHX1/2/3/4
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX3	AcoGoldSmith_v1.027697m	(28 - 454)		532	AtNHX1/2/3/4
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX4	AcoGoldSmith_v1.015115m	(21 - 444)		527	AtNHX1/2/3/4
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX5	AcoGoldSmith_v1.000299m	(35 - 450)	760 - 850	1150	AtNHX7/8
Aquilegia coerulea [Aca]	AcaNHX6	AcoGoldSmith_v1.002550m		226 - 316	588	AtNHX7/8
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX1	910883	(26 - 445)		542	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX2	477785	(24 - 443)		543	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX3	495630	(23 - 449)		535	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX4	896752	(29 - 444)		554	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX5	474702	(31 - 438)		523	AtNHX5/6
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX6	878087	(32 - 439)		536	AtNHX5/6
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX7	471645	(34 - 448)		756	AtNHX7/8
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX8	484121	(26 - 439)	747 - 837	1135	AtNHX7/8
Arabidopsis lyrata [Aly]	AlyNHX9	473579			667	AtNHX7/8
Arabidopsis thaliana [Ath]	AtNHX1	AT5G27150.1	(22 - 441)		538	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis thaliana	AtNHX2	AT3G05030.1	(24 - 443)		546	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis thaliana	AtNHX3	AT5G55470.1	(23 - 443)		529	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis thaliana	AtNHX4	AT3G06370.1	(29 - 444)		503	AtNHX1/2/3/4
Arabidopsis thaliana	AtNHX5	AT1G54370.1	(31 - 438)		521	AtNHX5/6
Arabidopsis thaliana	AtNHX6	AT1G79610.1	(32 - 438)		535	AtNHX5/6
Arabidopsis thaliana	AtNHX8	AT1G14660.1	(34 - 448)		756	AtNHX7/8
Arabidopsis thaliana	AtSOS1	AT2G01980.1	(37 - 450)	(759 - 849)	1146	AtNHX7/8
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX1	evm.model.supercontig_117.28	(28 - 424)		519	AtNHX1/2/3/4
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX2	evm.model.supercontig_16.109	(25 - 445)		542	AtNHX1/2/3/4
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX3	evm.model.supercontig_48.7	(16 - 407)		502	AtNHX1/2/3/4
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX4	evm.model.supercontig_9.167	(12 - 431)		524	AtNHX1/2/3/4
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX5	evm.model.supercontig_2.68		(327 - 417)	514	AtNHX7/8
Carica papaya [Cpa]	CpaNHX6	evm.model.supercontig_2.63	(4 - 298)		302	AtNHX7/8
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX1	orange1.1g023195m			286	AtNHX1/2/3/4
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX2	orange1.1g009645m	26-440		530	AtNHX1/2/3/4
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX3	orange1.1g043481m	26-351		351	AtNHX1/2/3/4
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX4	orange1.1g009116m	25-444		543	AtNHX1/2/3/4
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX5	orange1.1g010004m	20-438		520	AtNHX1/2/3/4
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX6	orange1.1g047772m	33-420		498	AtNHX5/6
Citrus sinensis [Csi]	CsiNHX7	orange1.1g001116m	37-452	761-851	1152	AtNHX7/8
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX1	clementine0.9_006811m	24-444		542	AtNHX1/2/3/4
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX2	clementine0.9_032254m	26-422		518	AtNHX5/6
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX3	clementine0.9_006788m	25-444		543	AtNHX1/2/3/4
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX4	clementine0.9_007221m	26-440		530	AtNHX1/2/3/4
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX5	clementine0.9_007507m	20-438		520	AtNHX1/2/3/4
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX6	clementine0.9_010388m		54-144	441	AtNHX7/8
Citrus clementina [Ccl]	CclNHX7	clementine0.9_004537m	37-452		653	AtNHX7/8
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX1	Cucsa.289150.1	(25 - 444)		532	AtNHX1/2/3/4
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX2	Cucsa.363260.1	(29 - 448)		553	AtNHX1/2/3/4
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX3	Cucsa.025160.1	(25 - 441)		535	AtNHX1/2/3/4
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX4	Cucsa.180750.1	(36 - 438)		437	AtNHX5/6
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX5	Cucsa.026490.1		(54 - 144)	443	AtNHX7/8
Cucumis sativus [Csa]	CsaNHX6	Cucsa.026500.1	(31 - 445)		635	AtNHX7/8

## IV

Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX1	Eucgr.B01758.1	25-444		541	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX2	Eucgr.B01263.1	27-441		538	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX3	Eucgr.H03765.1	24-442		536	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX4	Eucgr.H01210.1	27-446		562	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX5	Eucgr.H04454.1	1-332		427	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX6	Eucgr.F00635.1			419	AtNHX1/2/3/4
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX7	Eucgr.G02062.1	1-303	612-702	1001	AtNHX7/8
Eucalyptus grandis [Egr]	EgrNHX8	Eucgr.B02635.1		329-419	547	AtNHX7/8
Glycine max [Gma]	GmaNHX01	Glyma03g40290.1	(12 - 433)		530	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX02	Glyma19g42900.1	(10 - 431)		528	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX03	Glyma10g30020.1	(23 - 442)		544	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX04	Glyma20g37370.1	(25 - 444)		546	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX05	Glyma07g38160.1	(11 - 440)		515	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX06	Glyma17g02560.1	(18 - 434)		516	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX07	Glyma08g43620.1	(9 - 334)		416	AtNHX1/2/3/4
Glycine max [Gma]	GmaNHX08	Glyma07g40070.1	(23 - 435)		533	AtNHX5/6
Glycine max [Gma]	GmaNHX09	Glyma15g13030.1	(31 - 483)		580	AtNHX5/6
Glycine max [Gma]	GmaNHX10	Glyma09g02130.1	(31 - 483)		628	AtNHX5/6
Glycine max [Gma]	GmaNHX11	Glyma08g09730.1	(18 - 456)	(763 - 853)	1149	AtNHX7/8
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX1	cassava4.1_004969m	(28 - 447)		546	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX2	cassava4.1_005040m	(25 - 444)		543	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX3	cassava4.1_004488m	(53 - 472)		572	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX4	cassava4.1_024060m	(25 - 444)		540	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX5	cassava4.1_029003m	(24 - 443)		534	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX6	cassava4.1_030429m	(26 - 446)		544	AtNHX1/2/3/4
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX7	cassava4.1_005692m	(33 - 425)		515	AtNHX5/6
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX8	cassava4.1_002710m		(307 - 397)	703	AtNHX7/8
Manihot esculenta [Mes]	MesNHX9	cassava4.1_025141m		(415 - 504)	810	AtNHX7/8
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX1	Medtr7g140080.1	(1 - 374)		380	AtNHX1/2/3/4
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX2	Medtr8g139670.1	(23 - 443)		529	AtNHX1/2/3/4
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX3	Medtr3g076690.1	(31 - 450)		532	AtNHX1/2/3/4
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX4	Medtr1g099020.1	(21 - 408)		408	AtNHX1/2/3/4
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX5	Medtr1g099040.1	(26 - 415)		502	AtNHX1/2/3/4
Medicago truncatula [Mtr]	MtrNHX6	Medtr2g033740.1	(1 - 354)		486	AtNHX5/6
Mimulus guttatus [Mgu]	MguNHX01	mgv1a004101m	(26 - 442)		544	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX02	mgv1a023716m	(18 - 415)		528	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX03	mgv1a025551m	(21 - 440)		519	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX04	mgv1a021375m	(4 - 318)		319	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX05	mgv1a003973m	(33 - 449)		551	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX06	mgv1a021866m	(38 - 415)		517	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX07	mgv1a026386m	(1 - 340)		442	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX08	mgv1a026570m	(1 - 317)		419	AtNHX1/2/3/4
Mimulus guttatus	MguNHX09	mgv1a021839m	(30 - 477)		554	AtNHX5/6
Mimulus guttatus	MguNHX10	mgv1a001382m		(446 - 536)	828	AtNHX7/8
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX1	POPTR_0005s04660.1	(25 - 444)		544	AtNHX1/2/3/4
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX2	POPTR_0013s03220.1	(29 - 444)		545	AtNHX1/2/3/4
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX3	POPTR_0010s03270.1	(13 - 433)		529	AtNHX1/2/3/4
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX4	POPTR_0014s12940.1	(18 - 437)		528	AtNHX1/2/3/4
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX5	POPTR_0013s02760.1	(24 - 441)		538	AtNHX1/2/3/4
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX6	POPTR_0016s00210.1	(41 - 447)		537	AtNHX5/6
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX7	POPTR_0010s11130.1	(35 - 450)	(760 - 850)	1147	AtNHX7/8
Populus trichocarpa [Ptr]	PtrNHX8	POPTR_0008s14030.1	(35 - 450)	(760 - 850)	1145	AtNHX7/8

V						
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX1	ppa003943m	(29 - 444)		539	AtNHX1/2/3/4
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX2	ppa003745m			551	AtNHX1/2/3/4
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX3	ppa027158m	(27 - 445)		551	AtNHX1/2/3/4
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX4	ppa003873m	(26 - 445)		543	AtNHX1/2/3/4
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX5	ppa024846m	(24 - 430)		512	AtNHX1/2/3/4
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX6	ppa021856m	(30 - 517)		611	AtNHX5/6
Prunus persica [Ppe]	PpeNHX7	ppa000453m	(34 - 446)	(756 - 846)	1166	AtNHX7/8
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX1	30128.m008667	(28 - 444)		544	AtNHX1/2/3/4
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX2	29726.m003982	(25 - 444)		541	AtNHX1/2/3/4
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX3	29647.m002027	(24 - 443)		536	AtNHX1/2/3/4
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX4	30128.m008729	(192 - 612)		709	AtNHX1/2/3/4
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX5	27613.m000616	(21 - 439)		520	AtNHX1/2/3/4
Ricinus communis [Rco]	RcoNHX6	29780.m001381	(27 - 442)	(749 - 839)	1143	AtNHX7/8
Setaria italica [Sit]	SitNHX1	Si029437m	26-445		539	AtNHX1/2/3/4
Setaria italica [Sit]	SitNHX2	Si026186m	23-445		547	AtNHX1/2/3/4
Setaria italica [Sit]	SitNHX3	Si021674m	23-443		546	AtNHX1/2/3/4
Setaria italica [Sit]	SitNHX4	Si006276m	29-427		509	AtNHX1/2/3/4
Setaria italica [Sit]	SitNHX5	Si029445m	43-450		536	AtNHX5/6
Setaria italica [Sit]	SitNHX6	Si032249m	38-354		457	AtNHX5/6
Setaria italica [Sit]	SitNHX7	Si021022m	10-426	736-826	1160	AtNHX7/8
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX1	GSVIVT01021972001	(26 - 445)		540	AtNHX1/2/3/4
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX2	GSVIVT01011001001	(22 - 441)		538	AtNHX1/2/3/4
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX3	GSVIVT01017814001	(29 - 444)		541	AtNHX1/2/3/4
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX4	GSVIVT01000002001	(26 - 446)		541	AtNHX1/2/3/4
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX5	GSVIVT01037753001	(18 - 440)		524	AtNHX1/2/3/4
Vitis vinifera [Vvi]	VviNHX6	GSVIVT01011573001	(28 - 444)	(754 - 844)	1141	AtNHX7/8

## 7.8 Konservierte Domänen

Die Suche nach konservierten Domänen erfolgte mit dem Internetprogramm <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> mit Hilfe der *in silico* translatierten Proteinsequenzen der neu identifizierten NHX-ORF's aus *Eschscholzia californica* (siehe Kap.3.3.1). Das Ergebnis lautete wie folgt:

Bezeichnung	Domäne	Beschreibung
1. NhaP	[COG0025]	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter vom NhaP-Typ [anorganischerr Ionen-Transport und -Metabolismus]
2. KefB	[COG0475]	membranäre K <sup>+</sup> Transportsysteme vom Kef-Typ [anorganischerr Ionen-Transport und -Metabolismus]
2. 2a37	[TIGR00932]	Monovalente Kationen/Protonen Transporter der CPA2-Familie [Transport-und Bindeproteine, Kationen und Eisen tragende Bestandteile]
3. b_cpa1	[TIGR00840]	Monovalente Kationen/Protonen Antiporter der CPA1-Familie Spezifisches Model für eukaryotische Familienmitglieder
4. Na_H_Exchanger	[pfam00999]	Natrium/Hydrogen Austauscher (NHX)
5. a_cpa1	[TIGR00831]	Monovalente Kationen/Protonen Antiporter der CPA1- Familie Spezifisches Model für prokaryotische Familienmitglieder
6. PRK05326	[PRK05326]	Kalium/Protonen Antiporter
7. COG3263	[COG3263]	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter vom NhaP-Typ mit einer gleichen C-terminalen Domäne

**Tabelle 12:** Liste der in den vier NHX-Aminosäuresequenzen von *Eschscholzia californica* identifizierten konservierten Domänen (Stand 2014)

## 7.9 Vergleich der EcNHX1-4-Transporter mit ihren pflanzlichen Homologen

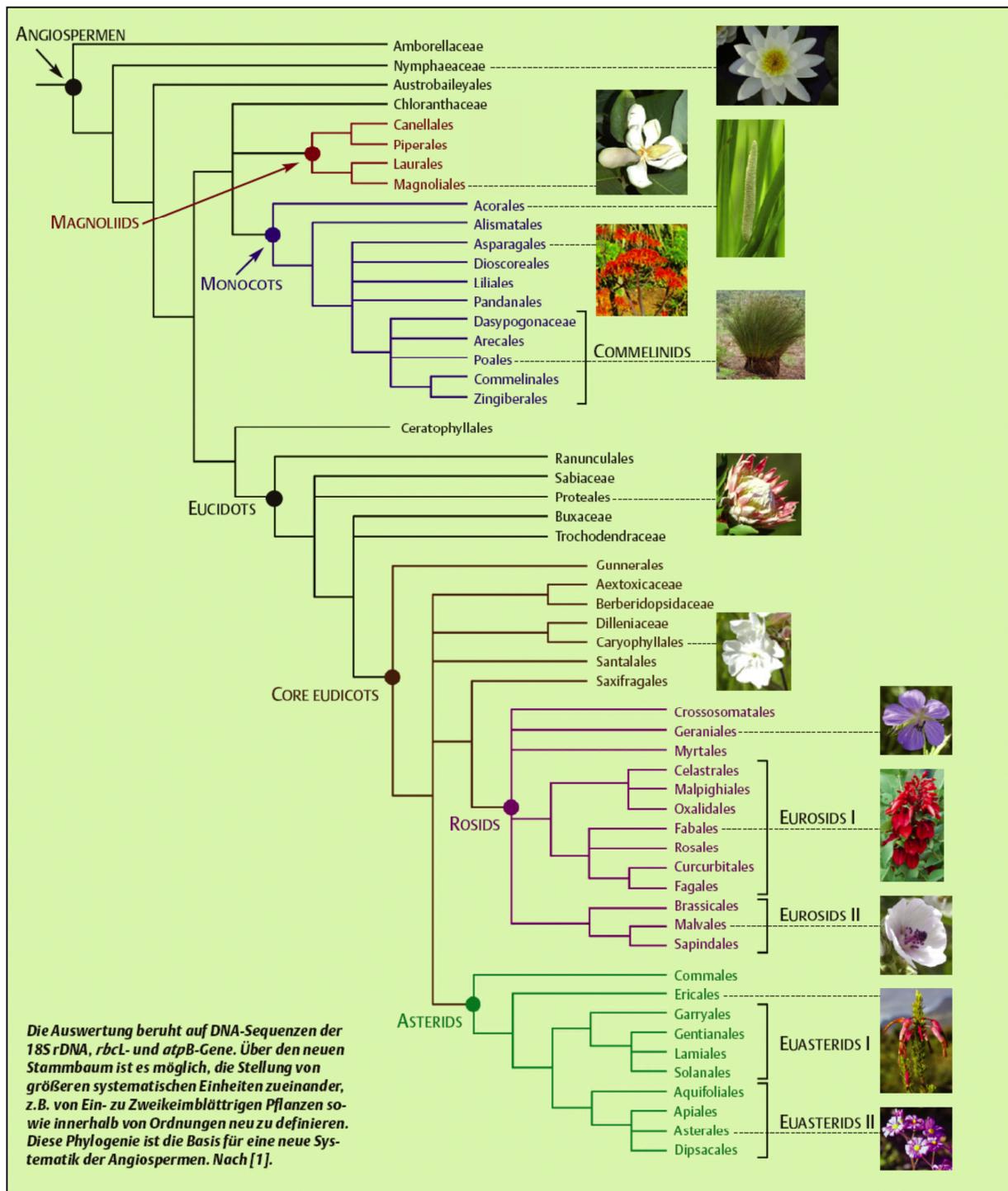


Abbildung 56: Systematik der Angiospermen (Angiosperm Phylogeny Group (APG III), 2003)

**Liste verwendeter Spezies:**

Für die Erstellung des Multisequenzalignments (s.u.) und des daraus resultierenden Stammbaums (siehe Abb.28) wurden folgende Spezies verwendet:

Spezies	NHX-Isoform	Accession-Nr.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtNHX1	NP_198067
<i>Atriplex gmelinii</i>	AgNHX1	BAB11940
<i>Citrus reticulata</i>	CrNHX1	AAT36679
<i>Fagopyrum tataricum</i>	FtNHX1	ADL27439
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhNHX1	AAM54141
<i>Ipomoea nil</i>	InNHX2	BAD91200
<i>Iris lactea</i>	IINHX2	AAU81619
<i>Helianthus tuberosus</i>	HtNHX1	ABM17091
<i>Limonium gmelinii</i>	LgNHX1	ACF05807
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	McNHX1	CAN99589
<i>Morus notabilis</i>	MnNHX2	EXC03123
<i>Paeonia lactiflora</i>	PINHX1	AFU88788
<i>Plantago maritima</i>	PmNHX1	ABW93557
<i>Populus euphratica</i>	PeNHX2	ACU01853
<i>Pyrus betulifolia</i>	PbNHX	AGE13941
<i>Rhizophora stylosa</i>	RsNHX1	ACT53748
<i>Solanum lycopersum</i>	SINHX3	NP_001234255
<i>Vigna radiata</i>	VrNHX1	AEO50758
<i>Vitis vinifera</i>	VvNHX1	NP_001267815, XP_002277061
<i>Zea mays</i>	ZmNHX2	NP_001105531
<i>Zoster marina</i>	ZoMNHX1	BAG24501
<i>Zygophyllum xanthoxylum</i>	ZxNHX	ABU92562

**Tabelle 2: Liste im Familien-Stammbaum verwendeter Spezies**

**Abbildung 57: Vergleich von NHX-Aminosäuresequenzen aus *Eschscholzia californica* und anderer Pflanzenfamilien der Angiospermen**

Die Abbildung wurde in die Abschnitte I-III unterteilt (s.u.). Das Multisequenzalignment wurde mit ClustalW erstellt. Die Aminosäuren sind von schwarz (hohe Übereinstimmung) bis hellrot (niedrige Übereinstimmung) gekennzeichnet. Die accession-Nr. der verwendeten Spezies sind Tab.2 zu entnehmen.

**I**

Eschscholzia californica NHX1	-----MEML	MN-LLLLS--	---EKYASVV	SLNLFVTLCC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	AIAIGLCTGC	VILLTT	64
Eschscholzia californica NHX2	-MALDLSGVS	NNLELLKA--	---SDHATVV	SVTLFVALLC	ACIIGHLLE	ENRWMNESIT	AIAIGICTGV	VILLTT	70
Eschscholzia californica NHX3	---MMEEVM	MNNNILFS--	---EKYAGVV	SINLFVTLW	GCIVIGHLLE	ENRWMNESIT	AIVIGLCTGC	VILLTT	67
Eschscholzia californica NHX4	-MAFELGSVF	SNLEILKA--	---SDHATVV	SVTLFVTLCC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESST	AIAIGLCTGV	VILLTT	70
Morus notabilis	---MESGSFFP	ESLRMLT---	---TDHASVV	SMNLFVALLC	ACIIGHLLE	ENRWMNESIT	ALAIGLCTGV	VILLTS	69
Vitis vinifera	MGFELGSVVM	K-LGMVY---	---TSDHSVV	SMNLFVALLC	ACIVVDHWLE	EYRWMNESIT	ALALGLCTGI	IILLTT	70
Ipomoea nil	---MGVDVG	TLLSKMN--M	LTTSDHGSVV	SINIFVALIC	ACIIGHLLE	ESRWMNESIT	ALVIGLCTGV	VILLTS	70
Solanum lycopersicum	---MVFDFG	TLVASLN--R	LSTSDHQS	SINIFVALIC	ACIIGHLLE	ENRWMNESIT	ALVIGLCTGV	VILLIS	70
Helianthus tuberosus	---MVFDFG	LMFEKMGSS	LATSEYSSVV	SMNLFVALLC	GCIVLGHLE	ENRWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLIS	72
Plantago maritima	---MVFDFG	TMKGTVD--M	LATSDHSSVV	SITLFVTLCC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALVIGLCTGV	VILLIS	70
Mesembryanthemum crystallinum	MAFDLSNLVS	TKLQMLS---	---TSDHASVV	SMNLFVALLC	GCIVLGHLE	ENRWMNESIT	ALAIGLATGV	VILLFS	71
Atriplex gmelinii	MWSQLSLLS	GKMDALT---	---TSDHASVV	SMNLFVALLC	GCIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALLIGLATGV	VILLIS	71
Limonium gmelinii	---MALSSILP	-KMNLS---	---TSDHASVV	SMNLFVALLC	ACIVIGHLLE	ETQWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLFS	68
Pyrus betulifolia	MAVAHLMMI	SKLQVY---	---TSDHSVV	SMNLFVALLC	ACIVIGHLLE	ENRWYNESIT	ALLIGLCTGV	VILLIS	71
Vigna radiata	---MVFEISSV	SKLQVY---	---TSDHASVV	SMNLFVALLC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLTS	70
Populus euphratica	---MESYVSSIG	SKLQMLT---	---TSDHASVV	SMNLFVALLC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLIS	70
Gossypium hirsutum	MVAPQLAAV	TKLQTL---	---TSDHASVV	SMNIFVALLC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALLIGVFTGV	IILLTS	71
Citrus reticulata	---MDQAISVV	RKLQMVN---	---TSDHNSVV	SINIFVALLC	ASIVIGHLLE	ESRWMNESIT	ALVIGVCAV	IILLTT	70
Zygophyllum xanthoxylum	-MAPEL-----	-FRMLA---	---TSDHSSVV	SMNLFVALLC	GCIVIGHLLE	ETRWMNESIT	ALVIGVCTGV	VILLIS	64
Arabidopsis thaliana	---MLDSL	SKLPLS---	---TSDHASVV	ALNLFVALLC	ACIVLGHLE	ENRWMNESIT	ALLIGLCTGV	TILLIS	67
Zea mays	-MGLGVAOET	VRGLVSS---	---TSDHASVV	SNNFVALLC	ACIVLGHLE	ENRMVNESIT	ALLVGLTGT	VILLIS	71
Paeonia lactiflora	---MAFOLY	ALMTRLS---	---TSDHASVV	SINLFVALLC	ACIVIGHLLE	ETRWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLIS	67
Iris lactea	-MGSGMEDLL	VRGLVSS---	---TSDHASVV	SINLFVALLC	ACIVIGHLLE	ENRWMNESIT	ALLIGLCTGV	VILLTT	71
Zostera marina	---MGLSAAE	AKYGVLS---	---TSDHTSVA	SICLFATLLC	ACIVIGHLLE	ENRWYNESIT	ALLIGLTFG	IILLTT	70
Rhizophora stylosa	-MGFSLGSIV	SRLVAPL---	---EADSAHV	SVTLFVALLC	ACVLIQOLLE	KNRWYNESIT	ALLIGLFTGI	IILLTT	70
Fagopyrum tataricum	-MSTLIDLLS	SKLQNSS---	---FNTTIV	AITVFFSLLC	ACIIGHLLE	EHRWANESIT	ALLLGLISGG	VILLFS	69
Eschscholzia californica NHX1	GGTSSRLLV	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFQNF	TTIMLFGVVG	TLVSFAIVSL	GATQILRRMN	IGSLDI	140
Eschscholzia californica NHX2	GGKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIILFGVIG	TLISFATISL	GATEIFKWL	VGSLEL	146
Eschscholzia californica NHX3	GGTKSHLMVF	SODLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIILFGVVG	TLISFGIVFL	GATQLFKKM	VGSLEI	143
Eschscholzia californica NHX4	GGKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIILFGVVG	TLISFATISL	GATEIFKRLD	IGPLEL	146
Morus notabilis	GGKSSRLLV	SEELFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIMLFGAVG	TLISFGIISL	GAIHFFOKMN	VGTLKL	145
Vitis vinifera	RGKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIMLFGAIG	TLISFGIISL	GAIHFFKMK	IGSXI	146
Ipomoea nil	GGTSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	STIMLFGALG	TLISFIIISL	GATIGFKKM	IGSLEL	146
Solanum lycopersicum	GGKNSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	STIMLFGAVG	TLISFIIISL	GATIGFKKM	IGSLEL	146
Helianthus tuberosus	GGTSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIVLFGAVG	TMISFTIISF	AAIKFKKM	IGLEL	148
Plantago maritima	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIMMFGAFG	TMISFTIISL	GATVFFKMD	VG-LAI	145
Mesembryanthemum crystallinum	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIVLFGALG	TLVSFTIISL	GAMEFFKLD	IGSLEL	147
Atriplex gmelinii	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIVLFGAVG	TLVSFTIISL	GALSIFKLD	IGTLEL	147
Limonium gmelinii	GGKSSHLLVF	SEELFFIYLL	PPILNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIMMFGAVG	TLVSCIIISL	GAMEFLKLD	IGTLDL	144
Pyrus betulifolia	GRGSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFVNF	MTIVMFGAIG	TLVSCIIISL	GITQFFKLD	IGTLEL	147
Vigna radiata	GGKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFVNF	MTIILFGAIG	TLISCAVITL	GASQIFKLD	IGPLEL	146
Populus euphratica	RGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIMLFGAVG	TLISCFIISL	GAMQFFKLD	IGPLDI	146
Gossypium hirsutum	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIMLFGAVG	TLISCTIISL	GVINFFKEMD	IGSLDI	147
Citrus reticulata	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIMLFGAIG	TLVSCIIISL	GVIOFFKLD	IGTLDI	146
Zygophyllum xanthoxylum	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIVLFGAVG	TLISCTIISL	GVIOFFKLD	IGTLDI	140
Arabidopsis thaliana	HGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	VTIMLFGAVG	TLISCTIISL	GVIOFFKLD	IGTLDI	143
Zea mays	RGVSIHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIILFGAIG	TLISFVILSL	GAMGLFKLD	VGPLEL	147
Paeonia lactiflora	GGKSSHLLVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIMLFGAVG	TLISCGIISL	GVTOFFKLD	IGSLEL	143
Iris lactea	NGKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIMLFGAVG	TLISFVILSL	GATGLFRKM	IGPLEI	147
Zostera marina	QWKSSHILVF	SEDLFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	MTIMLFGAVG	TLISFIIISL	GATLLGKIN	IGTLDI	146
Rhizophora stylosa	QWRSSRIILVF	SEELFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFRNF	ITIVLFGAVG	TLISFAIVSL	GSAQIFSKMD	VGLLET	146
Fagopyrum tataricum	HGQSSQIILEF	SEELFFIYLL	PPIFNAGFO	VKKKQFFKNF	STIILFGVIG	TLISFCLISL	GAFLLFKRLG	VTELDL	145
Eschscholzia californica NHX1	ADYLAIGTIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTRI	NSSTALQLLV	NFLYLF	216
Eschscholzia californica NHX2	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQDFDLTRI	NSRIAFQLFG	NFSYLF	222
Eschscholzia californica NHX3	GDYLAIGTIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQNFDLTRI	NSTTALQIG	NFLYLF	219
Eschscholzia californica NHX4	GDYLAIGTIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQDFDLTRI	NSKIALOFFG	NFSYLF	222
Morus notabilis	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQNFDLSHI	NSGVALOFFG	NFLYLF	221
Vitis vinifera	EDXLALGXIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLSHI	DSSIALOFFG	NFLYLF	222
Ipomoea nil	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AVONFDLSNI	NSLVLOLFG	NFLYLF	222
Solanum lycopersicum	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AVONFDLSNI	NTSKALELVG	NFLYLF	222
Helianthus tuberosus	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AVONFDLSRI	TTAIAFOLLG	NFFYLF	224
Plantago maritima	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AVONFDLSHI	STAVAFOLIG	NFFYLF	221
Mesembryanthemum crystallinum	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQNFDLTHI	DHRIAFKFAIG	NFFYLF	223
Atriplex gmelinii	ADYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTRI	DHRIALQFMG	NFLYLF	223
Limonium gmelinii	NDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	DHRIAGFKFLG	NFMFLF	220
Pyrus betulifolia	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	DSSIALHFMG	NFLYLF	223
Vigna radiata	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	DSSIALHFMG	NFLYLF	222
Populus euphratica	GDYLAISAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	NAATAWDFVR	NFFYLF	222
Gossypium hirsutum	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	SPRILLEF	IGSFLYLF	223
Citrus reticulata	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	NTRSAFQIG	NFLYLF	222
Zygophyllum xanthoxylum	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	NTQSAFHFLG	QFLYLF	216
Arabidopsis thaliana	GDYLAIGAIF	AATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	NHEAAFHLLG	NFLYLF	219
Zea mays	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	ALONFDITHI	NAEVVHLLG	NFLYLF	223
Paeonia lactiflora	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLTHI	DHRIALQFMG	NFFYLF	219
Iris lactea	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQNFDLTHI	NPAGIAAKF	IGSFLYLF	223
Zostera marina	GDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQHFDLVNI	DFTIILHFAA	NFLYLF	222
Rhizophora stylosa	VDYLAIGAIF	SATDSVCTLO	VLNODQTPLL	YSLVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQHFDLVNI	DFTIILHFAA	NFLYLF	222
Fagopyrum tataricum	QDYLAVGAIF	SATDSVCTLO	VLSQDDTPLL	YSIVFGGCV	NDATSVVLFN	AIQSFDLSEV	SATTALSLIG	TFLYLF	221

II	240				260				280				300			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Eschscholzia californica NHX1	<b>TVSTLLGVFA</b>	GLLSAYI	IRK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMMSELFO	LSA	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTKQS	292					
Eschscholzia californica NHX2	<b>IISTALGVAV</b>	GLLSAYI	IKK	SYFGRHSADR	EVAVMILMAY	LSYMLAELFH	LSA	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTEKS	298					
Eschscholzia californica NHX3	<b>TISTLLGVFA</b>	GLLSAYI	IRK	LYFGRHSTDR	EVALMILMAY	LSYMLSELFE	LSA	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	295					
Eschscholzia californica NHX4	<b>IISTALGVVF</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EIALMILMAY	LSYMLAELFH	LSS	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Morus notabilis	<b>VASTLLGVVA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMILMAY	LSYMLAELFY	LSA	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	297					
Vitis vinifera	<b>ITSTMLGVFA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVAIMILMAY	LSYMLAELFY	LSA	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Ipomoea nil	<b>ILSTLLGVVA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVAIMICMAY	LSYMLSELFS	LSA	ILTVFFS	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Solanum lycopersicum	<b>ASSTILGVVA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVAIVILMAY	LSYMLAELFY	LSA	ILTVFFS	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Helianthus tuberosus	<b>ITSTLLGAGA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVAIMILMAY	LSYMLAELFS	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTEKS	300					
Plantago maritima	<b>ISSTVLGVVT</b>	GLLSAYI	IKT	LYFGRHSTDR	EVAIMMLMAY	LSYLAELFS	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	297					
Mesembryanthemum crystallinum	<b>FTSTLLGAI T</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Atriplex gmelinii	<b>IASTILGAF T</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Limonium gmelinii	<b>AASTLLGAA A</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	296					
Pyrus betulifolia	<b>FASTMLGVFA</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Vigna radiata	<b>VASTMLGVLT</b>	GLLSAYI	IKK	LYIGRHSSTR	EVALMMLMAY	LSYMLAELCY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Populus euphratica	<b>LASTLLGVIT</b>	GLISAYI	IRR	PFYGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Gossypium hirsutum	<b>LASTMLGVIV</b>	GLVSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYIMAEFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Citrus reticulata	<b>FTSTLLGVIG</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVAIMVLMAY	LSYMLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Zygophyllum xanthoxylum	<b>LTSTLLGAF T</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELTN	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	292					
Arabidopsis thaliana	<b>LTSTLLGAAT</b>	GLISAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFD	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	295					
Zea mays	<b>LLSTVLGVAT</b>	GLISALVI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELFA	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Paeonia lactiflora	<b>LASTVLGVFG</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYLAELFY	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	295					
Iris lactea	<b>VSSTFLGAF A</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMMLMAY	LSYMLAELLD	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	299					
Zostera marina	<b>FTSTVLGVWS</b>	LCNQKLI	FRK	VAAKTFIFFL	LIGDFGVNF	ISSKSVLTFY	SS	--SMFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	295					
Rhizophora stylosa	<b>TSTLLGVAV</b>	GLLSAYI	IKK	LYFGRHSTDR	EVALMILMAY	LSYMLAELFN	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NVTESS	298					
Fagopyrum tataricum	<b>FTSTLLGLTV</b>	GLLSAYI	IKT	LYIGRHSSTR	EIAIMMLMAY	LSYMITELID	LSG	ILTVFFC	GIVMSHYTWH	NITESS	297					
		320		340		360		380								
Eschscholzia californica NHX1	<b>QITTKQTFAT</b>	LSFISE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWKVVSSSP	GKSGVSSIL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLVAN	LIKKTF	368						
Eschscholzia californica NHX2	<b>RVTTKHTFAT</b>	LSFMAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWKVFRSSP	GKSGVSSIL	LGLLMGRAA	FVFLSFLSN	LTKRNP	374						
Eschscholzia californica NHX3	<b>RIITTKHTFAT</b>	MSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWKVVSSSP	GKSGVSSVL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKSP	371						
Eschscholzia californica NHX4	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFMAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVFRSSP	GKSGVSSIL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKVO	374						
Morus notabilis	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWKIVSGSP	GTSIGVSSI	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKNSP	373						
Vitis vinifera	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVFSVSSP	GKSGVSSIL	LGLVLVERAA	FVFLSFLSN	LTKKSS	374						
Ipomoea nil	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVFSVSSP	GTSVEVSSIL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKSR	374						
Solanum lycopersicum	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVFSVSSP	QLSQVQSPIL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKSP	374						
Helianthus tuberosus	<b>RVTTKHAFAT</b>	FSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWSFVKDSSP	GTSAEVSAIL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKAO	376						
Plantago maritima	<b>RIITTKHTFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	KTSVAVSATL	LGLVMAGRAA	FVFLSFLSN	LTKKAO	373						
Mesembryanthemum crystallinum	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GISVAVSAIL	LGLLMVGRAA	FVFLSFLSN	FSKKSO	375						
Atriplex gmelinii	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GISVAVSSIL	LGLVMVGRAA	FVFLSFLSN	FAKKSO	375						
Limonium gmelinii	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSVAVSSIL	MGLVMVGRAA	FVFLSFLSN	LTKKSP	372						
Pyrus betulifolia	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSVAVSSIL	LGLVMLGRAA	FVFLSFLSN	LTKKNO	375						
Vigna radiata	<b>RIITTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSIAASSVL	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKSP	374						
Populus euphratica	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSVAVSSIL	LCLVMVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKSP	374						
Gossypium hirsutum	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSVAVSAVL	MGLVMVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKST	375						
Citrus reticulata	<b>RVTTKHTFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	GTSVAASAML	MGLVMAGRAA	FVFLSFLSN	LAKKSP	374						
Zygophyllum xanthoxylum	<b>RIITTKHAFAT</b>	LSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVAVSNSSP	KTSVAVSSVL	MALVMAGRAA	FVFLSFLSN	LAKKST	368						
Arabidopsis thaliana	<b>RIITTKHTFAT</b>	LSFLAET	IFIF	LYVGM DALDI	DKWRVSDTTP	GTSIAVSSIL	MGLVMVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKNO	371						
Zea mays	<b>RIITTKHAFAT</b>	LSFLAET	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVSDTTP	GKSIASSIL	MGLVMVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKNE	375						
Paeonia lactiflora	<b>RVTTKHAFAT</b>	SSFVAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVSDTTP	GTSVAVSSI	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKSP	371						
Iris lactea	<b>RVTTKHAFAT</b>	LSFISE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVSDTTP	GKSGVSAII	LGLVLVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKSP	375						
Zostera marina	<b>RIITTKHTFAA</b>	LSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWRVSDTTP	GKSVAISSI	LGTVMVGRAA	FVFLSFLSN	LAKKVO	371						
Rhizophora stylosa	<b>RVTTRHAFAT</b>	LSFISE	IFIF	LYVGM DALDI	EKWKVFSKSP	GKSLGVSSIL	LGLTLVGRAA	SVFLSFLSN	LTKKSO	374						
Fagopyrum tataricum	<b>RIITTKHAFAT</b>	MSFIAE	IFIF	LYVGM DALDI	DKWKDSNASSA	GTSFAVSATL	LALVLI GRAA	FVFLSFLSN	WTKRRE	373						
		400		420		440		460								
Eschscholzia californica NHX1	<b>GDKITFRQO</b>	-II	IWWAGLI	RGAVSVALAY	KKFTTAGY	-	TQLPGNAMMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLLRLL	439					
Eschscholzia californica NHX2	<b>DEKLSLNOQ</b>	-VT	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLTK	PLIRLL	445					
Eschscholzia californica NHX3	<b>NDKILTROQ</b>	-VI	VWVWAGLI	RGAVSVALAY	KKFTTAGY	-	TQLTGNAMMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLITK	PLVRYL	442					
Eschscholzia californica NHX4	<b>GEKIFTNQO</b>	-IT	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRAGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRLL	445					
Morus notabilis	<b>YEKVDLKQO</b>	-IT	IWWAGLM	RGAVSVALAY	NQFTRLGH	-	THLOGNAVMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PIVRI	444					
Vitis vinifera	<b>SEKIHIEQO</b>	-VT	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRAGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIS-VVLF	STVVFGLMTK	PLVRLL	445					
Ipomoea nil	<b>GEKIGFRQO</b>	-FI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGY	-	TQLRENAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLITK	PLIRVL	445					
Solanum lycopersicum	<b>EERISFNQO</b>	-II	IWWAGLM	RGAVSVALAY	NQFTRGGH	-	TQLRANAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRLL	445					
Helianthus tuberosus	<b>HEKIDFRQO</b>	-VL	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTKEGH	-	TTMPGNAMMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLITQ	PLIRLL	447					
Plantago maritima	<b>HEKIGLQO</b>	-VT	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTKGGH	-	TOERGAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLVRFL	444					
Mesembryanthemum crystallinum	<b>SEKVSFRQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRAGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIS-VVLF	STVVFGLLTK	PLIRLL	446					
Atriplex gmelinii	<b>SEKVTFNQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIS-VVLF	STVVFGLLTK	PLIMFL	446					
Limonium gmelinii	<b>SEKVTLNQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGH	-	THLRANAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLITK	PLIRFL	443					
Pyrus betulifolia	<b>RDKISLROQ</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGH	-	TQLRANAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRFL	446					
Vigna radiata	<b>NEKISFRQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTMSGH	-	TSLSRNASVMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRLL	445					
Populus euphratica	<b>NEKISFKQO</b>	-FI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTSAGH	-	THLRGNAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PFIKIL	445					
Gossypium hirsutum	<b>SEKISFRQO</b>	-II	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRGGH	-	TQLRGNAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRFL	446					
Citrus reticulata	<b>TEKISIKQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTRSGH	-	TQLRENAIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLMTK	PLIRLL	445					
Zygophyllum xanthoxylum	<b>NDKITFRQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTTSGH	-	TNVRGNAMMI	TSTIS-VVLF	STVVFGLLTK	PLISCL	439					
Arabidopsis thaliana	<b>SEKISFNQO</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTTSAGH	-	TDVRGNAMMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLLTK	PLISYL	442					
Zea mays	<b>HEKISWKQO</b>	-VV	IWWSGLM	RGAVSMALAY	NQFTTRAGH	-	TEVRGNEIMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLLTK	PLIRLL	446					
Paeonia lactiflora	<b>NDKINFOAAS</b>	YDMVGS	-HE	RCCVYGARLY	-QFTRSGO	-	TQLRTNAILI	TSTITGRSLQ	QWVFLGLLTK	LAVRFL	443					
Iris lactea	<b>NEKITFNQO</b>	-VT	IWWAGLM	RGAVSIALAY	NQFTTRAGH	-	TQLPGNAMMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLLTK	PLIRLL	446					
Zostera marina	<b>HEKISFNQO</b>	-IT	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTTSAGH	-	TDIHENAVMI	TSTIT-VVLF	STVVFGLLTK	PLISYL	442					
Rhizophora stylosa	<b>TDKIGLROQ</b>	-VI	IWWAGLM	RGAVSMALAY	NQFTMSGH	-	TQLOGDAILI	TSTIT-VVLF	STVVFGLATK	PLIRWL	445					
Fagopyrum tataricum	<b>GAKLPRKQO</b>	-FI	IWWAGLM	RGAVTIALSY	NQFTSDDDSS	-	STSSENSIMI	TSTII-VVLF	STVVFGLITK	PLIEAL	446					

III		460	480	500	520	
Eschschozia californica NHX1	IPHSQLTRS	--FSSDQWST	SK-SFRIPLL	GNG-----	--QGSET---	-----HQH ETTRPR--SL KELISR 490
Eschschozia californica NHX2	LPSPKPMDs	--MLSSE---	--SFI VPLL	EED-----	--DQPSDVEV	-----TPG HILRPS--SI RMLLAT 494
Eschschozia californica NHX3	VPQANLTRS	--LSSE-PSS	PK-SFTIPLL	GNG-----	--HDSEANTA	-----QTO QLTRPT--SL RMLLAT 495
Eschschozia californica NHX4	LPSPKPFSS	--MLSSEPSS	PK-SFI VPLL	ENG-----	--QGP--DV	-----NPV NLLRPS--SI RMLLAT 496
Morus notabilis	LPSKQIN	--TLSEPEST	PK-SLTTPLL	GNGQ-----	--EDTEANAS	F-----N NVTRPT--SL RMLLSI 497
Vitis vinifera	LPSKPFSS	--MISSEPSS	PK-YLVVPLI	GNG-----	--EETETDQA	S-----Q NVPRPT--SL RMLLST 498
Ipomoea nil	LPPTKHLNR	--MVSSEPYT	PK-SFTVPLL	DS-----	--EADLD	G-----HVPRPN--SL RMLLTT 493
Solanum lycopersicum	QSPKHLTR	--MISSEPTT	PK-SFI VPLL	EST-----	--QDSEADLG	P-----NVPRPH--SL RMLLST 497
Helianthus tuberosus	LPAKHLNR	--MISSEPSS	PK-SFI VPLL	GN-----	--GODSI	D-----NMPRPS--SL RMLLAT 495
Plantago maritima	MP-PKSLLR	--MISTDSL	PK-SFAVPLL	GES-----	--LDSEADLF	LGNGITSESR EIIIRPN--SL RMLLRT 504
Mesembryanthemum crystallinum	LPOPKHFNST	S-TVSTDLGS	PK-SFTLPLL	GDHODSETDL	G--NHODSTD	-----R HIGRPT--SL RMLLNA 507
Atriplex gmelinii	LPOPKHFTSC	S-TVS-DVGS	PK-SYSLPLL	EGNODYEVDV	GNGNHEDTTE	P-----R TIVRPS--SL RMLLNA 509
Limonium gmelinii	LPPKHFLLS	S-TISTDLGS	PKTSLQMLPM	DGRRDSEGI F	G--SSQDFSG	-----QINAPG--SL RMLLNA 504
Pyrus betulifolia	LPHSPKOTTS	--MLSSEPTS	PK-SVI VPLL	G-----	--QDSVDDL V	G-----Q DIRRPA--SL RDLLTT 498
Vigna radiata	LPHTPKHKEI	NIV IATDAST	PK-SATVPLL	G-----	--SAQDSEVD	I-----D SIHRPS--SI RALLRT 499
Populus euphratica	LPN-PKHQSR	SMTISSDPTT	PK-SFTIPLL	G-----	--GQSLDDL G	G-----H DIHRN--SI RMLLTT 500
Gossypium hirsutum	LPHPKPTAS	--MLSDQST	PK-SMEAPFL	GSG-----	--QDSFDDSL I	G-----VHRPN--SI RALLTT 497
Citrus reticulata	LPHPKHTTNH	--ILSDPST	PK-SLSOPLL	EEG-----	--QDSYADLV	G-----P TVPRPG--SL RALLTT 499
Zygophyllum xanthoxylum	LPHPKHTTS	--MLSDNGT	PK-SMNPLL	E-----	--QDSEADLG	G-----R EVPRPR--SI RDLLST 489
Arabidopsis thaliana	LPHQNTTS	--MLSDNT	PK-SIHIPLL	D-----	--QDSFIEPSG	N-----H NVPRPD--SI RGFLLR 493
Zea mays	MHRHLT	--MLSDST	PK-SLHSPLL	T-----	--SQLGSSIEE	P-----T QIPRPT--NI RGEFTT 495
Paeonia lactiflora	LPHPKLTP	--ASSDPHS	SK-SASTPLL	GSR-----	--QDSEADL F	F-----H DIPRPT--SL RMLLTT 495
Iris lactea	LPPSTKHLTG	SCSFNSEPST	PK-FLSAALL	ENIP-----	--GFEAEGG	-----TTN LGARPS--SL RMLLMK 503
Zostera marina	VPP-OQGLKH	MSLCSDSVS	PK-SFLAALL	GNN-----	--GHEGE--	-----ETH GVQPT--SL RMLLVS 495
Rhizophora stylosa	LPOKHSSG	--MVSSGFDE	SK-SIVLPLI	ANG-----	--QDAESEGG	G-----S NVTRPI--SL RMLLST 497
Fagopyrum tataricum	LGRNVFPVS	--DATDIPS	LE-SLRVLF I	EDGG-----	--EGNNDEE	N-----KEN SEPRRNGWCL GMLIRH 503
Eschschozia californica NHX1	-LDVHRYWR	KFDDSFRLPT	FGGRGFPEL	P--QEOLSPR	AG-----	-----528
Eschschozia californica NHX2	PTHTVHRYWR	KFDNSFMRPV	FGGRGFVPFV	AGSPSEQSLN	DKDEETQOT	QS--546
Eschschozia californica NHX3	PSHTVHRYWR	KFDNSVMRPT	FGGRGFMPFV	PGSPTEQSVR	PW-----	-----537
Eschschozia californica NHX4	PTHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPIEQSIH	EKDEOPQPI	TLQRS 551
Morus notabilis	PSHTVHRYWR	KFDDGFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTE---	-----	-----533
Vitis vinifera	PSHTVHRYWR	KFDDSFMRPV	FGGRGFVPI	PGSPTEPNLG	QWR-----	-----541
Ipomoea nil	PSHTAHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPYV	PGSPTEQNEP	QWO-----	-----536
Solanum lycopersicum	PSHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEPSGH	-----	-----537
Helianthus tuberosus	PSHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPI	PGSPTEQSLH	QSAHHLVDEE	TTGN- 549
Plantago maritima	PTRTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEQSVH	NNWPEEPKO	-----553
Mesembryanthemum crystallinum	PTHTVHRYWR	KFDDSFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEQSTN	NLNHSTEST	-----556
Atriplex gmelinii	PTHTVHRYWR	KFDDSFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEQSTN	NLVDR	-----555
Limonium gmelinii	PTHTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTERSMM	NLTERVS	-----551
Pyrus betulifolia	PTHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTERDNN	VQWQ	-----542
Vigna radiata	PTHTVHRLWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPE	PGSPSER-NG	HQWR	-----542
Populus euphratica	PTHTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTERNPP	NQWH	-----544
Gossypium hirsutum	PAHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTERSEP	NLPOWQ	-----543
Citrus reticulata	PTHTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFAPFV	PGSPTERSVR	GGQ	-----542
Zygophyllum xanthoxylum	PTHTVHRYWR	KFDNAFMRPV	FGGRGFVPFV	PA SPTE RNEG	QWA	-----532
Arabidopsis thaliana	PTRTVHRYWR	QFDDSFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTERNPP	DL SKA	-----538
Zea mays	MTRTVHRYWR	KFDDKFM RPM	FGGRGFVPFV	PGSPTERNPH	DL SKP	-----540
Paeonia lactiflora	PTHTVHRYWR	KFDDSFMRPV	FGGRGFVPV	PGSPSESVHO	R	-----536
Iris lactea	PTHTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEQ-SV	HGWE	-----546
Zostera marina	PTRTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFVPFV	PGSPTEEPSV	HPF	-----538
Rhizophora stylosa	PTNTVHRYWR	KFDDAFMRPV	FGGRGFAPYH	PGSPTESEFIO	-----	-----537
Fagopyrum tataricum	PTWTVHRLWR	KFDDKFM RPM	FGGRGFVPYQ	PGSPTEAPIQ	SNI FDEHHVO	-----553

### 7.10 Wachstum der transgenen Zellstämme

Wie aus Abb.58 hervorgeht, wachsen die transgenen Zellstämme nur mit einer Wachstumsrate von 60 % (Gruppe 1) bzw. 70 % (Gruppe 2) des Wildtyps.

Diese Wachstumsverzögerung beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Anwesenheit von Paramomycin im Selektionsmedium beruht.

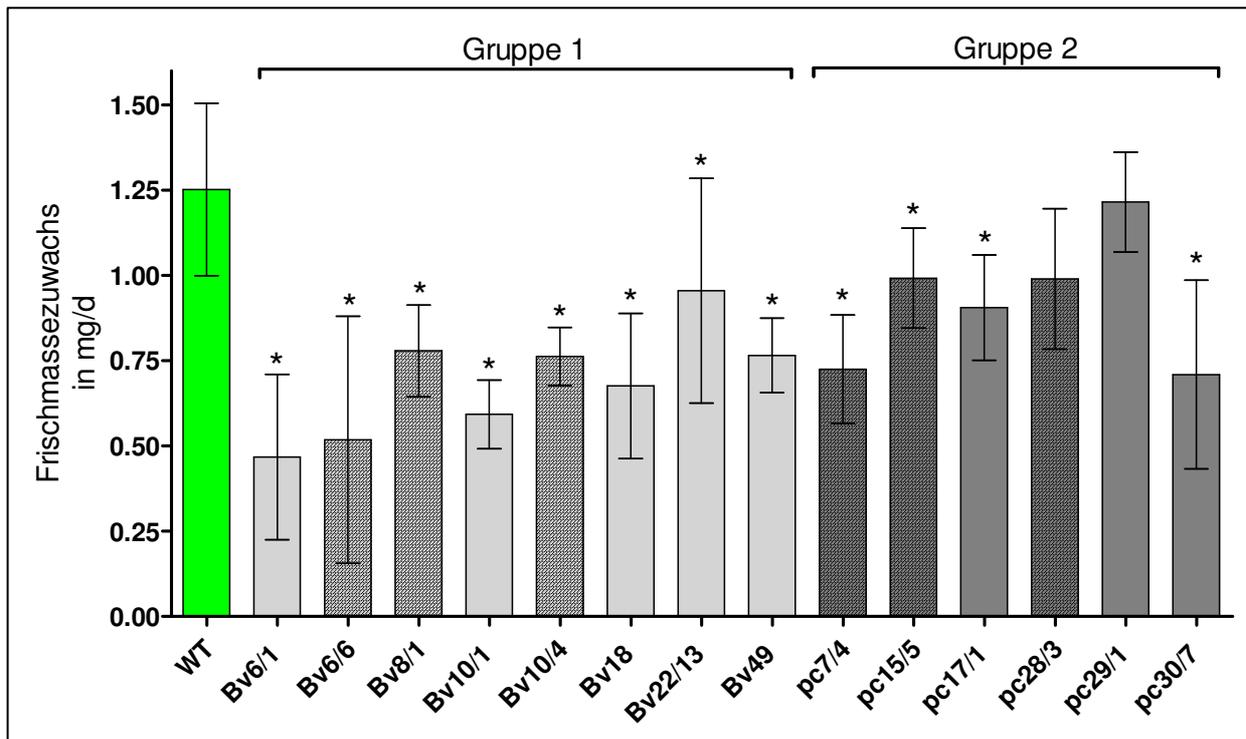
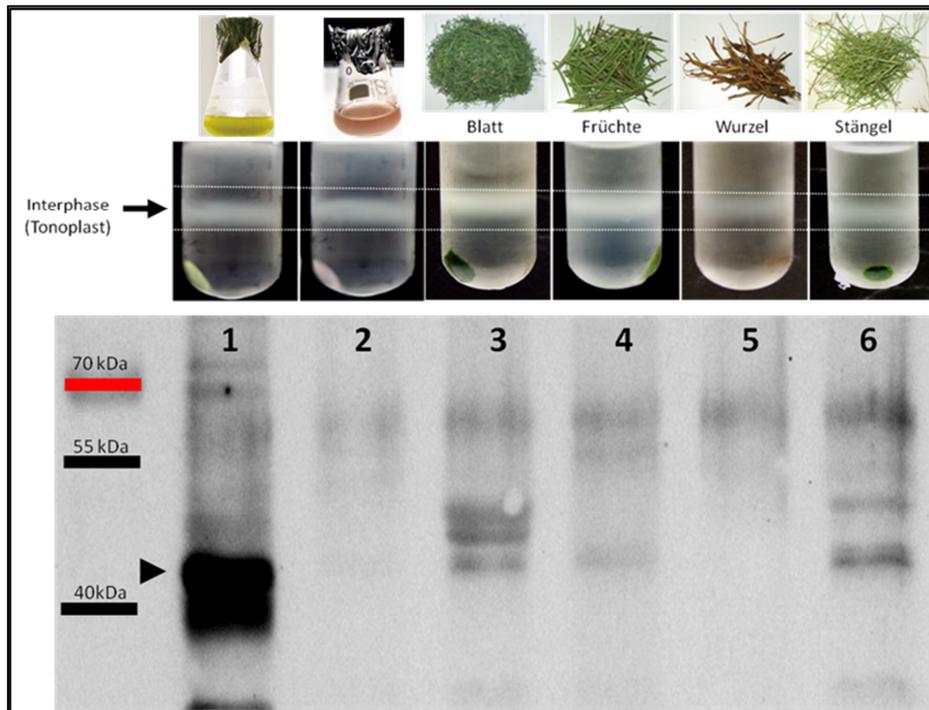


Abbildung 58: Wachstumsraten der NHX-silencing Mutanten von *Eschscholzia californica*

Von 3-7 Tage alten Zellkulturen wurden aller 24 h Proben entnommen und die Frischmasse pro ml bestimmt. Daten sind Änderung der Frischmasse pro Zeit. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei gleichberechtigten Messungen zu jeweils vier Parallelen (n=2, ± SD). (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (WT, grün) mit p<0,05. Die schraffierten Zellstämme wurden für weitere Untersuchungen (siehe Kap.3.5) verwendet.

### 7.11 Nachweis von NHX-Proteinen in *Eschscholzia californica*

Die Bestimmung der relativen Expressionshöhen der NHX-Transporter auf Protein-Ebene wurde erwogen. Die Abb.59 zeigt, dass die angestrebte immunologische Detektion aber aufgrund mangelnder Sensitivität des einzig verfügbaren anti-AtNHX1-Antiserums (siehe 2.9.8) in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* kein Ergebnis lieferte. Der endgültige Nachweis des erfolgreichen gene silencing wurde daher auf der Aktivitäts-Ebene geführt.



**Abbildung 59: Western Blot zur Detektion von NHX-Proteinen in Zellkultur und Geweben der Ganzpflanze von *Eschscholzia californica***

10 µg Tonoplastenprotein-Fraktion der in 1-6 gezeigten Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immunologische Detektion der NHX-Proteine erfolgte mit einem anti-AtNHX1-Antiserum. 5 µg Tonoplastenprotein aus *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur (**1**) dienen als Kontrolle. Für *Eschscholzia californica* wurden folgende Proben bestimmt: **2**) Zellsuspension, **3**) Blätter, **4**) Früchte, **5**) Wurzel und **6**) Stängel.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des vielseitigen Themas, gilt mein besonderer Dank

### **Herrn Professor Dr. Werner Roos.**

Die Chance eine naturwissenschaftliche Arbeit selbstständig bearbeiten zu dürfen und auf das Potential der großen Erfahrung von Prof. Roos zugreifen zu dürfen, hat mir die Aufgabe machbar erscheinen lassen. Während der langen Zeit hat sich gezeigt, wie notwendig zielgerichteter Ansporn ist.

Auch möchte ich mich bei Frau Professor Karin Breunig für die kollegiale Hilfe bedanken, in einer schwierigen Zeit ihre Labore nutzen zu dürfen.

Darüber hinaus möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft von Frau Dr. Renate Langhammer und Frau Ulla Klokow bedanken. Die gewonnen Erkenntnisse haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Für das Erstellen eines 3D-Modells, welches meine Arbeit unterstützt hat, muss ich mich besonders bei Dr. Wolfgang Brandt bedanken.

Die Arbeit in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ hat die Freude am Forschen nie monoton werden lassen, dafür herzlichen Dank an: Dr. Henriette Müller, Dr. Carolin Massalski, Dr. Michael Heinze, Dr. Brigitte Schumann, Gabi Danders und Beate Schöne.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, für die aufgebrauchte Geduld und ihre bärenstarke Unterstützung.



## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema

„Die Rolle der vakuolären NHX-Transporter bei der Auslösung der Biosynthese von Benzophenanthridin-Alkaloiden in *Eschscholzia californica*“

von mir selbst, ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Doktorarbeit wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -, deren Promotionsordnung ich anerkenne, vorgelegt.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle/S., den 20.01.2015

---

Sophie Weigl