

K⁺ - Homöostase und kaliumabhängige Xylogene in
***Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.**

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

vorgelegt von
Katharina Langer
aus
Nordhausen

Würzburg 2003

Eingereicht am: 05.05.2003

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M.J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. H. Rennenberg

Gutachter: Prof. Dr. A. Polle

Tag des Promotionskolloquiums: 29.10.2003

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS KAMBIALE MERISTEM	2
1.2 DIE DIFFERENZIERUNG DER KAMBIALEN DERIVATE XYLEM UND PHLOEM.....	5
1.2.1 XYLEM.....	5
1.2.2 PHLOEM	7
1.3 TRANSLOKATIONEN IN DEN LEITGEWEBEN PHLOEM UND XYLEM UNTER KALIUM- SPEZIFISCHEN ASPEKTEN	8
1.4 DIE BEDEUTUNG DES KALIUMS FÜR DIE PFLANZE UND SEIN TRANSPORT MIT HILFE VON MEMBRANPROTEINEN	11
1.4.1 KALIUM IN DER PFLANZE	11
1.4.2 KALIUMKANÄLE.....	12
1.4.3 KALIUMTRANSPORTER	14
1.5 DER EINFLUSS VON MINERALIEN, SPEZIELL DES KALIUMS, AUF DIE HOLZBILDUNG UND JAHRESZEITLICHE VERÄNDERUNGEN DES KALIUMGEHALTS	15
1.6 DIE BLATTKNOSPENENTWICKLUNG IN BÄUMEN.....	16
1.7 ZIELSTELLUNG	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 ANZUCHT DER PAPPEL <i>POPULUS TREMULA X POPULUS TREMULOIDES</i>	19
2.1.1 AGARKULTUR	19
2.1.2 SUSPENSIONSKULTUR.....	20
2.1.3 HYDROKULTUR	20
2.1.4 FREILANDKULTUR.....	21
2.1.5 VERSUCHSANORDNUNGEN MIT <i>P. TREMULA X P. TREMULOIDES</i>	22
2.1.5.1 Jahresgang.....	22
2.1.5.2 Künstliche Reifung von Knospen	23
2.1.5.3 Abscisinsäure (ABA) - Experimente.....	23
2.1.5.4 Licht/Dunkel - Experimente.....	23
2.1.5.5 Salz - Experimente	23
2.1.5.6 Auxin - Experimente	24
2.1.5.7 Kalium- und TEA ⁺ - Behandlungen	24

2.2 ANZUCHT VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> UND GUS - FÄRBUNG	24
2.2.1 SAMENSTERILISATION	24
2.2.2 GUS - FÄRBUNG	25
2.3 VERFAHREN MIT RIBONUKLEINSÄUREN (RNA).....	26
2.3.1 ISOLIERUNG VON GESAMT- RNA (RNEASY)	26
2.3.2 mRNA- ISOLIERUNG (OLIGO dT ₂₅ -DYNABEADS)	27
2.3.3 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER RNA	27
2.3.4 TRANSFERVERFAHREN FÜR RNA - NORTHERN BLOT	28
2.4 VERFAHREN MIT DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN (DNA)	28
2.4.1 cDNA - SYNTHESE	28
2.4.2 SYNTHESE VON MARATHON - cDNA.....	29
2.4.3 SMART - cDNA - SYNTHESE	29
2.4.4 REVERSE TRANSKRIPTION - POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR).....	29
2.4.5 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA- SONDEN	30
2.4.6 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA	30
2.4.7 ISOLIERUNG VON PROMOTORSEQUENZEN (GENOME WALKER).....	30
2.4.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	31
2.4.8.1 DNA- Polymerasen	31
2.4.8.2 Primer und Primerdesign.....	31
2.4.8.3 PCR- Standardexperiment.....	32
2.4.8.3.1 Standardexperiment mit Taq- Polymerase	32
2.4.8.3.2 Standardexperiment mit Klen Taq-1 Polymerase	32
2.4.8.3.3 Standardexperiment mit dem TripleMaster PCR System	33
2.4.8.4 PCR mit verschachtelten Primern (Nested PCR).....	34
2.4.8.5 PCR mit degenerierten Primern	34
2.4.9 REALTIME QUANTITATIVE PCR.....	35
2.4.9.1 Primerdesign.....	35
2.4.9.2 Herstellung der Standards	35
2.4.9.3 LightCycler PCR	36
2.4.9.4 Auswertung der LightCycler PCR	36
2.4.10 DNA - GEL - ELEKTROPHORESE.....	37
2.4.11 AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	37
2.4.12 KLONIERUNG VON DNA- FRAGMENTEN	37
2.4.12.1 Plasmide	38

2.4.12.2	Plasmid- Minipräparation <i>Escherichia coli</i>	38
2.4.12.3	Plasmid- Minipräparation <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
2.4.12.4	Aufreinigungssysteme.....	38
2.4.12.5	TA- Klonierung der isolierten PCR-Produkte.....	39
2.4.13	LIGATION	39
2.4.14	RESTRIKTIONSANALYSE	39
2.5	SEQUENZIERUNG UND SEQUENZANALYSE	40
2.6	BAKTERIEN	40
2.6.1	VERWENDETE STÄMME UND VERMEHRUNG	40
2.6.2	HALO - ESSAY.....	41
2.6.3	CHEMISCHKOMPETENTE ZELLEN UND TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	42
2.6.4	ELEKTROKOMPETENTE ZELLEN UND TRANSFORMATION VON <i>A. TUMEFACIENS</i>	42
2.7	TRANSFORMATION VON PFLANZEN DURCH <i>A. TUMEFACIENS</i>.....	42
2.7.1	TRANSFORMATION VON <i>A. THALIANA</i>	42
2.7.2	TRANSFORMATION VON <i>P. TREMULA X P. TREMULOIDES</i>	43
2.7.2.1	Transformation nach Leplé <i>et al.</i> , 1992	43
2.7.2.2	Transformation nach Tzfira <i>et al.</i> , 1997.....	44
2.8	<i>IN SITU</i>- PCR.....	44
2.8.1	DÜNNSCHNITTE.....	44
2.8.2	PROTEASE- VERDAU, ACETYLIERUNG UND DNASE- BEHANDLUNG	45
2.8.3	RT - PCR <i>IN SITU</i>	46
2.8.4	PCR <i>IN SITU</i>	46
2.8.5	DETEKTION	47
2.9	IMMUNOFLUORESZENZ - MIKROSKOPIE	47
2.10	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN	48
2.10.1	HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>XENOPUS LAEVIS</i>	48
2.10.1.1	<i>In vitro</i> Transkription	48
2.10.1.2	Oocytenpräparation und Injektion der cRNA	48
2.10.1.3	Zwei - Elektroden - Spannungsklemmen Technik.....	48
2.10.2	PATCH- CLAMP TECHNIK AN PROTOPLASTEN EINER <i>POPULUS</i> SUSPENSIONSKULTUR	49
3.	ERGEBNISSE	50
3.1	KLONIERUNGEN VON KALIUMTRANSPORTERGENEN AUS <i>POPULUS TREMULA L. X P.</i>	

TREMULOIDES MICHX.	50
3.1.1 KLONIERUNGEN VON <i>PTK2</i> (<i>POPULUS TREMULA</i> K ⁺ CHANNEL 2) UND <i>PtKUPI</i> (<i>POPULUS TREMULA</i> K ⁺ UPTAKE TRANSPORTER 1)	50
3.1.2 KLONIERUNGEN VON <i>KPT1</i> (K ⁺ CHANNEL <i>POPULUS TREMULA</i> 1).....	51
3.1.3 SEQUENZANALYSEN	52
3.1.3.1 PTK2	52
3.1.3.2 KPT1	54
3.1.3.3 PtKUP1.....	56
3.2 EINFLUSS DES KALIUMS AUF DIE HOLZBILDUNG	58
3.2.1 ÄNDERUNGEN DER KALIUMKONZENTRATION IM BAUM.....	58
3.2.2 DIE KALIUMVERSORGUNG BEEINFLUSST DIE ZELLGRÖÖE KAMBIALER DERIVATE....	59
3.3 HERSTELLUNG VERSCHIEDENER PLASMIDE ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE	61
3.3.1 HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> OOCYTEN.....	61
3.3.2 HETEROLOGE EXPRESSION IM <i>E. COLI</i> STAMM LB2003	61
3.3.3 TRANSFORMATION VON <i>A. TUMEFACIENS</i> ZUR GENERATION TRANSGENER PAPPELN	61
3.4 FUNKTIONSANALYSE	62
3.4.1 FUNKTION VON PTK2	62
3.4.2 <i>IN VIVO</i> KALIUMSTRÖME IN PROTOPLASTEN EINER PAPPEL- SUSPENSIONSKULTUR..	64
3.4.3 KOMPLEMENTATION EINES K ⁺ -AUFNAHME-DEFIZIENTEN <i>E. COLI</i> STAMMES DURCH PTKUP1 UND KPT1.....	65
3.5 LOKALISATION	67
3.5.1 NORTHERN ANALYSE.....	67
3.5.2 REALTIME QUANTITATIVE PCR.....	68
3.5.2.1 Der Baum <i>P.tremula</i> L. x <i>P. tremuloides</i> Michx.	68
3.5.2.2 Suspensionskultur von <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	70
3.5.3 KLONIERUNG DER PROMOTOREN	71
3.5.3.1 Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA	71
3.5.3.2 Isolierung der Promotoren von <i>PTORK</i> , <i>PTK2</i> , <i>PtKUPI</i> und <i>KPT1</i>	71
3.5.3.3 Promotor-Sequenzanalysen.....	72
3.5.3.4 Herstellung von Promotor- Reporter- Konstrukten.....	73
3.5.4 GLUCURONIDASE ESSAY (GUS).....	74
3.5.5 <i>IN SITU</i> PCR.....	75
3.5.6 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS MIT PTORK- UND PTK2- ANTIKÖRPERN	75
3.6 REGULATION	77

3.6.1	JAHRESGANG STAMM.....	77
3.6.2	BLATT-KNOSPEN.....	79
3.6.2.1	Jahresgang.....	79
3.6.2.2	Künstliche Knospenreifung.....	81
3.6.3	LICHT.....	82
3.6.4	HORMONE.....	83
3.6.4.1	Abscisinsäure.....	83
3.6.4.2	Auxin.....	83
3.6.5	SALZSTRESS.....	84
3.6.6	SALZSTRESS - ZELLKULTUR.....	85
3.6.7	ZUSAMMENFASSUNG REGULATION.....	86
4.	DISKUSSION.....	87
4.1	DIE cDNA-MOLEKÜLE <i>PTK2</i>, <i>KPT1</i> UND <i>PtKUP1</i>.....	88
4.2	DIE PROMOTOREN.....	89
4.3	FUNKTIONEN.....	91
4.4	LOKALISATIONEN.....	92
4.5	REGULATIONEN.....	94
4.5.1	STAMM/HOLZ.....	94
4.5.2	BLÄTTER/BLATTSTIELE.....	95
4.5.3	KNOSPEN.....	96
4.5.4	HORMONE.....	96
4.5.5	SALZ.....	96
4.6	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG FÜR DIE PAPPEL.....	97
4.6.1	PTORK.....	97
4.6.2	PTK2.....	98
4.6.3	KPT1.....	98
4.6.4	PtKUP1.....	99
4.7	AUSBLICK.....	99
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
6.	SUMMARY.....	104

7. LITERATUR	107
8. ANHANG	126
8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	126
8.2 VERWENDETE GERÄTE UND AUFGEFÜHRTE FIRMEN	127
8.3 OLIGONUKLEOTIDPRIMER	128
8.4 SEQUENZEN	130
8.4.1 CDNA- UND ABGELEITETE AMINOSÄURESEQUENZ	130
8.4.1.1 PTK2	131
8.4.1.2 KPT1	134
8.4.1.3 PtKUP1.....	137
8.4.2 PROMOTORSEQUENZEN BIDIREKTIONAL UND PROMOTOR-SEQUENZANALYSE	140
8.4.2.1 <i>PTORK</i> -Promotor.....	140
8.4.2.2 <i>PTK2</i> -Promotor	145
8.4.2.3 <i>KPT1</i> -Promotor	151
8.4.2.4 <i>PtKUP1</i> -Promotor.....	154
8.5 VEKTOREN	161
8.5.1 pGEM HE	161
8.5.2 pCRII TOPO.....	161
8.5.3 pSPT 18.....	162
8.5.4 pVKH-35S-PA1.....	162
8.5.5 pVKH-35S-GUS-PA.....	163

1. Einleitung

Holz, das aus kambialen Zellteilungen, Zellstreckung und Differenzierung hervorgeht, repräsentiert einen der bedeutendsten Speicher des atmosphärischen Kohlendioxids und mindert somit Gefahren, die auf globale Erwärmung zurückzuführen sind. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist Holz ein extrem wichtiger Baustoff und ein elementarer Ausgangsstoff der Papier- und Zellstoffindustrie. In den letzten Jahren gewann das Holz zunehmend an Bedeutung als natürliche, erneuerbare Energieressource, alternativ zur Verbrennung von Erdöl (Chaffey *et al.*, 2002; Iliev and Savidge, 1998). Der immer stärker wachsenden Nachfrage für den Rohstoff Holz stehen weltweite Rodungen zur Schaffung von Wohnraum, Straßen, Industriezentren und Energiegewinnung gegenüber. Ein grundlegendes Verständnis des Holzwachstums auf molekularer, biochemischer und physiologischer Ebene erscheint daher notwendig, um die wertvollen Holzressourcen optimal zu nutzen und schnellstmöglich zu erneuern.

Während die molekularen Forschungen an krautigen, einjährigen Pflanzen gut vorangeschritten sind, begann die molekulare Aufklärung der Holzbildung erst in jüngster Vergangenheit (Sterky *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Hertzberg *et al.*, 2001). Bäume heben sich insofern fundamental von den übrigen Pflanzen ab, da sie sich zum Teil über viele Jahre hinweg an Umweltbedingungen anpassen müssen. Das augenscheinlichste Anzeichen hierfür ist die Bildung eines stabilen Holzkörpers (Taylor, 2002). Vielschichtige Vorgänge sind zur Speicherung von Zuckern, Proteinen, Lipiden und Mineralien sowie zur Kälteadaptation für den Ruhezustand im Winter und die Aktivierung zum Neuaustrieb im Frühjahr unentbehrlich. Zusätzlich werden für die Erneuerung des Photosynthesystems jedes Jahr während der Wachstumsperiode Blattknospen angelegt und alljährlich wird das komplexe, sekundäre vaskuläre System neu gebildet. Nicht zuletzt der lange Lebenszyklus und die großen Genome von Bäumen erschwerten bislang die molekularbiologische Analyse.

In den letzten Jahren entwickelte sich die in der nördlichen Hemisphäre ansässige Pappel in der molekularen Holzforschung zum Pendant der krautigen Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Mellerowicz *et al.*, 2001; Chaffey, 2002; Taylor, 2002). Die Gattung *Populus* gehört zur Familie der *Salicaceae* und umfasst ca. 30 Arten, die in fünf Untergruppen (Leuce, Aigeiros, Tacamahaca, Leucoides und Turanga) eingeteilt werden (Mellerowicz *et al.*, 2001). Im Vergleich zu anderen Bäumen ist die Pappel schnell wachsend, sie lässt sich vegetativ vermehren und stabil durch Agrobakterien transformieren, so dass transgene

Pappeln generiert werden können. Bezeichnenderweise war der erste genetisch veränderte Baum eine Pappel (Parsons *et al.*, 1986; Filatti *et al.*, 1987). Auch auf molekularer Ebene ergeben sich Vorzüge, so ist das Genom, das auf 5×10^8 Basenpaare (bp) geschätzt wird relativ überschaubar (Chaffey, 2002) und die Genomsequenzierung wird wahrscheinlich noch Ende 2003 abgeschlossen sein.

Neben der sehr gut erforschten Anatomie des sekundären, vaskulären Systems der Pappel (Chaffey, 2002 und darin zitierte Literatur) gibt es Erkenntnisse über saisonale Änderungen des Kaliumgehalts (Dünisch and Bauch, 1994; Dünisch *et al.*, 1998; Arend *et al.*, 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass Kaliumionen für das Holzwachstum vor allem im Kambium und in der Differenzierungszone des Xylems notwendig sind (Dünisch and Bauch, 1994; Kuhn *et al.*, 1997). So steigt insbesondere während der Zellstreckung der symplastische Kaliumgehalt an. Die molekulare Basis des Kaliumtransports für eine kontrollierte Aufnahme und Verteilung des Kaliums war jedoch in mehrjährigen Pflanzen unerforscht und wurde daher zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Nach Identifikation von integralen Membranproteinen, die Kaliumionen über Doppellipidschichten transportieren, sollten kaliumabhängige Prozesse des Holzwachstums erforscht werden, um die Aktivität der Kaliumtransporter mit der des Kambiums und damit der Holzbildung zu verknüpfen.

1.1 Das kambiale Meristem

Als größtes Bildungsgewebe im Prozess des sekundären Dickenwachstums erzeugt das vaskuläre Kambium jedes Jahr mehr Biomasse als alle anderen biologischen Systeme und liefert somit die größte chemische Energie (Iliev and Savidge, 1999). Im Anschluss an das primäre Wachstum gliedern die meristematischen Zellen des Kambiums nach innen und außen Gewebe ab, das als sekundäres Xylem (Holz) bzw. sekundäres Phloem (Bast) bezeichnet wird. Das für mehrjährige Pflanzen charakteristische sekundäre Meristem unterscheidet sich von den apikalen, meristematischen Geweben durch das Vorhandensein eines axial lang gestreckten, fusiformen Zelltyps, neben den typischen isodiametrischen Strahlinitialen (Mellerowicz *et al.*, 2001 und Abb. 1).

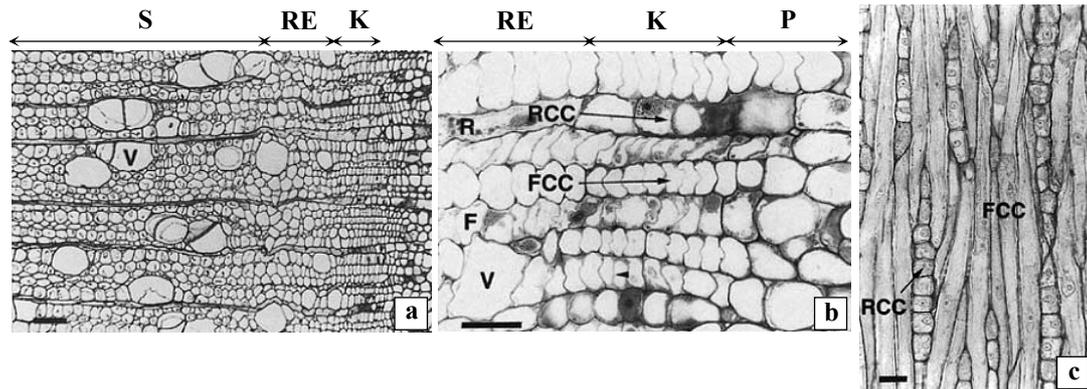


Abb.1: Das vaskuläre System eines Pappelhybrids, aus Mellerowicz *et al.*, 2001. (a) Überblick des Kambiums in einem Querschnitt. (b) Querschnitt bei größerer Auflösung. (c) Tangentialer Schnitt durch das Kambium. FCC, fusiforme Initialzellen; RCC, kambiale Strahlzellen; K, Kambium; R, Strahl; RE, Zone der radialen Expansion; S, Zone der Sekundärwandbildung; P, Phloem; V, Gefäß; F, Faser. Balken: a = 50 μm , b und c = 20 μm .

Die fusiformen Initialzellen sind im aktiven, teilungsfähigen Zustand des Kambiums durch eine extreme Vakuolisierung gekennzeichnet (Arend, 2001 und Abb. 2). Durch hauptsächlich perikline aber auch antikline Teilungen entsteht eine Vielzahl axialer und radialer Zelltypen, die zusammen ein komplexes, dreidimensionales Gewebe bilden, wodurch die Pflanze an Umfang zunimmt (Chaffey *et al.*, 2002 und darin zitierte Literatur). Die fusiformen Zellen teilen sich meist periklin, so dass innerhalb einer radialen Reihe neue Zellen entweder dem sekundären Xylem oder dem sekundären Phloem angegliedert werden. Im Gegensatz zu anderen Zellen wird hierbei die Zellwand längs (axial) eingebaut. Dafür müssen enorme biosynthetische Prozesse von der sich teilenden, kambialen Zelle durchgeführt werden, die über einen relativ langen Zeitraum von mehreren Tagen andauern (Mellerowicz *et al.*, 2001). Für die Umfangserweiterung des Baumstammes werden durch antikline Teilungen kambialer Initialzellen zusätzliche radiale Zellreihen eingefügt. Hierbei werden die neuen Zellwände radial eingebaut. Außerdem spielen antikline Teilungen bei der Regulierung der Länge fusiformer Zellen eine wichtige Rolle und sind somit auch indirekt für die Länge der daraus entstehenden Fasern verantwortlich. Damit wird die Holzbildungsrate, beruhend auf der Aktivität des Kambiums, im Wesentlichen durch die Anzahl der meristematischen Zellen und durch die Zahl der Zellteilungen im Kambium bestimmt. In der gemäßigten Klimazone unterliegt die Tätigkeit des Kambiums wiederum im Jahresverlauf einem Wechsel von Ruhestatus und aktivem Teilungszustand. Folglich sind mehrere, distinkte Entwicklungszonen des Kambiums zu unterscheiden (Iliev and Savidge, 1999):

- Zu Beginn im Frühling ist das direkt am Holz anliegende Kambium noch unvollständig rehydriert und meristematisch inaktiv.
- Später, nach Vakuolisierung der fusiformen, kambialen Zellen, setzen die Zellteilungen ein und das Kambium wird zum aktiven Meristem.
- In der weiteren, jahresabhängigen Entwicklung des Kambiums, noch bevor die Differenzierung der tracheären Elemente beginnt, beenden die Zellen an der inneren Seite des Kambiums den Teilungsprozess und gehen in die primärwandige, radiale Expansion („RE-Zone“) über.

Während die Reaktivierung des Kambiums und die Entwicklung der RE-Zone an der Basis der Baumkrone einsetzt, pflanzt sich das Muster der wiederaufgenommenen Xylognese basipetal über den Stamm fort, ausgehend von beblätterten zu nichtbeblätterten Regionen. Im Spätherbst und Winter stellt das Kambium seine Teilungsaktivität vollständig ein und geht in einen Ruhezustand über. Die Zellen des ruhenden Kambiums enthalten, im Gegensatz zu einer großen Zentralvakuole im aktiven Kambium, zahlreiche kleine Vakuolen, Lipidtröpfchen, Proteinkörper und sind von relativ dicken Zellwänden begrenzt (Arend *et al.*, 2003 und Abb. 2 a und b). Ferner reduziert sich die Anzahl der kambialen Zellreihen von etwa fünf bis sechs im Sommer über vier bis fünf im Herbst auf nur drei Zellreihen im Winter (Abb. 2 c und d).

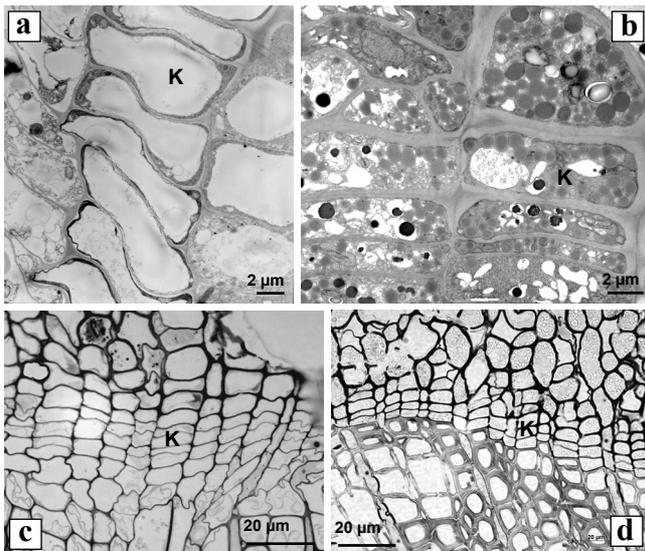


Abb.2: Saisonale Veränderungen der Zell- und Gewebestruktur des Pappel-Kambiums im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und Lichtmikroskop, Arend M., Institut für Holzforschung, TU München. (a) und (c) Zellen des aktiven Kambiums im Frühjahr und Sommer mit einer großen Zentralvakuole in 5 - 6 Zellreihen. (b) und (d) Ruhendes Kambium im Herbst und Winter mit zahlreichen, kleinen Vakuolen und nur noch 3 Zellreihen. (K = kambiale Zelle)

1.2 Die Differenzierung der kambialen Derivate Xylem und Phloem

1.2.1 Xylem

Sowie eine Zelle des Kambiums aus der meristematischen Zone gelangt, beginnt auf der Xylemseite der Prozess der räumlichen Expansion (RE-Zone, vgl. Abb. 1). Die Ausdehnung der mit Primärwänden begrenzten Zellen beginnt mit einem Anstieg des Zellurgors, hervorgerufen durch den Transport osmotisch aktiver Substanzen in die Vakuole und der daraus resultierenden Wasseraufnahme. Als Osmotikum spielt Kalium hier eine wichtige Rolle (Dünisch *et al.*, 1998; Krabel, 2000; Philippar *et al.*, 1999). Aus den fusiformen Initialzellen des Pappel-Kambiums gehen im Differenzierungsprozess drei verschiedene, langgestreckte Zelltypen hervor: Gefäßelemente, Fasern und axiale Parenchymzellen. Während sich Fasern und axiale Parenchymzellen hauptsächlich in radialer Richtung ausdehnen, wird die radiale Expansion der Gefäße durch beträchtliches tangenciales Wachstum begleitet (Mellerowicz *et al.*, 2001). Die Faser-Elongation wird zusätzlich durch Wachstum an den Zellenden erreicht, das mit einer Auflösung der Mittellamellen zwischen benachbarten Zellen und lokaler Primärwandsynthese einhergeht. Die Strahlinitialen des Kambiums bilden dagegen Strahlzellen mit und ohne Verbindungen zu Gefäßen, die sich in der RE-Zone ausweiten. Die RE-Zone wiederum geht in eine Zone der Sekundärwandbildung und Lignifizierung (SL) über, die vor Einsetzen der protoplasmatischen Autolyse der Gefäße am stärksten ausgeprägt ist (Iliev and Savidge, 1998) und sich dann zum vollständig ausdifferenzierten Xylem entwickelt. Nach Erreichen der endgültigen Größe und Form der Xylemelemente in der RE-Zone führt eine Vernetzung von Pektinen in Mittellamelle und Primärwand durch Calcium zu einer Versteifung der bislang dehnbaren Zellwand. Im Anschluss daran beginnt die Auflagerung einer sekundären Zellwand in allen Zelltypen des Xylems, wobei in der Pappel sekundäre Wandschichten zuerst in den Gefäßelementen und ihren Kontaktzellen (Strahlzellen mit Verbindungen zu Gefäßen) aufgelagert werden (Murakami *et al.*, 1999). Die über eine Lamelle mit der Primärwand verbundene Sekundärwand besteht im ausdifferenzierten Zustand aus drei Schichten (S1 - S3), die nacheinander vom Zellinneren aus aufgelagert wurden und sich in Dicke und Orientierung der eingelagerten Mikrofibrillen voneinander unterscheiden. Zur Gewährleistung des Nährstofftransports von der Wurzel zum Spross werden bei der Sekundärwandbildung in Gefäßen und Kontaktzellen Regionen für die Formierung unzähliger Tüpfel und Perforati-

onsplatten koordiniert angelegt. Kontaktstrahlzellen in *Populus* können auch eine Tertiärwand entwickeln. Sie wird nach Autolyse des benachbarten Gefäßes auf die lignifizierte Sekundärwand als Schutzschicht gelagert (Benayoun, 1983). Auch auf der Ebene des Cytoskeletts existieren Unterschiede parallel zur Differenzierung der Xylemzellen. So sind in Primärwänden die Mikrofilamente (MF) prinzipiell in gebündelten Helices longitudinal orientiert und durchspannen die Zelle von einem Ende zum anderen (s. Abb. 3 a), während in ausdifferenzierten Gefäßen und Fasern mehrere, verschiedene Anordnungen von MF nachgewiesen wurden (Chaffey *et al.*, 2000).

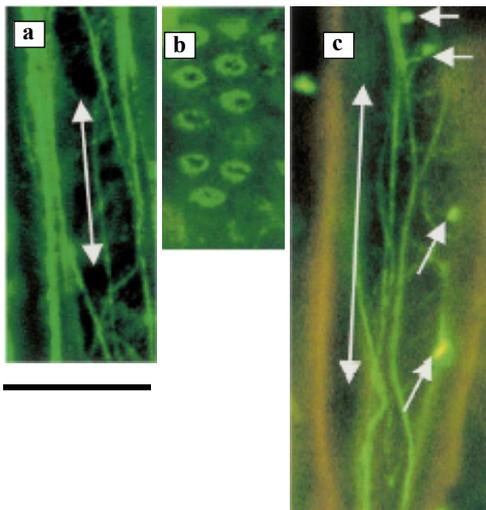


Abb. 3: Mikrofilamente in radial longitudinal Schnitten des Xylems in verschiedenen Entwicklungszuständen nach indirekter Immunolokalisation von F-Aktin, aus Chaffey *et al.*, 2000. (a) Xylemfaser zu Beginn der Differenzierung mit überwiegend axialen MF-Bündeln. (b) Charakteristische MF-Ringe während der Bildung von Tüpfeln in einem Gefäß. (c) Differenzierte Xylemfaser mit axial verzweigten MF und neu geformten, ellipsenförmigen MF. Balken = 30 μm .

Gefäßelemente verfügen demnach neben den axialen Bündeln über zirkuläre Anlagen von MF, die mit der Entwicklung von Hoftüpfeln zwischen Gefäßen und Strahlen einhergehen (Abb. 3 b). Fasern besitzen in ihren Sekundärwänden Ellipsen von MF (Abb. 3 c), welche die Bildung einfacher Tüpfel begleiten. Mit der Auflagerung tertiärer Wandverdickungen in Gefäßen treten auch lineare MF auf.

Die Inkrustierung mit Lignin, einem Mischpolymer aus Phenylpropanen, erfolgt wiederum zuerst in den Gefäßen und Kontaktstrahlen mit Sekundärwänden, während die Fasern und Strahlzellen ohne Kontakt zu Gefäßen später lignifizieren. Die Ligninzusammensetzung ändert sich im Laufe der Zelldifferenzierung mit dem Abstand zum Kambium. Je näher die Zellen am Meristem liegen, umso mehr p-Hydroxyphenyl- (H) und Guaiacyl-Einheiten (G) sind im Lignin enthalten. Dagegen steigt der Anteil von Syringyl-Einheiten (S) mit zunehmender Entfernung zum Kambium. Nach vollständiger Lignineinlagerung setzt mit der Autolyse der Gefäßprotoplasten der letzte Schritt der Differenzierung ein. Die lignifizierten Kontakt-Strahlzellen bleiben dagegen im ausdifferenzierten Zustand am Leben. Der programmierte Zelltod der Gefäße wird durch Auxin eingeleitet (Aloni, 1998; Mellerowicz *et al.*, 2001).

Nach Beendigung der Differenzierung des Xylems lässt sich das Pappel-Holz folgendermaßen einteilen (Panshin and de Zeeuw, 1980):

- mit 53 - 55 % stellen die festigenden Fasern den größten Anteil,
- 33 % des Holzes wird durch die leitenden Gefäße repräsentiert,
- die dem Radialtransport dienenden Strahlzellen sind mit 11 - 14 % vertreten und
- nur weniger als 1 % des Holzes verkörpern axiale Parenchymzellen.

1.2.2 Phloem

Zum Frühjahrsanfang setzen in der äußeren Zone des Kambiums die Zellstreckungen des sekundären Phloems und seine Differenzierung zu Siebröhren, Geleitzellen, Baststrahlen, Fasern und Bastparenchym ein. Die Baststrahlen bilden die Fortsetzung der Holzstrahlen und gewährleisten den radialen Transport der Nährstoffe bis in die äußersten Zellschichten des Stammes (Murakami *et al.*, 1999; Sauter, 2000). In Angiospermen bilden differenzierte Siebröhren und Geleitzellen strukturell und funktionell einen Komplex mit hochspezialisierten, symplastischen Verbindungen für den permanenten und selektiven Austausch von Mikro- und Makromolekülen (z. B. van Bel, 2003 und Abb. 4). Der SE/CC-Komplex (engl.: sieve element/ companion cell) entsteht ontogenetisch durch inäquale Teilung aus einer gemeinsamen, kambialen Mutterzelle. Eine Tochterzelle differenziert sich dann in eine oder mehrere metabolisch hoch aktive Geleitzellen mit dichtem Cytoplasma sowie zahlreichen Mitochondrien und Plastiden (vgl. Abb. 4). Während die Geleitzelle im ausdifferenzierten Zustand den Zellkern behält, verliert die andere Tochterzelle diesen und unterliegt einem kontrollierten partiellen Auflösungsprozess, bis sie schließlich als vollständig entwickelte Siebröhre Transportfunktionen übernimmt. In diesem Prozess zerfällt nach und nach der Zellkern. Der Tonoplast und Elemente des Cytoskeletts lösen sich auf und Ribosomen, Golgi-Vesikel sowie Mitochondrien reduzieren sich zahlenmäßig stark. Am Ende sind nur noch die Plasmamembran und ein dünner Schlauch des Cytosols übrig, der hauptsächlich von glattem Endoplasmatischem Reticulum und Mitochondrien erfüllt ist (Abb. 4). Daneben existieren noch phloemspezifische Plastiden und Siebröhren - P - Proteine. Nur zum Teil kommt es zur Auflagerung sekundärer Wandschichten, wobei die Zellwände nicht lignifiziert werden. Demzufolge sind Siebröhren, im Gegensatz zu den Tracheiden des Xylems, noch lebende Zellen, die aber metabolisch von den Geleitzellen abhängig sind. Zwischen den Geleitzellen und Siebröhren-Elementen entwickeln sich daher zahlreiche, auf der Seite der Geleitzelle stark verzweigte Plasmodesmen, die als Poren/Plasmodesmen

jungen Blättern transportiert werden. Zudem werden im Phloem eine Reihe von Signalstoffen, wie z. B. Phytohormone, Peptide und Sekundärstoffe, in geringen Konzentrationen befördert. Das Phloem spielt folglich neben der Versorgung mit Metaboliten auch eine Rolle in der Signaltransduktion, z. B. zur systemischen Resistenz (Hartmann, 1999; Dannenhöffer *et al.*, 2001). Die im Phloemsaft enthaltene RNA könnte im Rahmen einer Signalkette die Genexpression in entfernten Geweben kontrollieren (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). Ebenso wird dem Phloem die Weiterleitung von Aktionspotentialen entlang der Siebelemente zur Signalübertragung unterstellt (Fromm and Eschrich, 1993; Rhodes *et al.*, 1996). Der bereits 1930 von Münch beschriebene, turgorbetriebene Stofftransport in den Siebröhren (z. B. van Bel, 2003) kann auch Pathogene, wie z. B. Viren und Bakterien, enthalten, die sich im Verlauf der Evolution an die speziellen, strukturellen und funktionellen Besonderheiten der Siebröhren angepasst haben (Oparka and Santa Cruz, 2000).

Das Phloem von Angiospermen kann funktionell in drei Bereiche eingeteilt werden, die in der Pflanze in verschiedenen Geweben lokalisiert sind (van Bel, 2003):

- „Sammel-Phloem“: In den kleinen Äderchen photosynthetisch aktiver Blätter nehmen Zellen des Phloems die Produkte der Photosynthese auf.
- „Transport-Phloem“: In Hauptadern der Blätter und Petiolen sowie in Stamm und Hauptwurzeln werden die Assimilate hauptsächlich von den „source“-Geweben zu den „sinks“ transportiert. Auf diesem Weg finden gleichfalls, wenn auch in geringem Umfang, Be- und Entladungsvorgänge statt.
- „Entladungs-Phloem“: Schließlich werden die Nährstoffe in sich streckende und speichernde Zellen verschiedenster „sink“-Gewebe abgegeben.

Die Aufnahme und Abgabe der Photoassimilate durch den SE/CC-Komplex wird zur Kontrolle des osmotischen und elektrischen Potentials von kompensatorischen Ionen- und Wasserflüssen begleitet. Molekularbiologische Analysen bestätigen die Expression von Zucker-Transportern, Protonen-Pumpen, Aquaporinen und Kanälen im Phloem, die den Transport von Nährstoffen und Wasser vermitteln (Stadler and Sauer, 1996; Barker *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2000; Langhans *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2000; Ache *et al.*, 2001; Deeken *et al.*, 2000 und 2002). Neben den Sucrose/H⁺-Symportern, die entscheidend an der Beladung der Siebröhren und Geleitzellen beteiligt sind, spielen Kaliumkanäle eine wesentliche Rolle bei der Be- und Entladung des Phloems mit Zucker und Wiedergewinnung des Kaliums aus dem Phloem (Ache *et al.*, 2001; Deeken *et al.*, 2000 und 2002).

Mit Hilfe der Aphiden-Technik kann das Membranpotential der Siebröhren abgeleitet wer-

den (Wright and Fischer, 1981; Fromm and Eschrich, 1988). Diese Untersuchungen zeigen, dass die elektrischen Eigenschaften des SE/CC-Komplexes von einer Kaliumleitfähigkeit bestimmt werden, die durch im Phloem exprimierte Kaliumkanäle (s. 1.4.2) aufrechterhalten wird (Ache *et al.*, 2001). Durch apoplastische Veränderungen der Protonen-, Kalium- und Calciumkonzentrationen können diese Kaliumkanäle reguliert werden. Veränderungen der Kaliumkonzentration scheinen auch bei der Reaktivierung des Kambiums eine Rolle zu spielen.

Insbesondere in mehrjährigen Pflanzen kann sich die Richtung des Assimilat-Flusses umkehren. Sie transportieren im Herbst über das Phloem Zucker, Mineralien und Hormone aus den „source“-Blättern in die Bast- und Markstrahlen des Stammes und ins Parenchym. Nach Beendigung der Ruhephase im Frühjahr werden die Stoffe in das verbrauchende Kambium im Stamm und in die Blattknospen geleitet und dienen hier der Zellteilung, Zellstreckung und Differenzierung. Die kambiale Reaktivierung im Frühling wird neben Licht und Temperatur von Phytohormonen, insbesondere Auxin, gesteuert (Uggla *et al.*, 1996 und 2001). Energiedispersive Röntgenanalysen (engl.: Energy dispersive X-ray analysis, EDXA) ergaben für Kalium einen enormen Konzentrationsanstieg im Kambium (Arend and Fromm, 2000), der allein durch die Kalium-Neuaufnahme aus dem Boden nur schwer zu erklären ist.

Neben den lebenden Zellen des Phloems werden Mineralien in höheren Pflanzen nach der Aufnahme durch die Wurzeln vorwiegend im hochentwickelten Leitungssystem des Xylems mit dem Transpirationsstrom zu den Verbrauchsorten befördert. Die Hauptaufgaben des Xylems bestehen neben dem gerichteten Transport großer Mengen von Wasser sowie darin gelöster Ionen, Aminosäuren und Zucker (de Boer and Volkov, 2003) vor allem in der Festigung der Pflanze. Bis zur Aufnahme ins Xylem der Wurzel wird der Transport des Wassers und darin gelöster Stoffe durch zahlreiche morphologische Strukturen, wie z. B. Epidermis und Endodermis, eingeschränkt. Die wässrige Lösung dringt entweder apoplastisch zwischen den Zellwänden oder symplastisch, von Zelle zu Zelle, vor. Der apoplastische Weg innerhalb der Zellwand endet spätestens an den Zellen der Endodermis, deren radiale Zellwände wachsartige, lipophile Suberin-Auflagerungen (Casparysche Streifen) aufweisen. Mittlerweile ist sicher, dass die symplastische Route des Wasserstroms die Apoplastische überwiegt, nicht zuletzt aufgrund des größeren Querschnitts des Symplasten, verglichen mit dem des Apoplasten (de Boer and Volkov, 2003). Die selektive Aufnahme von Ionen in die Zelle wird durch integrale Membranproteine (s. 1.4) vermittelt und wird im Folgenden am Beispiel von Kalium dargestellt.

Der aus *Arabidopsis thaliana* isolierte Kaliumkanal AKT1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ -Transporter 1) ermöglicht an dieser Stelle die Kalium-Aufnahme aus dem umgebenden Medium bzw. aus dem Apoplasten in das Cytosol der Wurzelhaar- und Cortexzellen (Hirsch *et al.*, 1998; Spalding *et al.*, 1999). Damit das Kalium am Ende des symplastischen Weges in die Xylemgefäße gelangen kann, muss es wiederum durch ein entsprechendes Transportprotein von den Xylemparenchymzellen abgegeben werden. Gaymard *et al.* isolierten 1998 mit SKOR (Stelar K^+ outward rectifying channel) aus der Wurzel von *Arabidopsis* einen auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal. In mit dem entsprechenden Promotor-GUS-Konstrukt transformierten Pflanzen wurde SKOR ausschließlich im Xylemparenchym, das die Gefäße des Xylems umgibt und in Zellen des Perizykels der Wurzel, ein Gewebe, von dem aus Seitenwurzeln gebildet werden, lokalisiert. SKOR, der durch cytosolischen pH und Calcium reguliert wird, spielt eine bedeutende Rolle bei der selektiven Beladung des apoplastischen Xylems mit Kalium (Gaymard *et al.*, 1998; Wegner and de Boer, 1997). Bei Trockenheit und starker Transpiration der Stomata wird der mit Ionen beladene Xylemsaft in großen Mengen zu den Orten der höchsten Verdunstungsrate durch den Transpirationssog gezogen. Dagegen steigt der Xylemsaft bei hoher Feuchtigkeit und fehlender Transpiration nur mäßig durch den Wurzelndruck. Während das über das Xylem transportierte Wasser in die Atmosphäre verdunstet, ist der weitere Weg der mittransportierten Ionen bislang noch nicht vollständig geklärt. Zum einen können Ionen während des gesamten Transports von der Wurzel bis zu den Blattspitzen über spezialisierte Transferzellen vom Xylem ins Phloem und umgekehrt aufgenommen werden, so dass es zu einem Stoffaustausch zwischen Xylem und Phloem kommt (Taiz and Zeiger, 1998; de Boer and Volkov, 2003). Zum anderen sind in benachbarten Zellen an der Peripherie des Xylems ebenfalls Kalium-Transportproteine lokalisiert, die Kalium wieder in den Symplasten aufnehmen.

1.4 Die Bedeutung des Kaliums für die Pflanze und sein Transport mit Hilfe von Membranproteinen

1.4.1 Kalium in der Pflanze

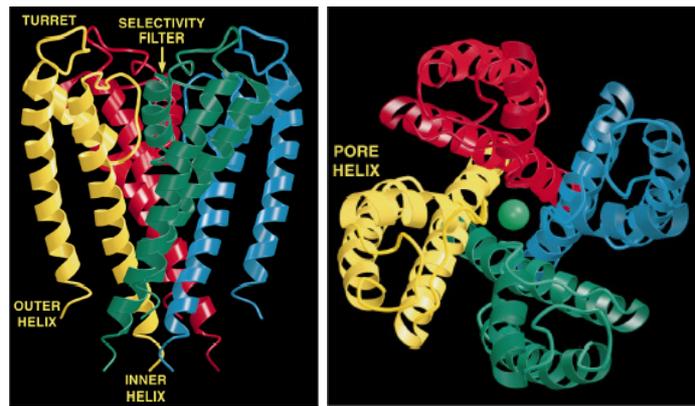
Kalium ist ein essentieller Nährstoff und das am häufigsten vorkommende anorganische Kation in Pflanzen. Dementsprechend umfangreich sind seine Funktionen in der Pflanze.

Kalium ist wichtig als Osmotikum während der Zellexpansion, Stoma-Öffnung und bei Tropismen (Philippar *et al.*, 1999; Mäser *et al.*, 2002), außerdem für Enzymaktivierungen, die Protein-Biosynthese und Photosynthese. Die Mechanismen der Kaliumaufnahme und des Transports wurden in den verschiedenen Zelltypen der Wurzel, des Sprosses und des Blattes intensivst erforscht (z. B. Hedrich and Roelfsma, 1999). Die Aufnahme des Kations aus dem Boden wird maßgeblich durch die Kalium-Aufnahmekanäle des AKT1- (Sentenac *et al.*, 1992) und AtKC1-Typs (*Arabidopsis thaliana* $\underline{\text{K}}^+$ channel; Reintanz *et al.*, 2002) der *Shaker*-Familie und „high-affinity“- $\underline{\text{K}}^+$ -Transportern, der HKT- und KUP/HAK/KT-Familie ($\underline{\text{K}}^+$ uptake-/high-affinity $\underline{\text{K}}^+$ -/ $\underline{\text{K}}^+$ -Transporter) in den Symplasten vermittelt (Brüggenmann *et al.*, 1999; Gassman *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Reintanz *et al.*, 2002; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2000). Für den Langstrecken-Transport des Kaliums im Xylem muss das Ion erneut eine Membran überqueren und daher aus Zellen des Xylemparenchyms der Wurzel in das apoplastische Leitgewebe abgegeben werden. Dies wird durch den auswärtsgerichteten *Shaker*-Kanal SKOR (Gaymard *et al.*, 1998), der ausschließlich im unterirdischen Xylemparenchym von *Arabidopsis*-Wurzeln lokalisiert ist, realisiert. Die Expression dieses Kanals wird durch das „Seneszenz-Hormon“ ABA reprimiert und durch Kaliummangel induziert. Über den Transpirationsstrom gelangt das Kalium in die oberirdischen Organe, wird größtenteils von den Blättern aufgenommen und über das Phloem in weitere „sink“-Gewebe, wie z. B. junge Blätter, Kambium, Blüten, Samen, Früchte und sich neubildende Wurzeln, transportiert (Ache *et al.*, 2001; Deeken *et al.*, 2000; Fromm and Bauer, 1994; Dünisch *et al.*, 1998; Arend, 2000).

1.4.2 Kaliumkanäle

Die bislang am intensivsten untersuchten Kanalproteine gehören zur Familie der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle. Eine α -Untereinheit setzt sich aus sechs hydrophoben α -Helices zusammen, welche die Membran durchspannen. Das funktionelle Kanalprotein des *Shaker*-Typs bildet sich nach Aggregation aus vier α -Untereinheiten, ähnlich wie bei dem bakteriellen Kaliumkanal KcsA (*Streptomyces lividans*). Dessen α -Untereinheiten enthalten jedoch einen hydrophoben Kern mit nur zwei Transmembranen (TM) und einer Porenregion (P) (Abb. 5).

Abb. 5: Dreidimensionale Struktur des bakteriellen Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans* mit zwei TM und einer P, aus Doyle *et al.*, 1998. Links: Schematische Darstellung des Kanals als integrales Membranprotein. Rechts: Schematische Darstellung des Kanalproteins in der Aufsicht.



Die vierte Helix der *Shaker*- α -Untereinheit ist durch positiv geladene Aminosäuren gekennzeichnet und wirkt daher als Spannungssensor für das spannungsabhängige Öffnen und Schließen der *Shaker*-Kanäle. Zwischen der fünften und sechsten transmembranen Domäne befindet sich eine hochkonservierte, amphiphile Porenregion, die in die Membran eintaucht und zusätzlich als Kalium-Selektivitätsfilter dient (Becker *et al.*, 1996 und Abb. 5). N- und C-Termini des Proteins liegen mit ihren regulatorischen Domänen im Cytosol. Im C-terminalen Bereich verfügen alle bisher klonierten, pflanzlichen Kaliumkanäle über Bindestellen für cyclische Nukleotide und Ankyrin-ähnliche Domänen sowie zusätzlich über konservierte Bereiche basischer und saurer Aminosäuren. Letztere beeinflussen Interaktionen der Kanäle untereinander (Ehrhardt *et al.*, 1997). Elektrophysiologisch lassen sich die *Shaker*-Kanäle in strikte Einwärts- (z. B. KAT1, K^+ -Transporter *Arabidopsis thaliana* 1) und Auswärtsgleichrichter (z. B. SKOR) sowie nicht-gleichrichtende Kanäle (z. B. AKT2/3, *Arabidopsis thaliana* K^+ -Transporter 2/3) unterteilen. Ferner unterscheiden sie sich in ihrer Spannungsabhängigkeit und Sensitivität gegenüber Kanal-Blockern. Anhand des *Arabidopsis*-Genoms lassen sich insgesamt neun Vertreter dieser Familie identifizieren, die am Kaliumtransport beteiligt sind (Véry and Sentenac, 2002; Mäser *et al.*, 2001).

Neben den strukturähnlichen Kanälen des *Shaker*-Typs mit sechs transmembranen Bereichen und einer Pore existieren in *Arabidopsis thaliana* zwei weitere Strukturklassen pflanzlicher Kationen-Kanäle (Véry and Sentenac, 2002; Mäser *et al.*, 2002 und Abb. 6). Dazu zählen die „Zwei-Poren- K^+ -Kanäle“, die sich aus Untereinheiten mit zwei Porenregionen zusammensetzen und durch Dimerisierung ein funktionelles Kanalprotein bilden. Der erste, pflanzliche „Zwei-Poren- K^+ -Kanal“ KCO1 (K^+ channel outward rectifier) wurde von Czempinski *et al.* (1997) aus *Arabidopsis* isoliert. Er ist im Tonoplast von Keimlingen, Blättern und Blüten lokalisiert und wurde als auswärtsgleichrichtender Kaliumkanal elektrophysiologisch charakterisiert (Schönknecht *et al.*, 2002). Die Genomsequenzierung von

Arabidopsis präsentierte vier weitere KCO-Gene dieser Struktur.

Die Untereinheiten der dritten Strukturklasse sind durch je zwei transmembrane Domänen und eine Porenregion charakterisiert (s. Abb. 6). Der Kaliumkanal KCO3 (K⁺ channel out-ward rectifier; Czempinski *et al.*, 1999) repräsentiert den einzigen Vertreter dieser Strukturklasse in *Arabidopsis*.

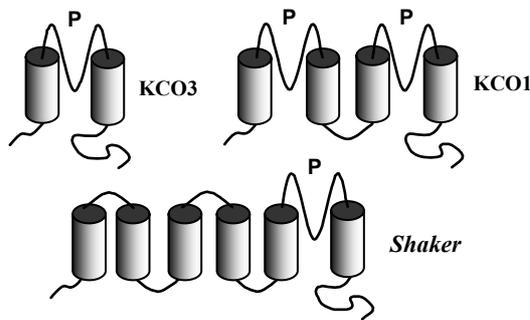


Abb. 6: Strukturklassen pflanzlicher Kaliumkanäle. Der Kanal KCO3 besitzt zwei α -helicale, transmembrane Domänen (TM, zylinderförmig dargestellt) und eine Porenregion (P). Die Kanäle der KCO1-Familie bestehen aus vier TM und zwei P. Die K⁺-Kanäle der *Shaker*-Familie enthalten demgegenüber sechs TM und eine P.

Mit 20 Vertretern ist die Familie der CNGC's (engl.: Cyclic-nucleotide-gated channel) in *Arabidopsis* sehr zahlreich vertreten. Wie die *Shaker*-Kaliumkanäle verfügt eine Untereinheit über sechs hydrophobe Domänen und eine putativen Porenregion zwischen den Transmembranen fünf und sechs. Es handelt sich vermutlich um nicht-selektive Kationen-Kanäle. Am C-Terminus befinden sich überlappende Bindestellen für Calmodulin und cyclische Nukleotide (Baumann *et al.*, 1994; Köhler *et al.*, 1998). Öffnen und Schließen der CNG-Kanäle erfolgt wahrscheinlich ligandenabhängig durch cyclisches Guanosin- (GMP) oder Adenosinmonophosphat (AMP). Zusätzlich wird die Aktivität der Kanäle durch Calcium und Calmodulin reguliert.

1.4.3 Kaliumtransporter

Die KT/KUP/HAK-Familie ist mit 13 Mitgliedern ebenfalls sehr häufig im *Arabidopsis* Genom vertreten. Diese pflanzlichen Gene zeigen hohe Sequenzähnlichkeiten zu den „K⁺ uptake“ Transportern (KUP) von Bakterien (Schleyer and Bakker, 1993) und zu den „high-affinity“ K⁺-Transportern (HAK) aus Pilzen (Banuelos *et al.*, 1995). Über ihre genaue Struktur und funktionelle Aggregation aus Untereinheiten liegen bislang noch keine gesicherten Ergebnisse vor. Hydrophobizitätsanalysen von Kim *et al.* (1998) lassen vermuten, dass eine Untereinheit 12 transmembrane Segmente enthält. Funktionell repräsentiert diese Transporter-Familie hoch- und niedrig-affine Systeme für den Transport von Kalium und Natrium (Fu and Luan, 1998).

Im Co-Transport mit Natrium und Protonen befördern die Membranproteine der „HKT-“ (high-affinity K^+ -Transporter) und der „KEA“-Familie (K^+ exchange antiporter) Kalium über Membranen. Die HKT-Transporter verfügen über vier Porenregionen in einer einzigen Polypeptid-Kette (Durell and Guy, 1999; Kato *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* gibt es im Genom nur einen Vertreter dieser Familie. Dagegen existieren sechs putative K^+/H^+ Antiporter, bestehend aus 14 putativen membrandurchspannenden Bereichen mit einer Porenregion zwischen den Segmenten sechs und sieben (Tusnady and Simon, 1998).

Als letztes Kalium-Transportsystem in Pflanzen präsentiert sich LCT1 (low-affinity cation transporter 1). Der Transporter mit Untereinheiten aus 11 membrandurchspannenden Segmenten, leitet Kalium, Calcium und Natrium in die Zelle (Schachtman *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1998) und wurde bislang nur in Weizen identifiziert.

1.5 Der Einfluss von Mineralien, speziell des Kaliums, auf die Holzbildung und jahreszeitliche Veränderungen des Kaliumgehalts

Mineralien sind für eine Reihe von Prozessen des Baumwachstums und für die Vitalität von Bäumen erforderlich. Insbesondere Kalium, Calcium und Magnesium üben einen signifikanten Einfluss auf kambiale Zellteilungen und Differenzierungsprozesse aus (z. B. Eklund and Eliasson, 1990; Dünisch and Bauch, 1994; Kuhn *et al.*, 1997; Arend, 2001). Eine ausreichende Kationen-Ernährung ist essentiell für die Holzbildung. Mit Kalium, Calcium und Magnesium gedüngte Fichten bildeten im Vergleich zu ungedüngten Kontrollen 30 % mehr Biomasse, was auf einen Anstieg der periklinen Zellteilungen infolge einer zeitlich verlängerten, kambialen Teilungsfähigkeit zurückgeführt wurde (Dünisch and Bauch, 1994). Darüber hinaus war der Jahresring zwei Jahre nach der Düngung signifikant verbreitert. Dünisch und Bauch zeigten auch, dass die Holzbildung durch Faktoren wie Temperatur, Licht und Regenfälle stark beeinflusst wird. So verengten sich die Jahresringe der gedüngten Bäume und Kontrollen in einem Jahr mit für das Wachstum schlechten Klimabedingungen synchron. Generell scheint zu Beginn der Wachstumsperiode die Zellteilungsrate und Zellstreckung stark von der Temperatur abzuhängen, dagegen wird die Holzbildung im späteren Jahresverlauf eher vom Wasservorrat beherrscht.

Kalium wird während der Frühholzbildung hauptsächlich im Symplasten sich differenzierender Tracheiden angehäuft. Dagegen reduziert sich der Gehalt deutlich während der Einlagerung von Lignin in die Gefäße (Dünisch *et al.*, 1998). Folglich sind die tracheären Elemente während der Zellstreckung und Primärwandbildung ein starker, physiologischer

Verbraucher des Kaliums. Arend und Fromm (2000) zeigten eine Korrelation zwischen dem jahresabhängigen Zustand des Kambiums und des Kaliums. So wird der Übergang vom ruhenden zum aktiven Kambium von einem starken temporären Anstieg des Kaliums im Kambium begleitet. Semiquantitative Elementbestimmungen mittels EDXA in Kombination mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zeigten während der Reaktivierung des Kambiums im Frühjahr eine kambielle Konzentrierung des Kaliums im Vergleich zu den angrenzenden Phloem- und Xylembereichen (Arend *et al.*, 2002 und Abb. 7).

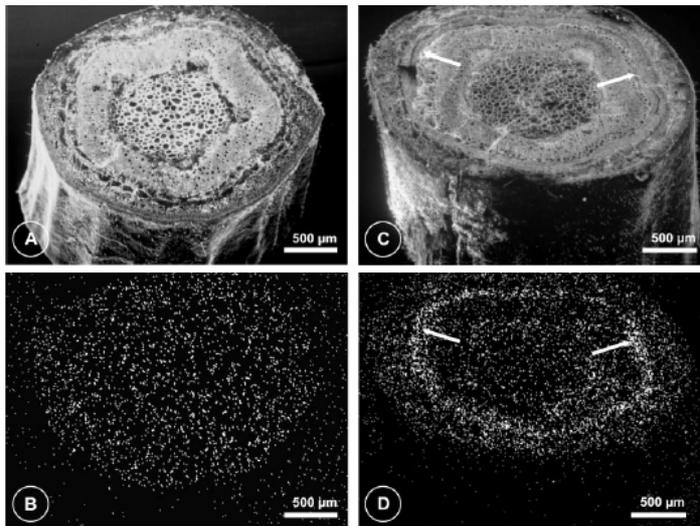


Abb. 7: Kaliumverteilung in Zweigen von *P. trichocarpa*, Arend *et al.*, 2002. A, REM-Aufnahme eines Zweigquerschnitts während der Ruhephase im November. B, Gleichmäßige K^+ -Verteilung im Röntgenrasterbild derselben Probe wie in A. C, REM-Aufnahme eines Zweigquerschnitts direkt nach der kambialen Reaktivierung (Mai). D, Röntgenrasterbild derselben Probe, wie in C, zeigt eine Konzentrierung der K^+ -Signale im Kambium.

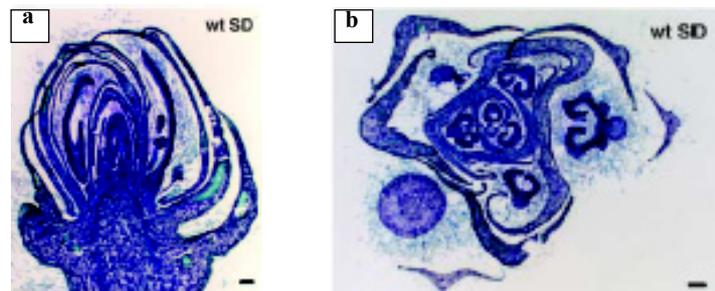
Calcium wird im Gegensatz zum Kalium während der Frühholzbildung in den Siebröhren des inneren Phloems in hohen Konzentrationen angesammelt. Nur 10 % des gesamten Calciums sind in diesem Zeitraum in der Zellwand lokalisiert (Dünisch *et al.*, 1998). Dies ändert sich mit fortschreitender Entwicklung des Xylems. Der Calciumgehalt steigt während der Auflagerung der sekundären Wandschichten in den Holzzellen immens an und sinkt rapide mit beginnender Lignifizierung. Diese Ergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle des Calciums für die Zellwandbildung, speziell vor den Lignineinlagerungen. Als bivalentes Kation vernetzt Calcium zusammen mit Magnesium die Pektine der Zellwand und beeinflusst so ihre Dehnbarkeit und Stabilität.

1.6 Die Blattknospenentwicklung in Bäumen

Der typische Bau der Bäume ist durch einen kräftigen Baumstamm, viele Zweige mit zahlreichen Blättern während der Wachstumsphasen und ein ausgeprägtes Wurzelsystem ge-

kennzeichnet. Diese Struktur wird neben der Aktivität des Kambiums durch die jährliche Anlage von Blattknospen hervorgerufen und wird durch langjähriges Wachstum mit der Zeit umfangreicher und größer. In für das Wachstum schlechten Zeiten, wie z. B. während der Kälte- und Trockenperioden des Winters, schützen mehrjährige Pflanzen, besonders Bäume, viele ihrer Meristeme in den Blattknospenanlagen am Spross. Strukturell setzt sich eine Knospe aus mehreren, schützenden Hüllschichten zusammen, die eine charakteristische Anzahl dicht gepackter, embryonaler Blätter und Blattprimordien umgeben (Abb. 8). Im Herbst, mit abnehmender Tageslänge und sinkenden Temperaturen gehen die im Sommer und Herbst angelegten Knospen in einen endogenen Ruhezustand über (Jian *et al.*, 1997; Jeknic and Chen, 1999; Frewen *et al.*, 2000; Rohde *et al.*, 2002), während dessen Zellteilungen und Streckungen vollständig eingestellt sind. Nach einer Frostperiode und Erreichen des ecodormanten Stadiums (Rohde *et al.*, 2000) schwellen die Knospen im Frühjahr an, bis sich schließlich bei guten Wachstumsbedingungen die Blätter entfalten. Ein aktiver Apex produziert dann von April bis August anhaltend Blätter, die sich parallel strecken (Rohde *et al.*, 2002).

Abb. 8: Morphologie einer apikalen Blattknospe von *P. tremula* x *P. alba*, aus Rohde *et al.*, 2002. (a) Longitudinal-Schnitt. (b) Radial-Schnitt.



Trotz zahlreicher physiologischer Studien ist über die endogenen Prozesse der Knospentwicklung nur sehr wenig bekannt. Eine erste umfassende, genetische Analyse der Knospenanlage und des Öffnens der Knospen lässt jedoch eine sehr strenge genetische Kontrolle vermuten (Frewen *et al.*, 2000). Rohde *et al.* zeigten 2002 erstmals, dass die molekularen Prozesse der Knospen- und Samenruhe über eine gemeinsame Basis verfügen. PtABI3 (*Populus tremula* Abscisic acid insensitive gene 3) beeinflusst, zusätzlich zu seiner Funktion in den Samen, die Größe und Anzahl der embryonalen Blätter und Knospenschichten. Wie Samen, müssen auch Knospen Frost überstehen. Das Einleiten der Ruheperiode und die Reaktivierung von Samen und Knospen werden bei guten Wachstumsbedingungen höchstwahrscheinlich von Abscisinsäure und Gibberellinen beeinflusst (Rohde *et al.*, 2002). Derzeitige Vorstellungen gehen davon aus, dass in beiden Meristemanlagen ähnliche Vorgänge ablaufen, welche die Zellen für die Ruheperiode dehydrieren und für die

Wiederaufnahme des Wachstums rehydrieren. Darüber hinaus sollten für die Reaktivierung der Knospen, wie für die Samen, Reserveproteine und Lipide akkumuliert werden. Als Mechanismus für die Kälteadaptation und zum Schutz gegen Frost wurde von Bilkova *et al.* (1999) die Anhäufung von Polyphenolen in Knospen durch die erhöhte Aktivität einer unspezifischen Esterase zu Herbstbeginn vorgeschlagen. Beobachtungen der Ultrastrukturen in Knospenzellen zeigten nach Erreichen des Ruhezustands eine Akkumulation von Stärkekörnern und Lipid-Protein-Körpern sowie Blockaden symplastischer Zell-Zell-Verbindungen durch Glykoproteine und Endoplasmatisches Reticulum (Jian *et al.*, 1997). Aufgrund der komplexen Regulation zum Einleiten von Ruheperioden im Herbst und der Reaktivierung im Frühling repräsentieren Knospen ein baumspezifisches Phänomen, das bislang nur wenig erforscht ist und deshalb mehr in den Brennpunkt der Forschung gerückt werden sollte.

1.7 Zielstellung

Trotz Vorkenntnissen über saisonale Änderungen des Kaliumgehalts und massiver Kaliumverschiebungen in Bäumen im Frühjahr und Herbst war die molekulare Basis des Kaliumtransports ausdauernder Pflanzen bislang kaum erforscht. In Vorarbeiten konnte bereits der *Shaker*-Kanal PTORK (*Populus tremula* outward rectifying K^+ -channel) aus *P. tremula* x *P. tremuloides* isoliert und elektrophysiologisch charakterisiert werden. Um den Zusammenhang von Kaliumtransport und kaliumabhängigem Holzwachstum der Pappel aufzuklären, ergaben sich für die vorliegende Dissertation folgende Ziele:

- (i.) Die Etablierung des Hybrids *P. tremula* x *P. tremuloides* in Steril-, Suspensions-, Erd- und Hydrokulturen
- (ii.) Die Isolierung und molekulare Analyse von K^+ -Transportproteinen
- (iii.) Der funktionelle Nachweis und die Charakterisierung der klonierten Kalium-Transporter
- (iv.) Die Expressionsanalyse und Lokalisation der isolierten Kalium-Transporter
- (v.) Die Korrelation der Expressionsmuster der identifizierten Transporter-Transkripte mit der Aktivität des holzbildenden Kambiums
- (vi.) Die Entschlüsselung der Bedeutung der Pappel-Kalium-Transporter für die Pflanze in physiologischen Experimenten

2. Material und Methoden

2.1 Anzucht der Pappel *Populus tremula* x *Populus tremuloides*

2.1.1 Agarkultur

Der Pappel-Hybrid-Klon *P. tremula* L. x *P. tremuloides* Michx. T89 (freundlicherweise von PD U. Nehls, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt) wurde mit Hilfe von Hormonen über Kallusbildung aus Sprossgewebe steril vermehrt. Im ersten Anzuchtstadium in Petrischalen (Medium I, 3 - 4 Wochen) wuchsen nach Kallusbildung Sprosse. Nach Umsetzen in Magenta-Gefäße mit Medium II entwickelten sich die Sprosse weiter (3 - 4 Wochen, Abb. 9 a). Nach weiterem Umsetzen in Weckgläser (Medium III, Abb. 9 b) bildeten die Sprosskulturen innerhalb von 4 - 6 Wochen Wurzeln. Die Sprossinduktion erfolgte im Licht-Dunkel-Wechsel 8 h : 16 h (25W, 230V OSRAM; TL70, F32T8/TL 741, Philips) bei Temperaturen von 22 °C im Licht und 16 °C im Dunkeln. Für das weitere Spross- und Wurzelwachstum wurden die Pflanzen bei Temperaturen von 22 °C und 16 h Licht (TLD 58W/840 Super 80, Philips) sowie 17 °C und 8 h Dunkelheit im Langtag kultiviert.

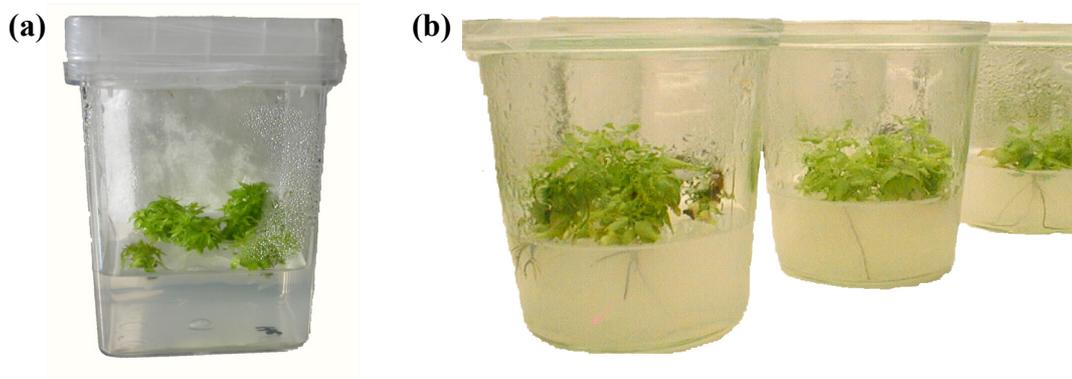


Abb. 9: Sterilkulturen *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.. Links: Sprosslängenwachstum in Magentas und rechts: Bewurzelung in Weckgläsern.

Agarkultur Medium I (pro 1 l):

4.4 g MS-Medium (Murashige and Skoog, Makro- und Mikroelemente, Duchefa)

0.2 mg BAP (6-Benzylaminopurin, Sigma)

0.1 mg IBA (Indolbuttersäure, Duchefa)

0.01 mg TDZ (Thidiazuron, Duchefa)

20 g Sacharose
pH 5.8 (1M KOH)
7 g Agar (Roth, # 4508.1), autoklavieren

Agarkultur Medium II:

4.4 g MS-Medium
0.2 mg BAP
0.1 mg IBA
20 g Sacharose
pH 5.8 (1M KOH)
7 g Agar, autoklavieren

Agarkultur Medium III:

4.4 g MS-Medium
10 g Sacharose
pH 5.8 (1M KOH)
7 g Agar, autoklavieren

2.1.2 Suspensionskultur

Aus dem Spross herangezogene Kalli wurden in MS-Medium bzw. in abgewandelter Hoagland-Lösung (1 mM Kalium) mit jeweils 5 μ M 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D) in Erlenmeyer-Kolben (s. Abb. 10) ohne Schikanen überführt und bei 133 rpm und 26 °C kultiviert. Die im Dunkeln gehaltenen Kulturen wurden wöchentlich durch Abnahme des Überstandes, Zerdrücken der Kalli und Hinzufügen frischen Mediums umgesetzt.

Abb. 10: Suspensionskultur *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx..



2.1.3 Hydrokultur

Bewurzelte Pflanzen wurden in der Klimakammer im Langtag (2.1.1) in abgedunkelten Kolben in Flüssigmedium angezogen (Abb. 11). Das Hydrokultur-Medium wurde wöchentlich gewechselt.

<u>Hydrokultur-Medium:</u>	1.5 mM KH_2PO_4
	2.0 mM KNO_3
	1.0 mM CaCl_2
	1.0 mM MgSO_4
	18 μM FeNaEDTA
	8.1 μM H_3BO_3
	1.5 μM MnCl_2
	pH 6.0



Abb. 11: Hydrokultur *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx..

2.1.4 Freilandkultur

Aus der Sterilkultur gezüchtete und in Erde umgetopfte ca. ein Meter große *P. tremula* x *P. tremuloides* Pflanzen wurden im Freiland angepflanzt und unter natürlichen Bedingungen gehalten (Abb. 12).



Abb. 12: *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. im Freiland. Links: Winter und rechts: Sommer.

2.1.5 Versuchsanordnungen mit *P. tremula x P. tremuloides*

Sämtliche Proben wurden nach Probennahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation (2.3.1) bei - 85 °C gelagert.

2.1.5.1 Jahresgang

Von einer zweijährigen Pappel, die im Freiland im Botanischen Garten der Universität Würzburg angepflanzt worden war, wurden 2001 an folgenden Tagen Proben vom Stamm primärer Äste genommen:

2001									
06.02.	26.03.	19.04.	17.05.	05.06.	<u>27.06.</u>	<u>17.07.</u>	<u>07.08.</u>	<u>16.08.</u>	<u>11.09.</u>

Tab. 2.1 Probennahme Stamm 2001.

Vom 27.06.2001 bis 11.09.2001 wurde der Stamm in eine Xylem-Kambium-Fraktion und eine Kambium-Phloem-Fraktion nach Tuominen, 1997, geteilt (unterstrichene Daten in Tab. 2.1). Für den Rest des Jahres wurden die kompletten Stämmchen als Proben gerntet.

Von der gleichen, nun dreijährigen Pflanze wurden im folgenden Jahr 2002 Blattknospen primärer und sekundärer Äste gesammelt:

2002									
28.02.	14.03.	28.03.	02.04.	11.04.	<u>25.04.</u>	05.06.	19.06.	18.07.	
14.08.	29.08.	11.09.	26.09.	10.10.	24.10.				

Tab. 2.2 Probennahme Knospen 2002.

Der 25. April 2002 war der Tag, an dem sich die Knospen öffneten. Im darauf folgenden Monat bis Anfang Juni waren keine Knospen sichtbar, daher erfolgte keine Probennahme in diesem Zeitraum. Es wurden alle Knospen von jeweils einem Ast mit der Hand abgezwickt.

2.1.5.2 Künstliche Reifung von Knospen

Bereits am 28.02. und 01.03. 2002 wurden Zweige der Freiland-Pappel bis zum Aufplatzen der Knospen in Hydrokultur-Medium in die Langtag-Klimakammer gestellt. Die sehr kleinen und braunen Knospen (Ruhestadium) wurden geerntet. Des Weiteren wurden Knospen in einem beginnenden aktiven Stadium, erkennbar an den äußeren, grünen Blättern (nach 10 - 18 Tagen, im unteren Bereich des Astes) und zu dem Zeitpunkt, als die Knospen aufplatzen (nach 10 - 18 Tagen, im oberen Bereich des Zweiges), gesammelt.

2.1.5.3 Abscisinsäure (ABA)-Experimente

Von 8 - 9 Wochen alten Hydrokultur-Pflanzen wurden morgens um 9.00 die Blätter und Wurzeln entfernt und die Stämmchen in ca. 0.5 - 1 cm lange Stücke geschnitten. Die Stämmchen wurden sofort in Hydrokulturlösung (2.1.3) mit 50 μ M ABA ((+/-)-2 cis-4 trans-Abiscisinsäure, Lancaster) überführt und verblieben unter wiederholtem Schütteln 8 h in der Langtag-Klimakammer (2.1.1). Zur Kontrolle wurden Stämmchen in reinem Hydrokultur-Medium gehalten.

2.1.5.4 Licht/Dunkel-Experimente

Lichtproben wurden um 14.00 (entsprach 8 h Licht) geerntet. Eine Dunkelprobe wurde ebenfalls um 14.00, nachdem die Pflanze für 2 h abgedunkelt worden war und eine zweite Dunkelprobe um 2.00 (entsprach 4 h Dunkel) genommen. Für die anschließende Expressionsanalyse wurden die Petiolen und Hauptadern von 10 - 11 Wochen alten Hydrokultur-Pflanzen aus der Langtag-Klimakammer mit einer Rasierklinge vom Rest der Pflanze abgetrennt.

2.1.5.5 Salz-Experimente

7 Wochen alte Hydrokultur-Pflanzen wurden in Hydrokultur-Medium mit zusätzlich 100 mM NaCl überführt und verblieben bis zur Stamm-Probennahme nach 15 Tagen in der Langtag-Klimakammer. Jeweils nach 1, 11 und 15 Tagen wurden Blatt-Proben gesammelt. Als Kontrolle wurde eine Pflanze in Hydrokultur-Medium gleich behandelt.

Neben den Hydropflanzen wurde auch die Zellkultur mit NaCl versetzt. Zu der Suspensionskultur mit der veränderten Hoagland-Lösung (2.1.2) wurden 300 mM NaCl gegeben und Proben nach 6, 24 und 48 h genommen. Die Suspensionskultur wurde dann wieder in

die Hoagland-Lösung ohne NaCl umgesetzt und nach weiteren 24 h erfolgte erneut eine Probennahme. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne NaCl.

2.1.5.6 Auxin-Experimente

Wie in 2.1.5.3 beschrieben wurden die Stämmchen in ca. 0.5 - 1 cm lange Stücke geteilt. Zur Entfernung des internen Auxins wurden die Proben vor Hormon-Zugabe 1 h ausgewaschen (10 mM KCl, 5 mM MES, pH 6.1), um anschließend für 1 h in 10 μ M 1-NAA (1-Naphthalinessigsäure) inkubiert zu werden.

2.1.5.7 Kalium- und TEA⁺-Behandlungen

Bewurzelte Zweige von *P. trichocarpa* wurden zur Bestimmung der Faser- und Gefäßquerschnitte in Hydrokultur (veränderte Hoagland-Lösung s. 2.1.2) in 0.05, 5 und 10 mM K⁺ kultiviert (Klimakammer mit 20 °C Tagestemperatur, Photon flux: 300 μ Em⁻²s⁻¹). Die Querschnittsflächen der Fasern und Gefäße wurden nach Fixierung und Einbettung in LR White mittels digitaler Bildanalyse (Zeiss Axio Vision System) bestimmt.

Zusätzlich wurden lokal begrenzt auf Zweigoberflächen (kultiviert in 6 mM K⁺) 14 Tage lang 5 mM TEA⁺ appliziert.

Die Bestimmung relativer Kaliumkonzentrationen erfolgte im Rasterelektronenmikroskop (AMR 1200 B, Leitz) in Kombination mit energiedispersiver Röntgenanalyse (EDXA, 4000 X-ray analyser, Kevex).

2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und GUS-Färbung

Sterilisierte Samen transformierter *Arabidopsis* Pflanzen (ssp. Landsberg erecta, ssp. Wasiljewskija) keimten nach 4 wöchiger Samenruhe bei 4 °C in MS-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hygromycin) in der Klimakammer (Kurztage, s. 2.1.1) aus. Transformierte Pflanzen wurden in Erde pikiert und weiter im Kurztage gehalten.

2.2.1 Samensterilisation

Jeweils eine Spatelspitze *Arabidopsis*-Samen wurde für 20 min in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 1.5 ml 100 % Ethanol inkubiert. Nach 30 sec Zentrifugation wurde der Alkohol abgenommen und die Samen mit 1.5 ml frisch angesetzter 5 %iger NaClO-Lösung, vermischt mit 1 Tropfen Triton X 100, versetzt. Nach 15 min Invertieren wurde unter der Ste-

2.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Sämtliche, in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gewebe (Blätter, Blattstiele, Stamm, Wurzel, Knospen, Spross aus Agarkultur, Kallus aus Sterilkultur) wurden noch im gefrorenen Zustand mit einem Pistill im vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver gerieben und zum Auftauen mit Zell-Lysispuffer (s. 2.3.1 und 2.3.2) versetzt.

Die Xylem-Kambium- war von der Phloem-Kambium-Fraktion nur während der aktiven Teilungs-Phase des Kambiums zu trennen. Dazu wurde die Rinde junger Äste mit dem Skalpell eingeritzt und anschließend vom Holz abgezogen. Aufgrund der dünnwandigen Struktur des Kambiums wurde das Gewebe genau in dieser Zone auseinander gerissen. Anschließend wurden mit dem Skalpell sowohl die Bast- als auch die Holz-Seite abgeschabt und so Fraktionen mit stark angereichertem Xylem-Kambium- bzw. Kambium-Phloem-Gewebe isoliert.

2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA (RNeasy)

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde ein System der Firma Qiagen verwendet und entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der selektiven Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren an eine Silikamatrix nach erfolgter Zellyse. Ein spezielles „Hoch-Salz-Puffer-System“ ermöglicht die Bindung von bis zu 100 µg Gesamt-RNA an die Membran mit nachfolgender Aufreinigung. Die gebundene RNA wurde anschließend mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) -behandeltem Wasser eluiert.

Um störende Polyphenole und Polysaccharide zu eliminieren, die an und/oder mit der RNA kopräzipitieren (Gehrig *et al.*, 2000), wurden dem Lysispuffer 1 % PVP (Polyvinylpyrrolidone) und 7 mM Kalium-Ethylxanthogenat zugegeben. Mögliche DNA-Verunreinigungen wurden während der RNA-Isolation an der Matrix durch den Einsatz einer RNase-freien DNase (RNase-Free DNase Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers eliminiert. Nach photometrischer Bestimmung von Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) und Überprüfung der RNA auf DNA-Rückstände mittels PCR (s. 2.4.8) wurde die RNA bei - 85 °C gelagert. Wurde DNA nachgewiesen, folgte eine Inkubation der RNA mit DNase I (Amersham Biosciences, 10 U/50 µg RNA) für 30 min bei 37 °C, anschließend eine Aufreinigung mit Phenol-Chloroform und Fällung mit 1/10 3M Ammoniumacetat pH 5.4 und 1.5 Vol Isopropanol.

2.3.2 mRNA-Isolierung (Oligo dT₂₅-Dynabeads)

Die mRNA-Isolierung kleiner Probenmengen direkt aus dem jeweiligen Gewebe wurde mit Hilfe des Dynabeads mRNA DIRECT Systems (Dyna) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Methode beruht auf Hybridisierung von 25 Desoxythymidinresten (oligo (dT₂₅)), die über eine 5'-Linker-Gruppe kovalent an magnetische Polystyrolkugeln gebunden sind, mit dem 3'-Poly-A⁺-Ende pflanzlicher mRNA. Werden die Dynabeads von einem Magneten angezogen, kann die mRNA sowohl von DNA als auch von tRNA, rRNA und anderen Verunreinigungen abgetrennt werden.

2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Je 10 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe-Präparationen wurden in 1 %igen Agarose-MEN-Gelen mit 18 % Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Zugabe von 2 - 3 Volumen RNA-Ladungspuffer wurden Sekundärstrukturen der RNA durch 15 min Inkubation bei 65 °C denaturiert. Die anschließend eisgekühlten RNA-Proben wurden im denaturierenden 1 % MEN-Agarosegel mit 1 x MEN Puffer bei konstanter Spannung (65 V) aufgetrennt. Das Trennungsmuster wurde unter UV-Licht durch die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht und dokumentiert (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech). RNA-Moleküle von bekannter Größe aus eigenen Präparationen dienten als Größenstandards.

<u>RNA-Ladungspuffer:</u>	0.72 ml Formamid
	0.16 ml 10 x MEN
	0.26 ml 37 % Formaldehyd
	0.25 ml bidest. Wasser
	0.10 ml 80 % Glycerin
	0.01 ml 2 % Bromphenolblau-Lösung
	1 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung

<u>1 % MEN-Agarosegel:</u>	0.25 g Agarose (ICN)
	20.5 ml 1 x MEN
	in der Mikrowelle lösen
	4.5 ml 37 % Formaldehyd

<u>10 x MEN-Puffer:</u>	0.20 M Morpholinopropansulfonsäure
	0.01 M EDTA
	0.05 M Natriumacetat

2.3.4 Transferverfahren für RNA - Northern Blot

„Northern-Blot“ bezeichnet die Überführung der RNA aus einem Agarosegel auf eine Membran (Hybond-N, Amersham). Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal durch Kapillarkräfte. Die RNA wurde durch Belichten mit 0.8 J/cm^2 UV Licht (254 nm, UV Stratalinker 2400, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

Die Membranen wurden für mindestens zwei Stunden bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$ in P_i -Puffer vorhybridisiert. Die RNA-Moleküle wurden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.9) im gleichen Puffer nachgewiesen. Nach viermaligem Waschen der Membranen in P_i -Puffer für 30 - 45 min bei der Hybridisierungstemperatur wurde die Radioaktivität durch Autoradiographie mit Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham) in Autoradiographiekassetten (Appligene) mit Verstärkerfolien (Appligene) detektiert. Nach entsprechender Expositionszeit bei $-85 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Filme entwickelt.

<u>P_i-Puffer:</u>	250 mM Natriumphosphat, pH 7.2
	1 % BSA
	1 mM EDTA
	7 % SDS

2.4 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

2.4.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen aus Retroviren, den Reversen Transkriptasen, ausgeführt. Sie sind in der Lage, vom 3'-Ende eines kurzen Doppelstranges aus, an einer RNA-Matrize eine komplementäre DNA (engl.: copy DNA oder cDNA) zu synthetisieren. Der Doppelstrang ergab sich aus der Hybridisierung eines kurzen, zur RNA komplementären Oligonukleotids (Primer). Mit Hilfe eines oligo (dT)-Primers, der im Bereich des Poly-A⁺-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisierte, wurde die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben. Dagegen wurde bei Einsatz spezifischer Primer schon bei der Erststrangsynthese selektiv das gewünschte Transkript in

cDNA umgeschrieben. Nach der Reaktion wurde der RNA-Strang des RNA-DNA-Hybridmoleküls optional durch Ribonuklease H abgebaut.

2.4.2 Synthese von Marathon-cDNA

Falls ein Sequenz-Bereich eines gesuchten Gens bekannt war, konnten mittels RACE-PCR (engl.: Rapid Amplification of cDNA Ends für schnelle Amplifikation von cDNA-Enden) die 5'- bzw. 3'-Enden des Gens gefunden werden (Frohman *et al.*, 1988). Dazu wurde eine Marathon-cDNA mit Hilfe des MarathonTMcDNA Amplification Kits (Clontech) nach Angaben des Herstellers von 1 µg aufgereinigter mRNA hergestellt.

2.4.3 SMART-cDNA-Synthese

Aus 0.5 µg mRNA wurde mit Hilfe des SMARTTM cDNA Library Construction Kit's (engl.: Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript, Clontech) nach Angaben des Herstellers eine SMART-cDNA durch LD PCR (engl.: Long Distance PCR zur Amplifikation langer DNA-Fragmente) synthetisiert.

2.4.4 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR können cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Sie beginnt mit der Reversen Transkription (RT) einer mRNA in Erststrang-cDNA (s. 2.4.1.), welche in einer sich anschließenden PCR als Matrize dient.

In einem Standard-Ansatz wurden 0.1 - 1 µg DNA-freie Gesamt-RNA mittels Reverser Transkriptase (M-MLV RT für engl.: Moloney Murine Leukemia Virus RT, Promega) für die RT-PCR eingesetzt.

<u>RT-Ansatz:</u>	RNA (0.1 - 1 µg)
	0.4 µl Smart-5'RACE Primer (100 µM)
	5'-(T) ₂₅ N ₁ N-3' (N = A, C, G, or T; N ₁ = A, G, or C)
	0.5 µl 10mM dNTP
	2.0 µl 5x RT-buffer (Promega)
add	9.6 µl H ₂ O

Zur Denaturierung sekundärer RNA-Strukturen wurde der Ansatz für 2 min bei 70 °C inkubiert, dann auf Eis gekühlt und anschließend 0.4 µl M-MLV RT (100 U/µl) zugegeben.

Nach einer Stunde bei 42 °C war die cDNA-Amplifikation abgeschlossen. Die cDNA wurde dann entweder in einer 1 : 20 Verdünnung für die LightCycler Analyse (s. 2.4.8) eingesetzt oder bei - 85 °C unverdünnt eingefroren.

2.4.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Mit dem „Ready To Go DNA Labelling“-(-dCTP) System von Amersham wurde im „Random Priming“-Verfahren doppelsträngige DNA radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit 200 ng hitzedenaturierter DNA und 5 µl [α -³²P] dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mol (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) durchgeführt.

2.4.6 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus der Wurzel von *P. tremula* x *P. tremuloides* wurde mit dem peqGOLD DNAPureTMPT System (peqLab) durchgeführt. Das Verfahren beruhte auf den Eigenschaften von Guanidinisothiocyanat und speziellen Detergenzien, die Zellen lysieren, RNasen inhibieren und so die selektive Präzipitation der DNA ermöglichen. Die Isolierung von DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Qualität der isolierten genomischen DNA wurde in einem 0.5 %igen TBE-Agarosegel (s. 2.4.9) auf Reinheit und Größe hin überprüft.

2.4.7 Isolierung von Promotorsequenzen (GenomeWalker)

Mit Hilfe der Methode des GenomeWalkerTM Kits (Clontech) lassen sich unbekannte, genomische DNA-Sequenzen isolieren, die an bereits identifizierte DNA-Regionen grenzen (Siebert *et al.*, 1995). Nach quantitativer Restriktion (2.4.14) von jeweils 4.5 µg einer hochmolekularen und aufgereinigten genomischen Wurzel-DNA (2.4.5) mit vier verschiedenen Enzymen, wurde an beide glatten Enden der genomischen DNA ein GenomeWalker Adaptor ligiert. Der nur in einem bestimmten Bereich doppelsträngige Adaptor war so konzipiert, dass eine Aminogruppe am 3'-Ende des unteren Strangs eine weitere Extension der genomischen Fragmente verhinderte und somit nur durch genspezifische Primerextension ein zum Adaptor vollständiger, komplementärer Strang synthetisiert wurde. In einer ersten Polymerase-Kettenreaktion (PCR, 2.4.8) bzw. der sich anschließenden Nested-PCR (2.4.8.4) wurde ein Produkt amplifiziert, das in der bekannten Sequenz am 5'-Ende des genspezifischen Primers begann und in den benachbarten, unbekanntem, genomischen

DNA-Bereich hineinreichte. Die Adaptorligation und die sich anschließenden Polymerase-Kettenreaktionen wurden exakt nach den Angaben von Clontech und Eppendorf (s. 2.4.8.3.3) durchgeführt. Im Anschluss wurden die in Frage kommenden PCR-Produkte kloniert (2.4.12) und sequenziert (2.5).

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurden definierte DNA-Fragmente durch den Einsatz genspezifischer *sense*- und *antisense*-Primer unter Standardbedingungen exponentiell amplifiziert (zur Übersicht siehe Stürzl and Roth, 1990 und Linz and Degenhardt, 1990).

2.4.8.1 DNA-Polymerasen

Jeweils nach Herstellerangaben wurden hitzestabile *Taq*-DNA-PolymeraseTM aus *Thermus aquaticus* (Biotherm), *Klen Taq-1* DNA-PolymeraseTM (Clontech) und das TripleMaster PCR SystemTM (Eppendorf) eingesetzt. Die *Klen Taq-1* DNA-Polymerase setzt sich aus einem Klenow-Fragment der *Taq*-DNA-Polymerase, das keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität besitzt, und einer geringen Menge VentTM-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, die über eine 15fach niedrigere Fehlerquote als *Taq*-DNA-Polymerase verfügt (Mattila, 1991), zusammen. Die Blockierung der Polymerase durch Bindung an den *Taq* StartTM-Antikörper garantierte den Start der PCR erst ab einer bestimmten Temperatur nach Denaturierung des Antikörperproteins. Das TripleMaster PCR SystemTM arbeitet mit einer Mischung aus drei verschiedenen Enzymen, der *Taq* DNA-Polymerase, dem Polymerase-Enhancing-Factor und einem Proof-Reading-Enzym und erzielt in Kombination mit dem Tuning BufferTM hohe Produktausbeuten sehr langer DNA-Fragmente.

2.4.8.2 Primer und Primerdesign

Genspezifische Primersequenzen wurden mit dem Programm OligoTM5.0 für Macintosh (National Biosciences) ermittelt und überprüft. Die T_m-Berechnungen erfolgten dabei nach verschiedenen Methoden, wie z. B. der GC %-Methode nach Baldino *et al.*, 1989.

Alle benutzten Primer wurden von TIB Molbiol (Berlin) oder Sigma-ARK GmbH (Darmstadt) bezogen.

2.4.8.3 PCR- Standardexperiment

Polymerase-Kettenreaktionen wurden in Thermocyclern (Modell Varius V45, Landgraf; Modell Primus 96plus, MWG-Biotech; RoboCycler, Gradient 40, Stratagene) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne DNA-Matrize.

2.4.8.3.1 *Standardexperiment mit Taq-Polymerase*

<u>PCR-Ansatz:</u>	10 µl	10 x Puffer
	10 µl	25 mM MgCl ₂
	2 µl	10 mM dNTP
	2 µl	<i>sense</i> -Primer (10 pmol/µl)
	2 µl	<i>antisense</i> -Primer (10 pmol/µl)
		DNA (5-15 ng)
	1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
	add100 µl	H ₂ O

Standardprogramm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	94 °C für 60 sec		
30-40	94 °C für 30 sec	optimierte Primerannealingtemperatur für 30 sec	72 °C für 30 sec bis 800 bp, darüber für 1min je 1000 bp Extension

Tab. 2.3 Standard-PCR.

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.4.9) und dokumentiert (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech).

2.4.8.3.2 *Standardexperiment mit Klen Taq-1 Polymerase*

Zur Sequenzermittlung des 5'-Endes der gesuchten cDNA in einer RACE-PCR und zur Amplifikation der vollständigen cDNA-Sequenz eines Kanalgens wurde *Klen Taq-1* Polymerase eingesetzt.

<u>PCR-Ansatz 1:</u>	1 µl	Marathon-cDNA/Smart-cDNA
	1 µl	<i>sense</i> -Primer (10 pmol/µl)
	1 µl	<i>antisense</i> -Primer (10 pmol/µl)

<u>PCR-Ansatz 2:</u>	40 µl	H ₂ O
	5 µl	10x <i>Klen Taq-1</i> PCR Reaktionspuffer
	1 µl	10 mM dNTP
	1 µl	50x <i>Klen Taq-1</i> Polymerase

Die PCR-Bedingungen wurden mit Ausnahme der Elongationstemperatur und Zyklenzahl analog zur *Taq* DNA-Polymerase durchgeführt (s. Tab. 2.3). Die optimale Synthesetemperatur lag hier bei 68 °C und die Zyklenzahl verringerte sich auf 25 bzw. 30.

Lag die Primerannealingtemperatur im Bereich von 65 - 70 °C, wurde eine „Zwei-Schritt-PCR“ (engl.: two-step PCR) durchgeführt, bei der Annealing- und Extensions-temperaturen (jeweils 68 °C) übereinstimmten.

2.4.8.3.3 Standardexperiment mit dem TripleMaster PCR System

Die Promotorsequenzen der klonierten Transportergene wurden mit dem TripleMaster PCR SystemTM (Eppendorf) amplifiziert.

<u>Reaktionsansatz 1:</u>		genomische DNA (50 – 100 ng)
	1 µl	<i>sense</i> -Primer (400 nM)
	1 µl	<i>antisense</i> -Primer (400 nM)
	add 10 µl	H ₂ O

<u>Reaktionsansatz 2:</u>	5 µl	10 x HighFidelity Puffer mit Mg ²⁺
	1 µl	10 mM dNTP
	0.5 µl	TripleMaster Enzym Mix (5 U/µl)
	add 40 µl	H ₂ O

Standardprogramm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing/Elongation
1	94 °C für 5 min	
30	94 °C für 0.5 min	68 °C für 5.5 min

Tab 2.4 TripleMaster-PCR.

2.4.8.4 PCR mit verschachtelten Primern (Nested PCR)

Zur Vermeidung erheblicher Mengen an Nebenprodukten und zur deutlichen Steigerung der Produktspezifität wurde in der 5'-RACE-PCR und zur Isolation der Promotorsequenzen im Anschluss an die erste PCR eine zweite PCR durchgeführt. Die Produkte der ersten PCR dienen dabei als Matrizen-DNA. Die in der zweiten PCR benutzten Primer hybridisierten jeweils innerhalb der aus der ersten PCR resultierenden Sequenz.

Der PCR-Ansatz war mit dem Standardexperiment der *Klen Taq-1* Polymerase bzw. dem TripleMaster PCR SystemTM identisch.

2.4.8.5 PCR mit degenerierten Primern

Zur Amplifikation von Kaliumkanal-Fragmenten, ortholog zu bekannten *Shaker*-Kanälen aus *A. thaliana*, wurden bereits etablierte degenerierte Primer eingesetzt. Sie hybridisierten in der zweiten und sechsten transmembranen Domäne und in der Porenregion. Die PCR wurde dazu im Vergleich mit dem Standardexperiment (s. 2.4.8.3) wie folgt abgewandelt:

Die Menge der eingesetzten Primer erhöhte sich auf 150 pmol im 50 µl-Ansatz.

Programm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	94 °C für 1 min		
5	94 °C für 1 min	37 °C für 1 min, dann innerhalb von 2 min Temperaturerhöhung auf 72 °C	72 °C für 0.5 min
30-40	94 °C für 1 min	48 °C für 1 min	72 °C für 1.5 min

Tab. 2.5 PCR mit degenerierten Primern.

2.4.9 Realtime Quantitative PCR

Die LightCycler Technologie ist eine Methode, mit der äußerst schnell PCR-Produkte amplifiziert und in „Echt-Zeit“ sowohl die Reaktionskinetiken, als auch die Reaktionsergebnisse detektiert und quantitativ dargestellt werden (Rasmussen *et al.*, 1998). Zusätzlich konnten die PCR-Produkte durch eine Schmelzpunkt-Analyse von Primer-Dimeren und kleinen, unspezifischen Amplifikaten unterschieden werden. Die Fluoreszenz-Detektion der Amplifikate beruhte auf der selektiven Interkalierung von SYBR Green I in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz erheblich gesteigert wurde. Die Fluoreszenz nahm während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA Konzentration zu.

2.4.9.1 Primerdesign

Beim Primerdesign für die LightCycler-Analyse mussten mehrere Parameter beachtet werden. Die Länge der Primer betrug maximal 15 - 17 bp. Die Basenabfolge durfte weder Dimere noch Sekundärstrukturen innerhalb des Primers als auch zwischen den Primern zulassen. Die Annealingtemperatur von jedem Primerpaar sollte zwischen 55 °C und 60 °C liegen und das zu amplifizierende, spezifische Fragment sollte maximal 450 – 500 bp lang sein. Von jedem Primerpaar wurde die optimale Annealingtemperatur bestimmt. Anschließend wurden die Primerpaare mit dem entsprechenden, eluierten Fragment als Matrize im LightCycler getestet. Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurden die Produkte der PCR jeweils in einem 3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Alle für den LightCycler benutzten Primer wurden von TIBMolbiol (Berlin) bezogen.

2.4.9.2 Herstellung der Standards

Als Standard dienten die mit den entsprechenden Primerpaaren amplifizierten Fragmente. Sie wurden nach elektrophoretischer Überprüfung aus dem Agarosegel eluiert (2.4.11). Die Konzentration wurde mit dem GeneQuantII (Pharmacia Biotech) photometrisch bestimmt und für die Herstellung der Verdünnungsreihen von 20 fg/µl bis 20 atg/µl eingesetzt. Um den Einsatz definierter cDNA-Mengen zu gewährleisten, wurde Aktin als interner Standard verwendet. Die Expressionsmuster wurden über Eichgeraden von *PTORK*, *PTK2*, *KPTI* und *PtKUPI* ermittelt und auf 10 000 Moleküle Aktin 2 normiert.

2.4.9.3 LightCycler PCR

Falls die Amplifikation von Aktin 2-Molekülen im LightCycler ausreichende cDNA-Mengen ergaben, wurde die zu untersuchende cDNA 1:20 verdünnt, da die Puffer der RT-Reaktion nicht kompatibel mit denen der PCR-Reaktion waren. Der Grenzwert lag bei 2.7 fg Aktin 2-Molekülen, da bei niedrigeren Werten die erwarteten Mengen für die untersuchten Transkripte unterhalb der Nachweisgrenze gelegen hätten. Für die Reaktion wurden 2 µl der Verdünnung als Matrize eingesetzt. Die PCR wurde mit dem LightCycler™-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche in LightCycler™ Glaskapillaren als Reaktionsgefäß im LightCycler™ (Roche) durchgeführt.

<u>Standardexperiment:</u>	1 µl	<i>sense</i> -Primer (10 mM)
	1 µl	<i>antisense</i> -Primer (10 mM)
	2.4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	11.6 µl	H ₂ O
	2 µl	LightCycler™-FastStart Enzyme
	2 µl	1 : 20 Verdünnung der cDNA

Programm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation	Detektion
1	95 °C für 10 min			
45	95 °C für 1 sec	50 -54 °C (primerspezifisch) für 7 sec	72 °C für 19 sec	79 °C für 5 sec

Tab. 2.6 LightCycler-PCR.

Um die PCR-Produkte zu überprüfen, wurde nach der PCR eine Schmelzkurve aufgenommen (0.2 °C/sec von 79 °C bis 95 °C). Hierbei wurde festgestellt, ob es sich um ein PCR-Produkt mit dem gleichen Schmelzpunkt wie des benutzten Standards handelte.

2.4.9.4 Auswertung der LightCycler PCR

Die Quantifizierung der Daten wurde mit der LightCycler™ Software durchgeführt. Die Software berechnete die Kopienzahl der Ausgangsmoleküle durch Auftragung des Loga-

rithmus der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl unter ausschließlicher Berücksichtigung des logarithmisch-linearen Bereichs der PCR. Aus den Daten der Standard-Verdünnungsreihen wurde eine Standardkurve berechnet. Sämtliche Quantifizierungen wurden dann auf 10 000 Aktin 2-cDNA-Fragmente normiert, analog zu Szyroki *et al.* (2001).

2.4.10 DNA-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen. Durch Zugabe von 0.1 µg/ml EtBr (Roth) und Fluoreszenzanregung bei 312 nm wurden die Bandenmuster sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden am Image-Master VDS (Pharmacia) dokumentiert.

Fragmente über 600 bp wurden in 1 %igen TBE-Agarosegelen (Biozym), kleinere Moleküle in 3 %igen NuSieve-TBE-Agarosegelen (Biozym) aufgetrennt. Der Vernetzungsgrad der NuSieve-Agarose ermöglicht eine bessere Auftrennung kleinerer Basenpaarfragmente. Als Größenstandards diente λ-DNA (Pharmacia), die vollständig mit PstI verdaut worden war oder ein 100 bp DNA-Standard (MBI). Die Elektrophorese wurde bei konstant 80 - 100 V in 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer durchgeführt.

10 x TBE: 1.0 M Tris-HCl (pH = 8.0)
 0.9 M Borsäure
 0.01M EDTA

2.4.11 Aufreinigung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente gewünschter Größe wurden nach Elektrophorese und Identifikation anhand der Größenstandards aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Jetsorb-System (Genomed) nach Angaben des Herstellers eluiert.

Die Konzentrationen der Nukleinsäuren wurden absorptions-spektrophotometrisch am Genquant II (Pharmacia) bei 260 nm bestimmt.

2.4.12 Klonierung von DNA-Fragmenten

Bei der Klonierung wurden spezifische DNA-Fragmente in einen Plasmidvektor eingefügt, um für nachfolgende Anwendungen eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA isolieren zu können.

2.4.12.1 Plasmide

Folgende Plasmid-Vektoren wurden verwendet (Vektorkarten siehe Anhang 8.5):

pGEM HE (Liman *et al.*, 1992)

pCRII TOPO (Invitrogen)

pSPT 18 (Boehringer Mannheim)

pVKH-35S-pA1 (Baumann *et al.*, 1998)

pVKH-35S-GUS-pA

2.4.12.2 Plasmid-Minipräparation *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) im Standardverfahren isoliert. Für die Plasmid-Minipräparation wurden 1.5 ml Bakterienkultur eingesetzt.

2.4.12.3 Plasmid-Minipräparation *Agrobacterium tumefaciens*

Einzelkolonien wurden in je 10 ml LB-Medium mit den zugehörigen Antibiotika bei 28 °C unter Schütteln 2 Tage lang vermehrt. 1.5 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl eiskaltem Lysispuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 5.8; 10 mM EDTA und 4 g/ml Lysozym) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte während einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl 0.2 M NaOH, 1.0 % SDS und Mischen fand erneut eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz mit 150 µl einer kalten 3 M Natriumacetatlösung, pH 4.8 neutralisiert, 5 min auf Eis inkubiert und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol gemischt und zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 50 µl TE aufgenommen.

2.4.12.4 Aufreinigungssysteme

Waren hohe Reinheitsgrade erforderlich, wurden für die Aufreinigung der Plasmid-DNA das WizardPlus Mini- und Midiprep-System (Promega) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.4.12.5 TA-Klonierung der isolierten PCR-Produkte

Durch die matrizenunabhängige, terminale Transferase-Aktivität der nativen *Taq*-DNA-Polymerase (Clark, 1988) wird an den 3'-Enden eines DNA-Doppelstranges je ein Nukleotid, vorzugsweise Adenin, angefügt. Bei der Ligation wurde das derartig adenylierte PCR-Produkt mit einem Vektor verknüpft, der jeweils an den 5'-Enden ein überhängendes Thymin besitzt. Es wurden käufliche Systeme oder selbst hergestellte Vektoren verwendet. Die Synthese solcher TA-Vektoren erfolgte nach Marchuk *et al.* (1990).

2.4.13 Ligation

T4 DNA-Ligase katalysiert durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten (Vektor und Insert) miteinander. Bei der Ligation wird unter Verbrauch von ATP eine kovalente Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe der einen Kette und der 3'-Hydroxylgruppe der zweiten DNA gebildet.

Ligationsansatz:	1 µl	10 x	Ligasepuffer (MBI)
	1 µl		T4-DNA-Ligase (1U, MBI)
	1 µl		Vektor DNA (5 - 15 ng)
	4-7 µl		Insert DNA (10 - 800 ng)
add	10 µl		H ₂ O

Die Kondensation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

Die Ligation mit dem pCRII TOPO Vektor erfolgte nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning KitsTM (Invitrogen).

Die Ligationen der cDNA-Moleküle *PTK2* und *PtKUP1* in pVKH-35S-pA1 wurden in den Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:10, 1:16, 1:21 (Vektor zu Insert) angesetzt.

2.4.14 Restriktionsanalyse

Rekombinierte Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse auf erfolgreiche Insertion untersucht. Falls nötig, wurde so auch die Orientierung des Inserts ermittelt. Des Weiteren wurden Restriktionsenzyme benutzt, um Vektoren und Inserts für Ligationen vorzubereiten.

Die Restriktionsendonukleasen wurden unter Verwendung der mitgelieferten Puffersysteme nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Für die quantitative Spaltung wurden je μg DNA fünf Enzymeinheiten eingesetzt.

2.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Sämtliche Sequenzierungsreaktionen beruhten auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger, 1977) und wurden mit dem LiCOR 4200 (LiCOR) von Frau S. Michel (Chemielaborantin, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg) durchgeführt.

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm MacDNAsis Pro V3.6 (Hitachi Software Engineering) analysiert. Homologien von DNA- und abgeleiteten Peptidsequenzen zu bekannten DNA- und Peptidmolekülen wurden über den Blast-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) am NCBI-Server (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) ermittelt. Aminosäurenvergleiche wurden mit dem Programm ClustalW (Stoesser *et al.*, 2002 und 2001) am EBI-Server (European Bioinformatics Institute, Cambridge, England; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt und mit dem Programm Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) graphisch dargestellt. Phylogenetische Bäume wurden mit dem Programm TreeView (Win32) 1.6.6 (Page, 2001) erstellt. Die Bestimmung der Ähnlichkeit von Proteinsequenzen erfolgte mit Clustal X und GeneDOC 2.6.

2.6 Bakterien

2.6.1 Verwendete Stämme und Vermehrung

Die benutzten Bakterienstämme stellten Abkömmlinge des *Escherichia coli* Stammes K12, der *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV3101 bzw. LBA4404 und des K^+ -Aufnahmefizienten *Escherichia coli* Stammes LB2003 dar.

Benutzte Stämme:

- XL1-Blue MRF'
- Top10F' (Invitrogen)
- JM 110
- Agro GV3101
- Agro LBA4404

LB2003 (-TrkG und -TrkH, -Kup (-TrkD), -Kdp, freundlicherweise von Prof. K. Altendorf, Osnabrück, zur Verfügung gestellt)

Mit Ausnahme des *E.coli* Stammes LB2003 wurden sämtliche Bakterien in LB-Medium angezogen. Das LB2003-Nährmedium zeichnet sich durch eine hohe Kaliumkonzentration aus. Dabei wurden nach Komplementation des Stammes durch Transformation mit Kaliumtransportern und für den Wildtyp (WT)-Stamm unterschiedliche Medien benutzt:

WT-Medium:

10 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	KCl

Komplementationsmedium:

10 g	Trypton
2 g	Hefe-Extrakt
100 mM	Mannitol

Für die Kultivation auf Platte wurde den Medien 1.5 % Agarose hinzugefügt.

Sämtliche Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden für den Selektionsdruck die Antibiotika steril zugegeben. Die Bakterien wurden in Flüssigmedien unter Schütteln oder auf Agarplatten bei 37 °C (*E.coli*) bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) vermehrt.

2.6.2 Halo-Essay

Mit dem Halo-Essay wurde der Effekt mono- und divalenter Kationen auf das Bakterienwachstum transformierter LB2003 ermittelt. Dazu wurden ca. 10^5 Zellen in 0.7 % Komplementationssagar resuspendiert und auf Platten des selben Mediums (s. 2.5.1) gleichmäßig verteilt. Kleine, sterile Filter-Plättchen wurden mit 1 M Testlösung (CaCl_2 , TEACl, CsCl, BaCl_2 , ZnCl_2 , GdCl_2 und Al_2Cl_3) getränkt und auf den Agarplatten verteilt. Die Bakterien wurden für 1 - 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Erschien um die Filter-Plättchen ein klarer Hof, waren die transformierten Bakterien durch die entsprechenden Substanzen in ihrem Wachstum beeinträchtigt.

2.6.3 Chemischkompetente Zellen und Transformation von *E. coli*

Die Aufnahmefähigkeit von Bakterienzellen für Fremd-DNA erhöht sich durch chemische Behandlung der Zellwand mit divalenten Rb-Kationen (Hanahan, 1983). Die hier verwendeten, kompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF' bzw. LB2003 Zellen wurden selbst hergestellt oder im Fall der TOP10F'-Zellen (Invitrogen) käuflich erworben. Die Transformation wurde nach Inoue *et al.* (1990) durchgeführt.

2.6.4 Elektrokompente Zellen und Transformation von *A. tumefaciens*

Agrobakterien des Stammes GV3101 bzw. LBA4404 wurden nach ca. 20 h Anzucht bei 28 °C in 400 ml LB-Medium auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min lang bei 3840 x g (GS-15R, Beckman) sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal in 1 mM HEPES, pH 7.5 resuspendiert, zentrifugiert und anschließend in einer 1 mM HEPES-Glycerinlösung (10 %) pH 7.5 aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 3840 x g wurden die Agrobakterien in 800 µl derselben Lösung resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 85 °C gelagert.

Die elektrokompenten Agrobakterien wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Dazu wurden 40 µl aliquotierte Agrobakterien auf Eis aufgetaut und 1 µl des zu transformierenden, salzfreien Plasmids zu den Agrobakterien gegeben. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette (Eppendorf) wurde mittels Elektroporator (Eppendorf 2510) ein Spannungspuls von 2.5 kV mit einer Länge von maximal 5.4 ms erzeugt. Die Küvette wurde anschließend sofort auf Eis gekühlt und die Bakterien mit 2 ml LB-Medium versetzt. Die transformierten Agrobakterien wurden vor dem Ausplattieren auf LB-Agar für zwei Stunden bei 28 °C geschüttelt.

2.7 Transformation von Pflanzen durch *A. tumefaciens*

2.7.1 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach Clough and Bent (1998). Unter Langtagbedingungen, im Gewächshaus angezogene, 8 - 10 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen mit Schoten und Blüten wurden am Tag vor der Transformation in eine Feuchtekammer überführt. 10 ml einer Übernachtskultur des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101, transformiert mit Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten, wurden eingesetzt, um am Transformationstag 400 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika anzuimpfen. Nach

Erreichen einer OD_{600} von 0.8 - 0.9 wurden die Agrobakterien durch Zentrifugation sedimentiert und in ca. 500 ml einer frisch angesetzten 5 %igen Saccharose- und 0.05 %igen Silwet L-77-Lösung (LEHLE SEEDS) resuspendiert. Nach Abschneiden sämtlicher Schoten wurde der gesamte oberirdische Teil der Pflanzen in die Agrobakterien-Lösung getaucht und vorsichtig 3 - 5 sec. geschwenkt. Die nun mit einem Agrobakterien-Film überzogenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für 20 h abgedunkelt. Nach einer Woche wurde der Transformationsvorgang wiederholt, jedoch ohne Abschneiden der Schoten von den Pflanzen. Die Pflanzen verblieben solange unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus, bis die neugebildeten Schoten gereift waren und die Samen abgeerntet werden konnten.

2.7.2 Transformation von *P. tremula x P. tremuloides*

Zur Herstellung transgener Pflanzen dieses Pappel-Hybrids wurden nach Transformation von Agrobakterien mit den geeigneten *sense*- und *antisense*-Konstrukten der verschiedenen Transporter zwei verschiedene Transformationsmethoden ausgewählt.

2.7.2.1 Transformation nach Leplé *et al.*, 1992

Blattstiele bewurzelter, 8 - 10 Wochen alter Agarkulturen (2.1.1), wurden nach Abtrennung von den Pflanzen und Spalten mit dem Skalpell zwei bis drei Tage auf MS-Agar-Medium mit 10 μ M NAA und 5 μ M 2-iPA gebracht und bei 26 °C im Dunkeln gehalten. Einzelkolonien plasmidtragender Agrobakterien wurden in LB-Medium mit geeigneten Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28 °C vermehrt. Am folgenden Tag wurden die Agrobakterien abzentrifugiert, in MS-Medium resuspendiert und auf eine OD_{600} von 0.3 eingestellt. In diese MS-Agro-Lösung wurden die vorbehandelten Blattstiele überführt und abgedunkelt 16 h (100 rpm) bei 26 °C geschüttelt. Danach wurden die Blattstiele auf die Original-MS-Platten der Vorinkubation zurück gebracht, wo sie zwei Tage bei 26 °C im Dunkeln inkubiert wurden. 7 Tage nach Transformationsbeginn erfolgte die Dekontamination durch mehrfaches Spülen in reinem, sterilem Wasser, sowie sterilem Wasser, das mit Tetracyclin (25 mg/l) versetzt war. Nach Abtrocknen wurden die infizierten Blattstiele auf MS-NAA-2iPA-Platten überführt, die zusätzlich Antibiotika (250 mg/l Carbenicillin, 150 mg/l Timentin, Gemisch aus Ticarcillin Disodium und Kalium Clavulanat, Nauerby *et al.*, 1997, Duchefa) zum Abtöten der Agrobakterien enthielten. Die Platten wurden weiter im Dunkeln bei 26 °C inkubiert. Nach 10 Tagen wurden die nun angeschwollenen Petiolen auf das gleiche Medium frisch umgesetzt. Nach 30 Tagen wurde den Medien zur Selektion

transformierter Zellen 0.1 μ M Thidiazuron (Duchefa) und 50 mg/l Kanamycin zugegeben. Die Blattstiele wurden ab diesem Zeitpunkt bis zur Sprossinduktion unter regelmäßigem Wechsel des Mediums nach 28 - 30 Tagen im Langtag (2.1.1) weiter kultiviert.

Nach Sprossinduktion und Blattbildung sollten die Sprosse vom Kallus abgetrennt und in hormonfreies Bewurzelungs-Medium (0.5 x MS-Medium, 250 mg/l Carbenicillin, 50 mg/l Kanamycin) überführt werden.

Parallel zu Transformationsversuchen während dieser Dissertation, wurden mit der gleichen Methode von der Arbeitsgruppe U. Nehls (Uni Tübingen) ebenfalls Pappeln des Hybrid-Klons T89 mit einem aus dieser Dissertation hervorgegangenen Konstrukt transformiert.

2.7.2.2 Transformation nach Tzfira *et al.*, 1997

Sterile Sprosstücke mit einer Länge von ca. 1 cm wurden dem Transformationsprotokoll entsprechend bis zur Sprossbildung behandelt, mit Agrobakterien infiziert, kokultiviert und weiter auf Regenerationsmedium inkubiert. Nach der Sprossbildung wurden die Sprosse vom Kallus abgetrennt und sollten anschließend zu einer vollständigen Pflanze regeneriert werden.

2.8 *In situ*-PCR

Für die zellspezifische Lokalisation von zwei Kaliumtransportern (*PTK2* und *PtKUP1*) wurden *in situ*-Polymerase-Kettenreaktionen (modifiziert nach Johansen, 1997) auf Dünnschnitten von Stämmchen und Knospen ca. drei Monate alter *P. x tremula x P. tremuloides* Hydrokultur-Pflanzen durchgeführt.

2.8.1 Dünnschnitte

Ca. 1.5 - 2.5 mm lange Stämmchen sowie ganze Knospen wurden in Fixierlösung überführt, Vakuum-infiltriert und bei Raumtemperatur (RT) für mindestens 20 h inkubiert.

<u>Fixierlösung:</u>	31.5 ml 100 % EtOH
	2.5 ml konz. Essigsäure
	2.7 ml Formalin
	13.3 ml H ₂ O

Nach zweimaliger 30 min Inkubation in absolut. Ethanol bei RT wurde der Alkohol für jeweils 40 min gegen 3:1-, 1:1- und 1:3-Gemische aus Ethanol und Roticlear (Roth) gegen Roticlear ausgetauscht. In einem weiteren Schritt wurde das Gemisch durch reines Roticlear ersetzt (30 min bei 30 °C in 100 % Roticlear). Die endgültige Fixierung erfolgte in Paraplast (Sigma). Dazu wurde das Pflanzenmaterial zunächst bei 42 °C über Nacht in, mit Paraplast gesättigtem, Roticlear inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation in reinem Paraplast bei 62 °C.

Mit einem Mikrotom (Leica, RM 2165) wurden 8, 10 und 15 µM Schnitte angefertigt. Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger nacheinander in folgende Lösungen bei RT überführt: zweimal für jeweils 5 min in 100 % Roticlear; für jeweils 2.5 min in 100 %, 80 %, 60 %, 30 % Ethanol und abschließend für 10 min in PBS-Puffer (Phosphate buffered saline, pH 7.4 nach Sambrook *et al.*, 1989).

2.8.2 Protease-Verdau, Acetylierung und DNase-Behandlung

Die Reaktionszeit der Protease wurde in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebetyp optimiert. Die Objektträger wurden dazu für 15, 30 und 60 min bei 37 °C mit 50 µl Pepsin (2 mg/ml) in 0.01 N HCl pro Gewebeschnitt bedeckt. Die Reaktion wurde in DEPC-H₂O gestoppt.

Restliche Proteasen und RNasen wurden durch Acetylierung inaktiviert. Dazu inkubierten die Objektträger unter starkem Rühren in 1.5 mM Triethanolamin pH 8.0 in einer Färbeschale, wobei tropfenweise 1 ml Acetanhydrid zugegeben wurde. Nach weiterem 10 min Rühren wurde die Lösung durch PBS ausgetauscht. Nach 5 min Inkubation wurden die Objektträger mit DEPC-H₂O gespült, anschließend in reinem Ethanol inkubiert und dann bei RT getrocknet.

Um ausschließlich die vorhandenen Transkripte der Transporter in den jeweiligen Schnitten zu amplifizieren, erfolgte vor der *in situ*-RT-PCR ein DNase-Verdau. Auf jeden Schnitt wurden dazu 40 µl DNase I Lösung (Amersham, 160 U/Schnitt) pipettiert. Die Objektträger lagen für zwei Stunden in einer Feuchteammer bzw. für 16 h bei 37 °C mit amplicover-disks und -clips bedeckt im Thermocycler (Perkin Elmer, Gene Amp, *In situ* PCR system 1000). Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal mit DEPC-behandeltem Wasser gewaschen und im Anschluss für die RT-PCR bei RT getrocknet.

2.8.3 RT-PCR *in situ*

Die Reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C in einer Feuchtekammer. Dabei wurde pro Objektträger je ein Gewebeschnitt als positive Probe bzw. als Negativkontrolle behandelt.

<u>RT-positiv-Ansatz:</u>	13.5 µl	H ₂ O (DEPC)
	5 µl	5 x RT-buffer (Promega)
	2.5 µl	10 mM dNTP's
	3 µl	Hexanukleotide (150 ng)
	1 µl	M-MLV RT (100 U/µl)

<u>RT-negativ-Ansatz:</u>	14.5 µl	H ₂ O (DEPC)
	5 µl	5 x RT-buffer (Promega)
	2.5 µl	10 mM dNTP's
	3 µl	Hexanukleotide (150 ng)
	0 µl	M-MLV RT (100 U/µl)

2.8.4 PCR *in situ*

Nach *in situ*-RT-PCR (2.4.4.2) und zweimaligem Waschen in Wasser (DEPC) wurden die Schnitte mit dem PCR-Ansatz überschichtet und mit amplicover-disks (Perkin Elmer) bzw. amplicover-clips (Perkin Elmer) bei 70 °C verschlossen. Im Thermocycler wurde die PCR nach Tab. 2.7 durchgeführt.

<u>PCR-Ansatz:</u>	5 µl	10 x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)
	10 µl	25 mM MgCl ₂
	5 µl	10 mM dNTP
	0.3 µl	Dig-11-UTP 1 nmol/µl, Roche (10 µM final)
	1 µl	<i>sense</i> -Primer (100 pmol/µl)
	1 µl	<i>antisense</i> -Primer (100 pmol/µl)
	2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl, Biotherm)
	add 50 µl	H ₂ O

Programm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	94 °C für 2 min		
35	94 °C für 30 sec	52 °C für 1.5 min	72 °C für 1 min

Tab. 2.7 PCR *in situ*.

Nach der PCR wurden die Objektträger zweimal für je 10 min in H₂O bidest. und absolut. EtOH gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

2.8.5 Detektion

Die Schnitte wurden für 30 min bei RT mit je 100 µl Blocking Puffer (Dig High Prime DNA Labeling and Detektion Starter Kit II, Boehringer) in Maleinsäure Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5) bedeckt. Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit je 50 µl Anti-Dig-Lösung (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, 150 U/200 µl, Boehringer Mannheim) überschichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach zwei Waschschritten (15 min) in AP-Puffer (100 mM Tris pH 9.5, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) wurden die Schnitte mit je 100 µl NBT/BCIP-Lösung (Nitro Blue Tetrazolium/ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat, Promega) bedeckt und lichtgeschützt für 7 - 30 min bei RT inkubiert.

Amplifikationsprodukte wurden mit einem Axiovert 135 Lichtmikroskop (Zeiss) als violettes Präzipitat identifiziert und lokalisiert. Nach Neutralrot-Anfärbung, Überschichten mit Kaisers Glyceringelatine (MERCK) und Aushärten wurden die Ergebnisse mit einer Digitalkamera (PDMC-2, Polaroid) dokumentiert.

2.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für den Protein-Nachweis der Kaliumkanäle PTORK und PTK2 wurden Stämmchen ein- bis zweijähriger Pappeln eingesetzt. Im C-Terminus der Proteine wurden nach Sequenzanalyse genspezifische Bereiche ermittelt, die für die Antikörper-Synthese geeignet waren. Affinitätsgereinigte Peptidantikörper (Kaninchen) für die Aminosäuren 1 - 20 (PTORK) und 6 - 24 (PTK2) wurden von der Firma Biogenes (Berlin) käuflich erworben.

Sämtliche immunologische Nachweise der beiden Kaliumkanäle wurden von C. Wind, Institut für Holzforschung, Technische Universität München, durchgeführt (Wind C., Dissertation 2003 in Arbeit).

2.10 Elektrophysiologische Messungen

2.10.1 Heterologe Expression in *Xenopus laevis*

Die vollständig prozessierten Transkripte aller klonierten Kaliumtransportergene wurden über *in vitro* Transkription in cRNA überführt. Diese wurde in Oocyten von *Xenopus laevis* injiziert und sollte dort transient translatiert werden. Die Kanalproteine sollten nach Integration in die Zellmembran mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik (engl.: Double-Electrode-Voltage-Clamp, DEVC) funktionell charakterisiert werden.

2.10.1.1 In vitro Transkription

Für die Expression in *Xenopus laevis* Oocyten wurden die cDNA-Volllängen in den eigens dafür hergestellten pGEM HE TA-Vektor kloniert. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem MEGAscript T3/T7-System (Ambion) nach Herstellerangaben durchgeführt. Qualität und Größe der synthetisierten RNA wurden elektrophoretisch (2.3.3) kontrolliert.

2.10.1.2 Oocytenpräparation und Injektion der cRNA

Die Operation der *Xenopus laevis* Frösche, sowie die Präparation der *Xenopus laevis* Oocyten wurden von Herrn D. Geiger, Doktorand am Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg, durchgeführt.

Glaskapillaren (3 $\frac{1}{2}$ “ Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Company) wurden mit einem Pipettenziehgerät (Sutter 2000, Sutter) ausgezogen und mit einer Mikroschmiede (Leitz) an der Spitze gebrochen. Der Durchmesser der Austrittsöffnung betrug danach 1 - 2 μ M. Etwa 18 - 24 h nach der Oocytenpräparation wurden ca. 20 - 30 nl der auf 0.75 μ g/l eingestellten cRNA-Lösung mit einem automatischen Mikroinjektor (Picospitzer, General Valve) injiziert. Die Oocyten inkubierten bei 16 °C in ND96-Penicillin/Streptomycin bis die transiente Expression des K⁺-Kanalproteins nach ein bis drei Tagen nachgewiesen werden konnte.

2.10.1.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik

Aufgrund ihrer Größe sind *Xenopus laevis* Oocyten für die elektrophysiologische Charakterisierung mittels DEVC-Technik gut geeignet. Das Membranpotential wird bei dieser

Technik kontrolliert und gleichzeitig der über die Membran fließende Strom gemessen (Finkel and Gage, 1985).

Die Injektionen der cRNA's und elektrophysiologischen Messungen wurden von D. Geiger durchgeführt.

2.10.2 Patch-Clamp Technik an Protoplasten einer *Populus* Suspensionskultur

Die Ionenflüsse von Protoplasten einer *Populus* Suspensionskultur wurden in der „whole-cell“-Konfiguration mit Hilfe der Patch-Clamp Technik analysiert. Der Aufbau des Messplatzes und die Patch-Clamp-Ableitungen folgten den Anleitungen von Hamill *et al.* (1981) und sollen hier nur kurz dargestellt werden. Eine ausgezogene (Narishige, Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan), mit Silikon (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, USA) beschichtete Glasmikropipette (Kimax-51, Kimble products, Vineland, NY, USA), welche die Ag/AgCl-Messelektrode ummantelte, wurde unter optischer Kontrolle (Inverses Mikroskop, Axiovert 35, Zeiss, Jena) auf die Membran aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Pipette wurde der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran bis in den G Ω -Bereich erhöht, so dass nach Erreichen des hohen Abdichtwiderstands und nach Anlegen von Spannungen, Ströme durch Ionenkanäle in der Membran flossen. Die Referenzelektrode wurde in die Badlösung eingetaucht. In der „whole-cell“-Konfiguration war die gesamte Membran einer Zelle der elektrischen Ableitung zugänglich. Nach Durchbrechen der Membran unter der Patch-Pipette infolge eines kurzen Unterdrucks, wurde in wenigen Minuten das Cytoplasma gegen die Pipettenlösung ausgetauscht. Die Ströme wurden an einem EPC-7 Patch-Clamp Verstärker (HEKA, Lambrrecht, Deutschland) aufgenommen.

Die Protoplasten der Zellkultur wurden enzymatisch von jungem und weißem Gewebe an den Rändern der Zellhaufen isoliert, 2 - 5 Tage nach Wechsel des Zellkultur-Mediums. Die Enzym-Lösung setzte sich wie folgt zusammen: 0.8 % (w/v) Cellulase (Onozuka R10), 0.1 % (w/v) Pektolyase (Sigma), 0.5 % (w/v) BSA (Serva), 0.5 % (w/v) PVP (Sigma), 1 mM CaCl₂, 8 mM MES/KOH pH 5.5, π 280 mosmol kg⁻¹ (D-Sorbitol). Am Ende wurden die Protoplasten bei 600 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Die Isolation der Protoplasten und die elektrophysiologischen Messungen wurden von A. Stinzing, Doktorandin am Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg, durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierungen von Kaliumtransportergenen aus *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.

Zu Beginn wurden Kaliumtransporter aus *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx., basierend auf den in der vorangegangenen Diplomarbeit (Langer, 2000) identifizierten EST's (engl.: Expressed Sequences Tags; Sterky *et al.*, 1998), isoliert. Die EST's mit Homologien zu bekannten Vertretern der AKT2/3-Unterfamilie der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle (B007P19u) bzw. der KT/KUP/HAK-Familie (A043P54u) aus dem Xylem-Kambium-Phloem-Bereich des Pappel-Hybrids wurden freundlicherweise von der AG Sundberg (Umeå, Schweden) zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe degenerierter Primer in hochkonservierten Bereichen pflanzlicher *Shaker*-Kanäle (Ache, 1997) wurde zusätzlich aus oberirdischem Sprossgewebe ein Fragment mit hoher Sequenzähnlichkeit zu K⁺-Kanälen der KAT1-Unterfamilie und später die dazugehörige Volllänge isoliert.

3.1.1 Klonierungen von *PTK2* (*Populus tremula* K⁺ channel 2) und *PtKUP1* (*Populus tremula* K⁺ uptake transporter 1)

Ausgehend von den EST's konnten mit Hilfe von Marathon- und SMART-cDNA-Bibliotheken aus dem Xylem-Kambium-Phloem-Bereich bzw. sich teilendem, oberirdischem Sprossgewebe nach Amplifikation spezifischer 5'-terminaler Sequenzen die vollständigen cDNA-Moleküle eines putativen Kaliumkanals und K⁺-Transporters isoliert werden (Abb. 13). Die cDNA des Kanals wurde aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten mit AKT2/3 im Folgenden als *PTK2* bezeichnet. Die cDNA des Transporters konnte der KT/KUP/HAK-Familie zugeordnet werden und erhielt im Weiteren die Bezeichnung *PtKUP1*.

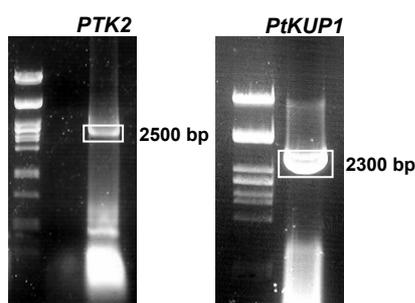


Abb. 13: PCR mit Volllängenprimern von *PTK2* und *PtKUP1*. Alle PCR's zeigten als Hauptprodukt jeweils nur eine Bande der erwarteten Größe.

3.1.2 Klonierungen von *KPT1* (K^+ channel *Populus tremula* 1)

Bei Aminosäuren-Sequenzvergleichen bekannter pflanzlicher Kaliumkanäle der *Shaker*-Familie fielen insbesondere drei hochkonservierte Bereiche auf. So waren in begrenzten Bereichen der zweiten (S2) und sechsten (S6) transmembranen Domäne und der Porenregion (P) (vgl. 1.4.2) mindestens sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren identisch (Abb. 14). Der Einsatz degenerierter Primer, die alle möglichen Kodierungen für diese Aminosäuren-Bereiche abdeckten, sollte eine Amplifikation weiterer Kaliumkanal-Fragmente ermöglichen.

Abb. 14: Aminosäurenvergleiche der S2-, Poren- und S6-Regionen der pflanzlichen Kaliumkanäle *KPT1*, *KST1* (K^+ -Transporter aus *Solanum tuberosum* 1), *KAT1* (K^+ -Kanal aus *Arabidopsis thaliana* 1), *KAT2* (K^+ -Kanal aus *Arabidopsis thaliana* 2), *SIRK* (Stomatal Inward Rectifying K^+ channel aus *Vitis vinifera*) und *KZM1* (K^+ -Kanal aus *Zea mays* 1).

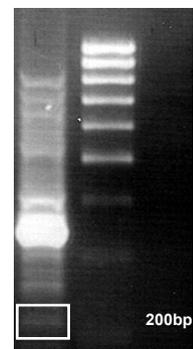
S2		
<i>KAT1</i>	91	IFIIIDNIVNGFFAIDIILTFFVAYL
<i>KAT2</i>	91	LFIIIDNIVNGFFAIDIILTFFVAYL
<i>KST1</i>	93	LFIVDNIVDCFFAIDIILTFFVAYL
<i>SIRK</i>	91	LFIFDNIVNGFFAIDIILTFFVAYL
<i>KPT1</i>	91	LFIFDNIVNGFFAVDIALTFFVAVL
<i>KZM1</i>	120	LLLAENIVNGFFAVDIVLTFFVAYV

Pore		
<i>KAT2</i>	249	TALYWSITTLTTTGYGDLHAENPR
<i>KZM1</i>	278	TALYWSITTLTTTGYGDLHAENPR
<i>KAT1</i>	249	TALYWSITTLTTTGYGDLHAENPR
<i>KPT1</i>	249	TAMYWSITTLTTTGYGDLHAENPR
<i>SIRK</i>	249	TSIYWSITTLTTTGYGDLHAENPR
<i>KST1</i>	253	TSLYWSIVTLTTTGYGDLHABNSR

S6		
<i>SIRK</i>	275	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV
<i>KST1</i>	279	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV
<i>KPT1</i>	275	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV
<i>KZM1</i>	304	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV
<i>KAT1</i>	275	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV
<i>KAT2</i>	275	LFDFYFMYLFFNLGLTSYLI GNMTNLVV

Mit dem Primerpaar *Ps* und *S6as* konnte aus einer Pappel-cDNA oberirdischen Sprossgewebes, neben zahlreichen anderen, die entsprechende Bande von ca. 200 bp identifiziert (Abb. 15) werden.

Abb. 15: PCR-Produkte mit den degenerierten Primern *Ps* und *S6as*. Aufgrund der hohen Homologie der Kaliumkanäle in dem Bereich zwischen der P- und S6-Region kam nur die Bande von ca. 200 bp (markiert) in Frage.



Das Fragment wies Homologien zu dem in Schließzellen exprimierten Kaliumkanal *KAT1* aus *A. thaliana* auf. Dieser neue Kaliumkanal aus der Pappel wurde analog als *KPT1* bezeichnet.

Nach Amplifikation von 5'- und 3'-Ende der *KPT1*-cDNA konnte aus einer Spross-SMART-cDNA eine 2,3 kbp Bande als Volllänge von *KPT1* (Abb. 16) identifiziert werden. Die Sequenzierung der Fragmente zeigte ein Start- und Stoppcodon mit einem offenen Leseraster sowie eine Poly-Adenin-Sequenz am 3'-Ende. Nukleinsäurenvergleiche bestätigten die Zugehörigkeit von *KPT1* zur KAT1-Unterfamilie pflanzlicher *Shaker*-Kanäle.

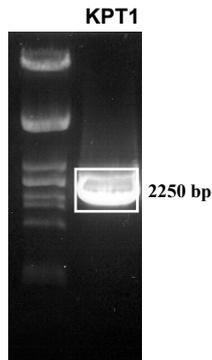


Abb. 16: PCR mit Volllängenprimern von *KPT1*. Die PCR zeigte als Hauptprodukt nur eine Bande mit der erwarteten Größe von 2250 bp.

Mit *PTORK* (*Populus tremula* outward rectifying K^+ channel), *PTK2* und *KPT1* waren jetzt Vertreter verschiedener Unterfamilien der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle sowie ein Kaliumtransporter (*PtKUP1*) der KT/KUP/HAK-Familie bekannt. Mit diesem Set von Kaliumtransportern sollte nun eine Analyse der bei der Holzbildung wichtigen Kaliumflüsse möglich sein. Die folgenden molekularbiologischen und physiologischen Studien wurden daher unter baumspezifischen Aspekten durchgeführt. Von den orthologen Kanälen zu *PTORK* und *PTK2* aus *A. thaliana* war bekannt, dass sie am Kaliumtransport des Phloems und Xylems beteiligt sind (z. B. Ache *et al.*, 2001; Deeken *et al.*, 2000 und 2002). Da die Holzbildung in Bereichen des Kambiums und Xylems stattfindet und dort kontrolliert wird, konzentrierten sich alle weiteren holzspezifischen Forschungen auf *PTORK*, *PTK2* und *PtKUP1*. Dagegen wurde *KPT1* eingehender in der ebenfalls baumspezifischen Blattknospenentwicklung und im Blatt analysiert.

3.1.3 Sequenzanalysen

3.1.3.1 *PTK2*

Das durchgängige Leseraster der abgeleiteten, kodierenden Sequenz von *PTK2* war im 5'-Bereich von einem potentiellen Translationsstart und im 3'-Bereich durch das Stoppcodon „UAG“ begrenzt (s. 8.4.1.1). Die Nukleinsäuresequenz der kodierenden Region von *PTK2* umfasste 2491 bp und wurde in der Sequenz-Datenbank des European Bioinformatics In-

Die potentiellen Bindestellen für cyclische Nukleotide (cNMP) sind durch gestrichelte Linien markiert und Ankyrin-Konsensus Domänen (ANK) durch gepunktete Rahmen in den PTK2- und AKT2/3-Sequenzen und in KPT1. C-terminal hydrophobe und saure Domänen (K_H , K_A) sind eingerahmt.

PTK2 zeigte im Vergleich mit weiteren Vertretern pflanzlicher *Shaker*-Kanäle die größten Ähnlichkeiten zu VFK1 (*Vicia faba*), dabei lag die Aminosäureidentität bei 68 %, zu SKT2 (*Solanum tuberosum*) bei 65 % und AKT2/3 (*Arabidopsis thaliana*) bei 63 %, allesamt Mitglieder der AKT2/3-Unterfamilie (Abb. 18).

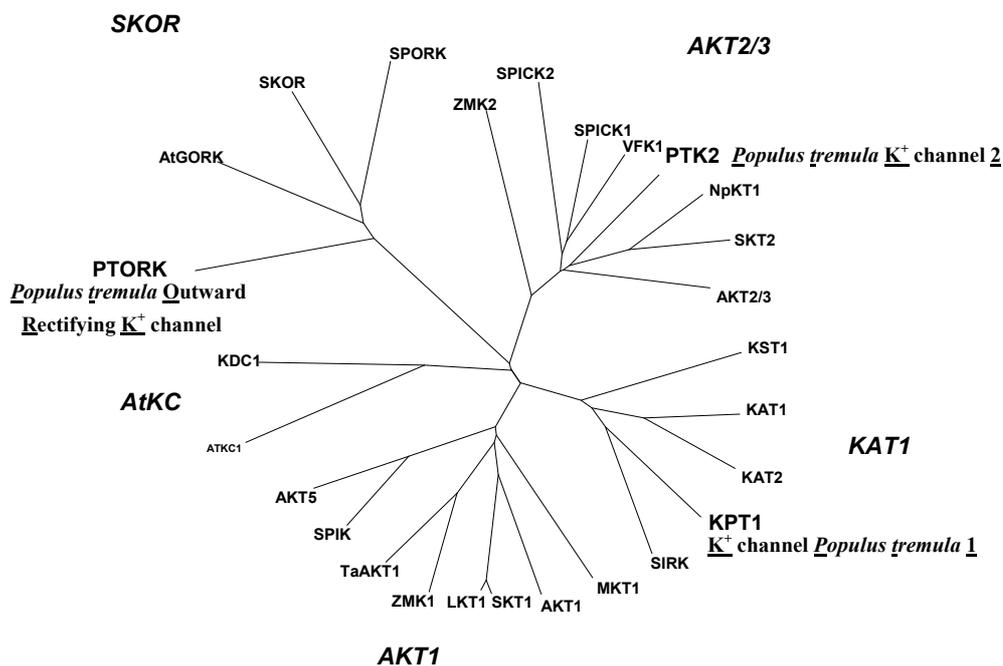


Abb. 18: Phylogenetischer Baum pflanzlicher K^+ -Kanäle des *Shaker*-Typs mit hervorgehobenen Pappel-Kanälen und den Unterfamilien (Kursiv). GenBank Zugangsnummern der Sequenzen: PTORK, AJ271446; AtGORK, AJ279009; SKOR, NM_123109; SPORK, AJ299019; ZMK2, AJ132686; SPICK2, AF145272; SPICK1, AF099095; VFK1, Y10579; PTK2, AJ271447; NpKT1, AB032074; SKT2, Y09699; AKT2/3, NM_118342; KST1, X79779; KAT1, NM_123993; KAT2, NM_117939; KPT1, AJ344623; Sirk, AF359521; MKT1, AF267753; AKT1, NM_128222; SKT1, AF237951; LKT1, X96390; ZMK1, Y07632; TaAKT1, AF207745; SPIK, AC006053; AKT5, AJ249479; AtKC1, U81239; KDC1, AJ249962. Der phylogenetische Baum wurde anhand der Proteinsequenzen mit den Programmen Clustal X and TreeView erstellt.

3.1.3.2 KPT1

Die Sequenzierung von *KPT1* ergab ein durchgängiges Leseraster von 2257 Nukleotiden, flankiert von einem möglichen Start- sowie dem Stoppcodon „UGA“. *KPT1* wurde unter

der Nummer AJ344623 in der GenBank von EBI abgelegt. Die abgeleitete Proteinsequenz (Abb. 17) der codierenden Region umfasste 751 Aminosäuren mit einer vorhergesagten Masse von 85,93 kDa und wies, wie PTK2, neben einer kurzen N-terminalen cytosolischen Region einen hydrophoben Kern aus sechs transmembranen Domänen auf. An den lipophilen Kern schloss sich eine 359 Aminosäuren lange C-terminale Region an, mit putativen Bindestellen für cyclische Nukleotide, einer hydrophoben Domäne K_H und einer sogenannten sauren Domäne K_A . Nach Aminosäurenvergleich mit anderen *Shaker*- K^+ -Kanälen zeigte die KPT1-Proteinsequenz mit 67 % Aminosäureidentität die höchsten Homologien zu SIRK (aus *Vitis vinifera*, Pratelli *et al.*, 2002; s. Abb. 18) und mit jeweils 58 % Identität zu KAT2 (Pilot *et al.*, 1997) und KAT1 (Anderson *et al.*, 1992; beide aus *A. thaliana*).

Nach ausführlicher Sequenzanalyse wurde ein für diese Unterfamilie untypisches Charakteristikum in KPT1 entdeckt. So enthielt die Aminosäuresequenz eine kleine putative Ankyrin-Konsensus Domäne hinter der Bindestelle für cyclische Nukleotide (s. Abb. 17 und 19). Bislang wiesen nur die Peptidsequenzen der AKT1-, AKT2/3- und SKOR-Unterfamilien eine derartige Sequenz auf. Im Gegensatz zu KPT1, der nur eine Abfolge dieser Domäne besitzt, verfügen sie jedoch über fünf bis sechs aufeinanderfolgende Motive. Die zusätzliche Ankyrin Domäne war für die geringere Homologie zwischen KPT1 und den anderen KAT1-Vertretern verantwortlich. Lediglich SIRK, wie KPT1 aus einer mehrjährigen Pflanze isoliert, zeigt ebenfalls diese Domäne (Abb. 19 b). Außerdem enthalten KPT1, SIRK und KST1, verglichen mit den restlichen KAT1-Kanälen, in der hochkonservierten Porenregion zwei abweichende Aminosäuren (vgl. Abb. 14).

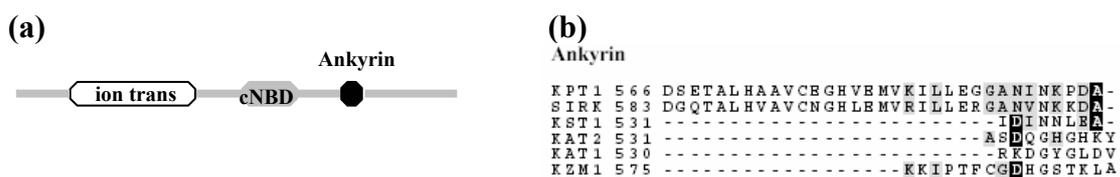


Abb. 19: (a) Schematische Darstellung einiger abgeleiteter regulatorischer Domänen von KPT1 und (b) Sequenzvergleich der Ankyrin-Domäne von KPT1 und SIRK. (ion trans = Domäne für den Ionentransport; cNBD = Bindestelle für cyclische Nukleotide; Ankyrin = Ankyrin-Domäne).

3.1.3.3 PtKUP1

PtKUP1 besaß ein durchgängiges Leseraster von 2331 Nukleotiden mit „UAA“ als Stoppcodon. Die abgeleitete Proteinsequenz des codierenden Bereichs umfasste 774 Aminosäuren mit einer vorhergesagten Masse von 87,3 kDa. Die cDNA-Sequenz wurde unter der Nummer AJ299422 in der Datenbank von EBI abgelegt. Im Gegensatz zu *PTK2* und *KPT1* ergaben Sequenzanalysen keine Zugehörigkeit zu den Kaliumkanälen. Vielmehr ließ sich *PtKUP1*, wie bereits vermutet, aufgrund von Sequenzhomologien den pflanzlichen *KT/KUP/HAK*-Transportern (z. B. Mäser *et al.*, 2002) zuordnen (s. Abb. 20 und 21).

			S1
PtKUP1	1	-----MAECKNR---RKHVLLLAYQSFQVVFSDLSLPPLYVYKCTFSGRLRHYQ	
AtTRH1	1	-----MADRNR---CNQILLLAYQSFQVFGDLSISPLYVYKCTFYGLRHHQ	
AtKTT1/KUP1	1	MNQSPSLIEQGISQQHLKLTLSCANVLTLAYQSLGVLYGDLSISPLYVYKTFSTFSGLSLHE	
		S2	
PtKUP1	47	NEDTVFGAFSLVFWTLTFLSFLKYYVGFMLCANDNGEGGFALYSVICRHAKFCLLPNOQA	
AtTRH1	47	TEDTIFGAFSLIFWTLTLLSLIKYVMEVLSADDNGEGGFALYALLCRHARFSLLPNOQA	
AtKTT1/KUP1	61	DDEELFGVFSFLFWTLTLLALFKYVFIIVLSADDNGEGGTALYSLLCRYAKLSLTPNHQE	
		S3	
PtKUP1	107	ADEEISTYH SV GYSNRNVVTSRFKKFVEGHKKMKTALLVVLVFGAAVFIITIAIFTPAIS I	
AtTRH1	107	ADEEISTYV GP GDASRNLPSSAFKSLIERNKRSKTALLVVLVGTSMVITIGVLTPAISV	
AtKTT1/KUP1	121	MDEKLSTYAT-GSPGETRQSAAVKSFEEKHPKSKQCLLFLVLLGTCAIMGDSLTPNHSV	
		S4	S5
PtKUP1	167	LSSVEGLQVRAKNLHHGMLVITIALFLLIGLFVLOHYGMHRVAFIFSPIVILWLLSIAFVG	
AtTRH1	167	SSSIDGLVAKTS-LKHSTVVMIACALLVGLFVLOHRTNKVAFIFAPIMILWLLIATAAG	
AtKTT1/KUP1	180	PSAVSGVKKLKIPLHFNYYVVIACITLVAIFSVQRVGTNRVAFIFAPISAWLLSISIG	
		S6	
PtKUP1	227	IYNIINWNP RVYQALSPYYIYKFFGETGKDGWI SLGGILLCITGTEVVFAGLGHFTASSI	
AtTRH1	226	VYNIIVTWNPSVYKALSPYYIYVFFRDGTIGIDGWL SLGGILLCITGTEAIFAEELGQFATSI	
AtKTT1/KUP1	240	VYNTIKWNPRI VSA LSPVYMYKFLRSTGV EGWV SLGGVVLSTITGVETMFADLGHFSSLSI	
		S7	S8
PtKUP1	287	RVAFSEVVYPCLVLQYMGQAFLSQNFSSVSTSFHSSIPDLSLFWPVTVMATLAAI VASQA	
AtTRH1	286	RFAFCCVVPCLVLQYMGQAFLSKNFSA LPSSFYSSIPDPFFWPVLMAMLAAMVASQA	
AtKTT1/KUP1	300	KVAFSFFVYPCLT LAYMGEVAFLSKHHEDIQQS FYKALPEPVPFWPVI VATAFAAVVGSQA	
		S9	
PtKUP1	347	VVSATFSIAKQCHALGCFPRIKIVHKS KVVHRQTYIPEINWALMILCLAVTVGSDTIHL	
AtTRH1	346	VIFATFSIVKQCYALGCFPRV KIVHKPRVWLGQIYIPEINWVVMILTLAVTICFRDTRHI	
AtKTT1/KUP1	360	VISATFSIISQCCALDCFP RVKIHTHTSSKIHGQIYIPEVNWMLCLCLAVTIGLRTNMM	
		S10	S11
PtKUP1	407	GNAYGIACITGIFVTTCLTSMIIDFVWHKNLLVALLYFSFFGIIEIIFVSSSCMRIPKGG	
AtTRH1	406	AFAEGLACMTLAFVTWLMPLIINFVWNRNI VFSVLEILFFGTIELIFVASALVRIKGG	
AtKTT1/KUP1	420	GHAYGLAVT SVM LVTTCLMLTVMTIIVWQRIITVLAEEVVFSGSIELLYFSSCVYKVEEGG	
		S12	
PtKUP1	467	WVPLVLTAVFMSVMYVWHYGSRRKYL YDLHNKASMKWILLTLPDLDGIVRIPGIGLVYTEL	
AtTRH1	466	WITLLLSLFFFTFYVWHYGSRRKYL CDQHNKVMKSTL SLGSPSLGIKVPGLGLVYTEL	
AtKTT1/KUP1	480	WIPILLSLTFMAVMYTWNYGTTKKHEFDV ENKVSMDRIVSLGPSIGMVRVPGIGLVYSNL	
		S13	
PtKUP1	527	ASGVPAMFSQFITDLPETFYQVVVFLCVKTVPIPYV SQKERYLIGRIGPKPYRMYRCIVRY	
AtTRH1	526	ASGVPATFKHFLTNLPAPYQVVVFCCKTVPIPYVPQKERYLIGRIGPKTYRMYRCITRA	
AtKTT1/KUP1	540	VTGVPAVFGHFVTNLPAEHKILV FVCVKSIVQVPYVGEERFVVISRVGPK EYGMFRSVVRY	
		S14	
PtKUP1	587	GKVDVHENDYDFENAI VMSVAEFIOLEAE--GGGTL DGSVDGRLAVVRSSENFKR FMM	
AtTRH1	586	GKVDVNKGDGDFEDLVMSIAEFIOLES EGYGGSNTDRSVDGRLAVVKASNKFKR LSR	
AtKTT1/KUP1	600	GVRDVPREMY-DFESRLVSAIIVEFVGT EPG-----L EEEEMS SVR-----	
		S15	
PtKUP1	645	SESDGNKESSSWSYPAGSSSRSTALQK LKSMYELESPEFCNRRRIQLKLLDTYKDSRV	
AtTRH1	645	SISEANIAGSSRSQ-TT VTNSSKSPALLKLRAEYQELERLSMRRMFQFRPMDTKFRQPQV	
AtKTT1/KUP1	629	-----L EEEEMS SVR-----	
		S16	
PtKUP1	705	KEELLELELEAKDAGVAYVIGHSHIKAKWNATFWKRLLIN VFLSFLRKNCRSPS VGLNIPH	
AtTRH1	704	KEELFDLVNAKDAEVAYIVGHGHVAKARNSEVVKQLVNVN VAYSFLRKNCRSEGVMLNIPH	
AtKTT1/KUP1	641	KEECMEIMEAKRAGVAYILGHSYAKAKQS SSVLKRDAVNVVFAFMSTNCRGTDVVLNIPH	
		S17	
PtKUP1	765	ISLIEVGMNYYL	
AtTRH1	764	ICLIKVGMNYYL	
AtKTT1/KUP1	701	TSLLEVGMVYYV	

Abb. 20: Sequenzvergleich des Pappel-Transporters *PtKUP1* mit *AtTrh1* (*A. thaliana* *Tiny*)

Root Hair 1; Rigas *et al.*, 2001) und AtKT1/KUP1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ uptake transporter 1, Kim *et al.*, 1998) aus *A. thaliana*. Identische Aminosäuren sind schwarz, Konservierte grau unterlegt. Die putativen transmembranen Segmente nach Kim *et al.* (1998) S1-S12 sind durch durchgezogene Linien hervorgehoben.

Diese Familie zeichnet sich durch hohe Homologien zu nicht-pflanzlichen Kaliumtransportern aus *Escherichia coli* und *Schwanniomyces occidentalis* aus (Kim *et al.*, 1998). So betragen die Aminosäurenidentität von PtKUP1 zu den Transportern Kup (*E. coli*) bzw. HAK1 (*S. occidentalis*) 20 % und die Aminosäurenähnlichkeit 40 %. PtKUP1 war mit 64 % Identität auf Aminosäure-Ebene dem *Arabidopsis*-Transporter AtTrh1 am ähnlichsten (s. Abb. 20 und 21).

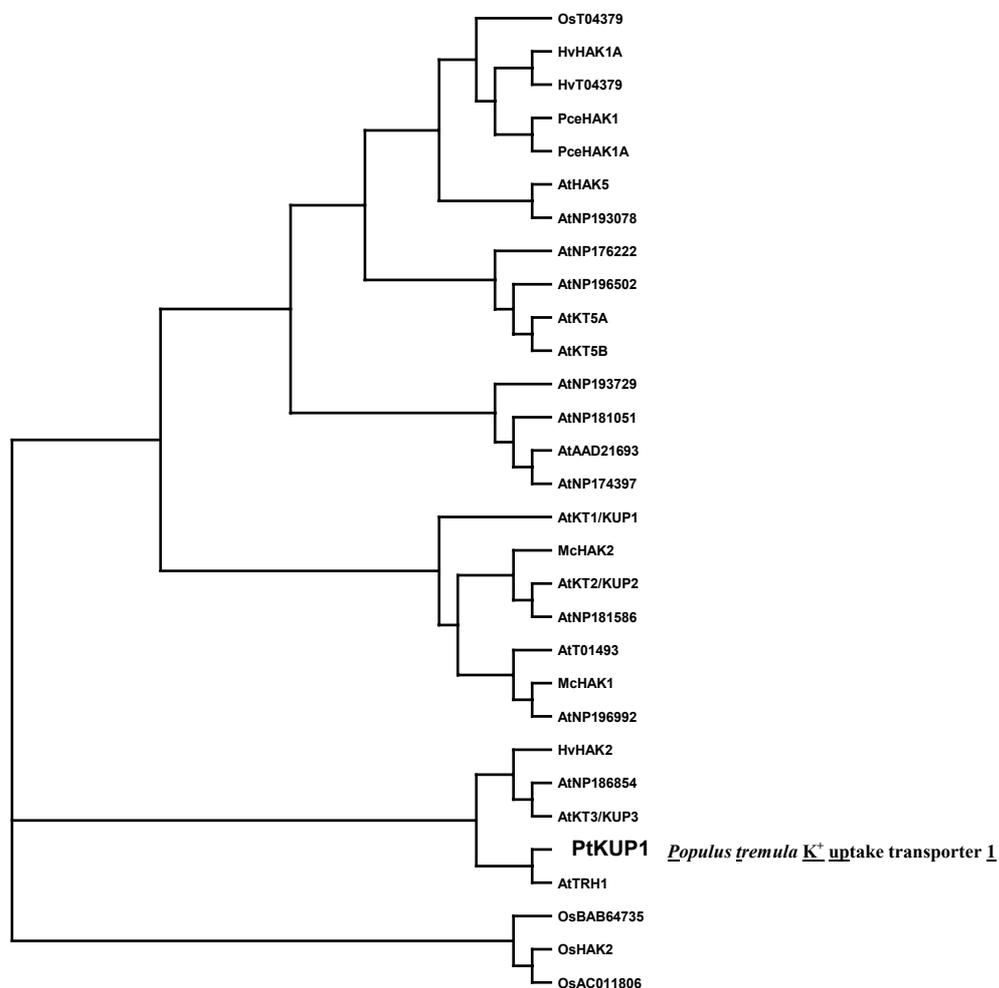


Abb. 21: Phylogenetischer Baum pflanzlicher K^+ -Transporter der KT/KUP/HAK-Familie mit hervorgehobenem Pappel-Transporter. GenBank Zugangsnummern der Sequenzen: HvHAK1A, AF025292; HvHAK2, AF129479; AtKT1/KUP1, AF012656; AtKT2/KUP2, AF012657; AtHAK5, AF129478; PtKUP1, AJ299422; AtTrh1, AJ296155; McHAK1, AF367864; McHAK2, AF367865; OsHAK2, C011806; AtNP_181586; AtNP_196992; AtT01493; OsAC011806; AtNP_186854; AtKT3/KUP3,

AF207621; AtNP_181051; OsBAB64735; AtAAD21693; AtNP_174397; AtNP_176222; AtNP_193729; PceHAK1, BAB32443/AB055630; PceHAK1A, BAB32444/AB055631; HvT04379; OsT04379/AP003272; AtKT5A, T04970; AtKT5B, NP_195079/Nc 003075; AtNP_196502; AtNP_193078. Der phylogenetische Baum wurde anhand der Proteinsequenzen mit den Programmen Clustal X and TreeView erstellt.

Für AtTrh1 wurde eine Struktur, bestehend aus einer kurzen hydrophilen N-terminalen Domäne, einer großen hydrophoben mittleren Region mit 14 transmembranen Segmenten und einem längeren C-terminalen Bereich, diskutiert (Rigas *et al.*, 2001). Dagegen wurden basierend auf Hydrophobizitäts-Analysen für AtKUP1 12 membrandurchspannende Domänen vorgeschlagen (Kim *et al.*, 1998). Bis zur Kristallisation eines Proteins dieser Familie und der NMR-spektroskopischen Auswertung lässt sich die Struktur nicht eindeutig feststellen, so dass auch für PtKUP1 nur Vermutungen getroffen werden können. Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigte jedoch, dass PtKUP1 und AtTrh1 gegenüber AtKUP1 ca. 60 zusätzliche Aminosäuren im C-terminalen Bereich besitzen (s. Abb. 20). Aufgrund dieser Verlängerung des Proteins könnten zwei zusätzliche, membrandurchspannende Segmente für PtKUP1 und AtTrh1 vermutet werden.

3.2 Einfluss des Kaliums auf die Holzbildung

Um die Ergebnisse der molekularen Grundlagen des Kaliumtransports im Baum mit morphologischen und physiologischen Aspekten der Kaliumversorgung zu verknüpfen, wurden Kaliumgehalte verschiedener Gewebe der Pappel im Jahresverlauf bestimmt (Wind, 2003 und darüber hinaus der Einfluss der Kaliumversorgung auf das Kambium und die ausdifferenzierten Gewebe des Phloems und Xylems untersucht (Arend, 2001).

3.2.1 Änderungen der Kaliumkonzentration im Baum

Die Kaliumgehalte wurden mittels Energiedispersiver Röntgenanalyse (Fromm *et al.*, 1987) bestimmt. Die Kaliumkonzentration des Kambiums variierte signifikant im Verlauf des Jahres. So wurden im Sommer hohe Kaliumgehalte bestimmt, die sich auf ein Drittel im Winter reduzierten (Abb. 22 a). Eine signifikante Abhängigkeit der Kaliumgehalte kambialer und sich differenzierender Xylemzellen von der Kaliumversorgung konnte durch experimentelle Änderungen des zugeführten Kaliums nachgewiesen werden (Abb. 22 b). Pflanzen, die unter niedrigen Kaliumbedingungen (0,05 mM K⁺) kultiviert wurden, enthielten in allen Zelltypen geringe und gleich verteilte Kaliumwerte. Eine Erhöhung der

Kaliumversorgung auf 5 mM K^+ resultierte in einer generellen Verdopplung der gemessenen Kaliumkonzentrationen. Nach Steigerung der Kaliumversorgung auf 10 mM K^+ (= 200fach K^+) erhöhten sich die Kaliumgehalte in Fasern und kambialen Zellen auf das Dreifache. Sie erreichten in sich differenzierenden Gefäßen maximale Werte, die viermal so hoch waren, wie die bei limitierenden K^+ -Bedingungen (Abb. 22 b). Bei einer Versorgung mit 10 mM Kalium vergrößerte sich zusätzlich die Zone der sich streckenden Xylemzellen um das Dreifache (Abb. 22 c und d). Unter Kaliummangel setzte die Bildung sekundärer Zellwände früher ein, was in einem zeitigeren Abschluss der Differenzierung resultieren könnte.

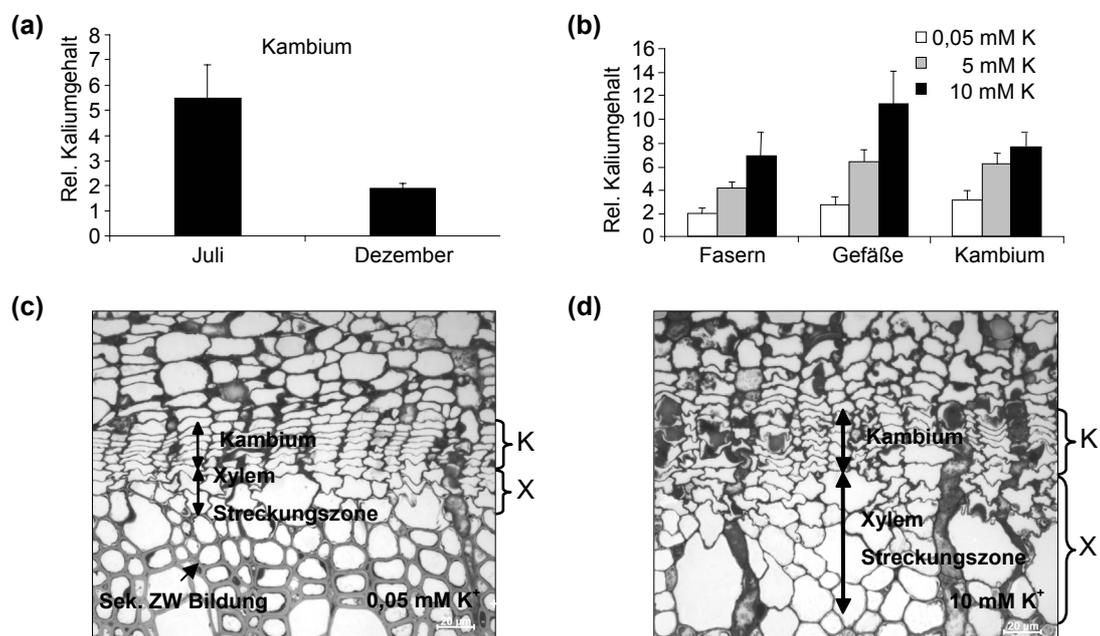


Abb. 22: Effekt der Kaliumversorgung auf die Holzbildung in *P. tremula x P. tremuloides* (Wind, 2003 und Langer *et al.*, 2002). (a) Saisonale Änderungen der relativen Kaliumgehalte, EDXA Peak/ Hintergrund Verhältnisse ($n = 10 \pm$ SD). (b) Relative Kaliumwerte kambialer Zellen, sich differenzierender Fasern und Gefäße, versorgt mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen ($n = 10 \pm$ SD). (c) und (d) Stamm-Querschnitte zu Beginn einjähriger Pappeln, die in 0.05 mM K^+ (c) oder 10 mM K^+ (d) angezogen wurden. K = Kambium, X = Streckungszone des Xylems.

3.2.2 Die Kaliumversorgung beeinflusst die Zellgröße kambialer Derivate

Zum Nachweis eines Effekts der Kaliumversorgung auf die Zellgröße von Gefäßen und Fasern wurden bewurzelte Zweige von *P. trichocarpa* in Hydrokultur mit 1 bzw. 11 mM Kalium kultiviert. Die über die Nährlösung zugeführte Menge an Kalium beeinflusste ei-

nerseits den Kaliumgehalt des aktiven Kambiums (Abb. 23 a). So reduzierte sich die Kaliumkonzentration im Kambium bei 10 mM niedrigerer K^+ -Versorgung um 35 %. Nach Bestimmung und Vergleich der Gefäß- und Faserweiten neu gebildeter Zellen zeigte sich andererseits, dass sich die Gefäße infolge der reichlicheren Kaliumversorgung um etwa 30 % vergrößerten (Abb. 23 b). Dagegen beeinflusste die unterschiedliche Kaliumversorgung nicht die Ausdehnungen der neugebildeten Fasern. Im Vergleich zu den Zweigen, die nur in 1 mM Kalium kultiviert wurden, führte die Behandlung mit dem Kaliumkanalblocker TEA^+ zu einer weiteren Verringerung der Gefäß-Querschnittsflächen auf etwa die Hälfte (Abb. 23 b). Der Effekt des Kaliumkanalblockers deutete auf eine Rolle der Kaliumkanäle an den Prozessen der Gefäß- und somit der Holzbildung hin. Die durch TEA^+ hervorgerufenen, kleineren Gefäßweiten sind in Abb. 23 c und d in Querschnitten von Zweigen deutlich erkennbar.

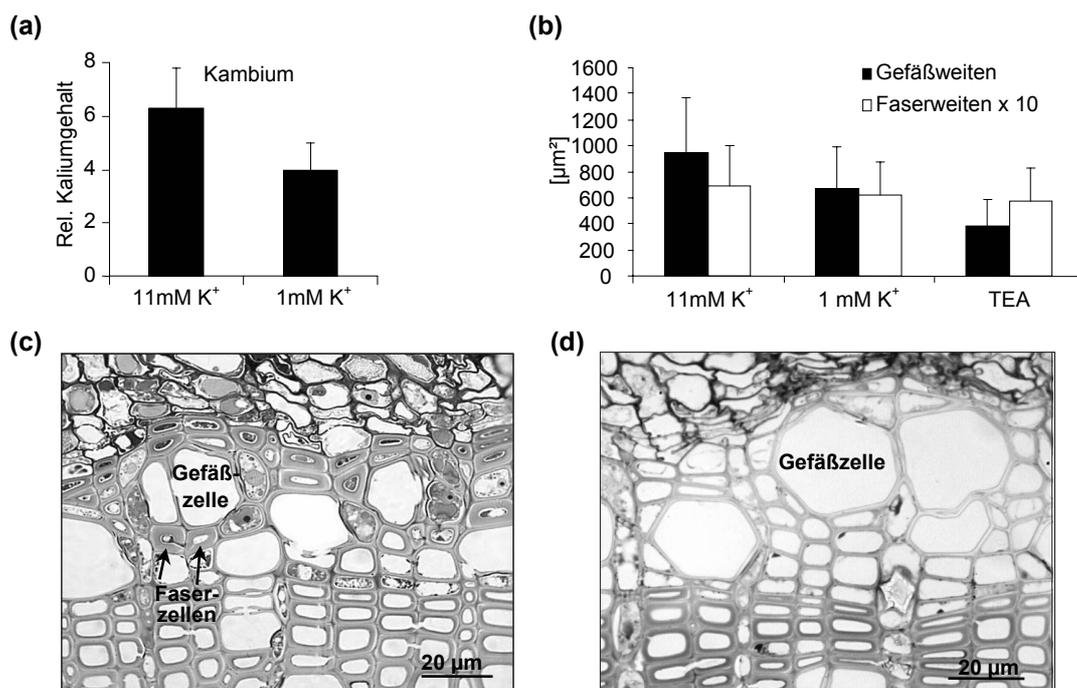


Abb. 23: Relative, kambiale Kaliumgehalte und kaliumabhängige Gefäßlumina (Arend, 2001 und Langer *et al.*, 2002). (a) EDXA, die relative Kaliumkonzentration des Kambiums stieg bei einer Kaliumversorgung von 11 mM gegenüber 1 mM um ein Drittel an. (b) Effekt einer Behandlung mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen und 5 mM TEA^+ auf die Gefäßweiten. TEA^+ wurde lokal begrenzt 2 Wochen lang auf die äußere Zweigoberfläche aufgetragen. (n = 10 +/- SD). (c) Der K^+ -Kanal Blocker TEA^+ reduzierte die Gefäßweiten, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle vom gleichen Zweig unterhalb der TEA^+ - behandelten Region (d).

3.3 Herstellung verschiedener Plasmide zur funktionellen Analyse

Um die Funktion der Kaliumtransporter bei der Xylogenese und Kaliumversorgung des Baums aufzuklären, wurden PTK2, KPT1 und PtKUP1 zunächst in heterologen Expressionssystemen untersucht. Die Charakterisierung der entsprechenden Proteine erfolgte entweder elektrophysiologisch mittels Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemmen Technik (DEVC, 2.10.1) oder durch Komplementation Kalium-Aufnahme-defizienter *E.coli* Mutanten (2.6.1 und 2.6.2). Transgene Pflanzen zur Untersuchung der morphologischen und physiologischen Bedeutung des Kaliumtransports im mehrjährigen Baum sollten durch Infektion mit *A. tumefaciens* erzeugt werden. Zum Nachweis der Funktionen der Kaliumtransporter mussten daher verschiedene Plasmide hergestellt werden.

3.3.1 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Für die Analyse der Kanaleigenschaften mittels DEVC in *Xenopus laevis* Oocyten wurden die Vollängen-cDNA's von PTK2, KPT1 und PtKUP1 in den pGEM HE-Vektor (Liman *et al.*, 1992) eingefügt. Anschließend erfolgte durch *in vitro* Transkription die Herstellung der cRNA (2.10.1.1), die in *Xenopus* Oocyten injiziert werden konnte.

3.3.2 Heterologe Expression im *E.coli* Stamm LB2003

PtKUP1 und KPT1 konnten in *Xenopus* Oocyten nicht funktionell nachgewiesen werden. Daher wurden sie durch Expression im *E.coli* Stamm LB2003 funktionell charakterisiert (Uozumi *et al.*, 1998). Zellen des LB2003 Stammes fehlen die Kalium-Aufnahmesysteme Trk, Kdp und Kup und können daher nur in Kulturmedien mit mehr als 5 mM Kalium wachsen. Wird diese Kalium-Aufnahme-Defizienz durch Expression eines Kaliumtransporters komplementiert, sind die Bakterien in der Lage, Kalium auch bei niedrigen Konzentrationen aufzunehmen. Dafür wurden die PtKUP1- und KPT1-cDNA's in den pCRII TOPO Vektor in T7-sense Orientierung inseriert.

3.3.3 Transformation von *A. tumefaciens* zur Generation transgener Pappeln

Um die Auswirkungen eines veränderten Kalium-Langstreckentransports auf die Holzeigenschaften der Pappel zu untersuchen, konzentrierten sich die Arbeiten zur Generation transgener Pappeln auf PTORK, PTK2 und PtKUP1. Die entsprechenden PTORK-

Konstrukte waren bereits fertiggestellt (Langer, 2000).

Es entstanden jeweils Plasmide für die Überexpression (*sense*) und Repression (*antisense*) der entsprechenden Kaliumtransporter.

Mit den verschiedenen Plasmiden wurden im Anschluss elektrokompetente Agrobakterien der Stämme GV3101 und LBA4404 transformiert (s. 2.6.4). Die mit *sense*- und *antisense*-Konstrukten transformierten Agrobakterien wurden für die Transformation von Pappeln nach Leplé und Tzfira (2.7.2) eingesetzt.

3.4 Funktionsanalyse

Kanäle gleicher Unterfamilien weisen funktionell ähnliche Charakteristika auf. Demzufolge wurden bestimmte Funktionen für die Pappel-Kanäle, sowie für PtKUP1 als Mitglied der KT/KUP/HAK-Familie, erwartet. Wie schon für PTORK, wurde zur elektrophysiologischen Funktionsanalyse von PTK2 cRNA in Frosch-Oocyten injiziert und die Genprodukte mittels DEVC von D. Geiger, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg, analysiert. Erste elektrophysiologische Hinweise für das *in vivo* Vorhandensein von PTORK, PTK2 und ähnlichen Kanälen lieferten Patch-Clamp Messungen an Protoplasten einer Pappel-Suspensionskultur, die von A. Stinzinger, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg, durchgeführt wurden. Viele Kaliumkanäle zeigen in *Xenopus* Oocyten aus bisher unbekanntem Gründen keine Funktion (siehe z. B. Dreyer *et al.*, 1997). Zu diesen Kanälen gehörte auch KPT1. PtKUP1 ließ sich, wie die meisten Vertreter seiner Familie, ebenfalls nicht mittels DEVC funktionell charakterisieren. Daher erfolgte die Funktionsanalyse von KPT1 und PtKUP1 durch Komplementation des Kalium-Aufnahme-defizienten *E.coli* Stamms LB2003.

3.4.1 Funktion von PTK2

PTK2-exprimierende Oocyten zeigten die charakteristischen Eigenschaften eines schwach spannungsabhängigen, nicht-gleichrichtenden Kaliumkanals mit instantanen und zeitabhängigen Komponenten (Abb. 24 a und b; Marten *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000; Langer *et al.*, 2002). Damit konnte aus der Pappel, neben dem strikt auswärts-gleichrichtenden PTORK, ein zweiter K⁺-Kanal funktionell nachgewiesen werden, der sowohl K⁺-Auswärts- als auch K⁺-Einwärtsströme vermittelt. Im Gegensatz zu PTORK war PTK2 bei positiven und negativen Membranpotentialen aktiv. Bei Spannungen positiv vom Kalium-Gleichgewichts-Potential wurde Kalium aus der Zelle entlassen. Das kalium-

abhängige Aktivierungsverhalten von PTK2 nach Nernst, seine Sensitivität gegenüber kationischen Kanalblockern und das Fehlen von Einwärtsströmen in Badlösungen, die ausschließlich Natrium und Lithium enthielten, klassifizierten PTK2 als K^+ -selektiv. Außerdem wies PTK2 charakteristische Eigenschaften von Vertretern der AKT2/3-Unterfamilie (z. B. Marten *et al.*, 1999) auf. So wurde PTK2 spannungsabhängig durch extrazelluläres Calcium geblockt (Abb. 24 c). Eine Erhöhung der externen Protonenkonzentration von pH 7.4 auf pH 5.6 verminderte die durch PTK2 vermittelten K^+ -Ströme (Abb. 24 d).

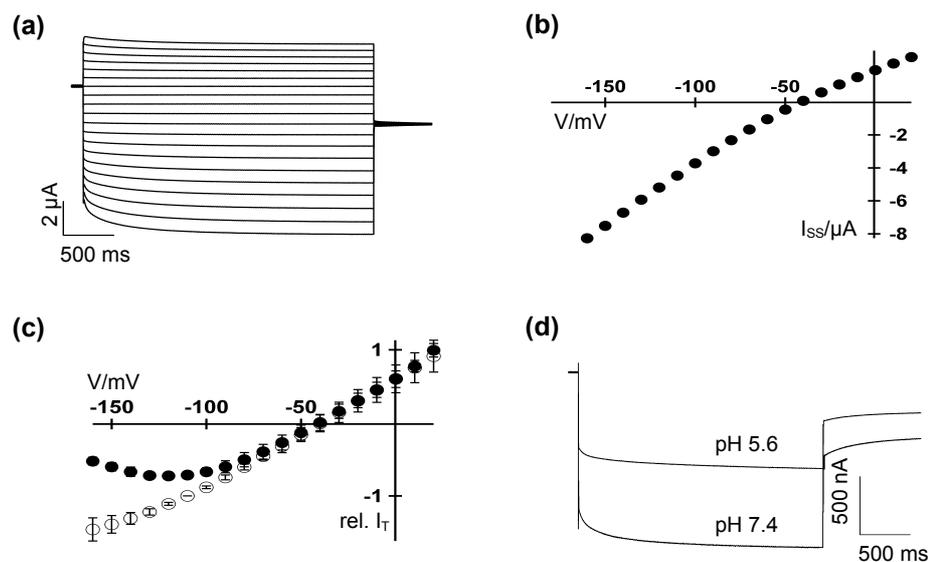


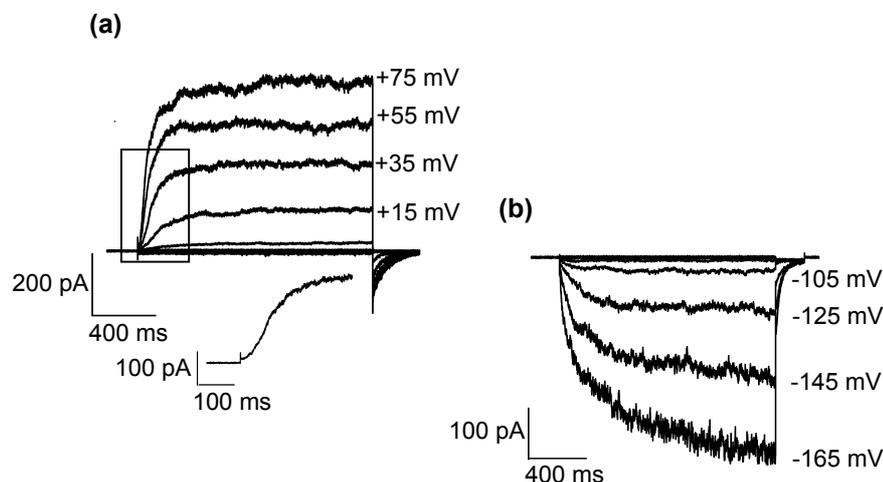
Abb. 24: Funktionelle Charakterisierung von PTK2. (a) Repräsentative Auswärts- und Einwärtsströme von PTK2-injizierten *Xenopus* Oocyten. Durch PTK2 wurden typische instantane und zeitabhängige Stromkomponenten vermittelt. Ausgehend vom Haltepotential bei -30 mV wurde die Membranspannung sukzessiv von $+30$ mV auf -160 mV in 10 mV Abständen für jeweils 2.5 sec geändert. Die Badlösung setzte sich aus 30 mM Kgluconat, 1 mM $CaCl_2$, 1.5 mM $MgCl_2$ und 10 mM Tris-MES (pH 7.4) zusammen. (b) Resultierende Strom-Spannungs-Kurve: Gleichgewichtsströme I_{ss} sind gegen die Membranspannung aufgetragen. Man beachte die schwache Spannungsabhängigkeit und Gleichrichtung von PTK2. (c) Relative instantane Tail-Strom-Amplituden, aufgetragen gegen die Spannung in Anwesenheit von 30 mM $CaCl_2$ (●) oder von 30 mM $MgCl_2$ (○). I_T Ströme wurden auf Ströme bei -110 mV in der Kontrolllösung normiert. Die Ca^{2+} -Lösung enthielt 20 mM KCl, 10 mM Tris-MES (pH 7.2) und 30 mM $CaCl_2$. In der Kontrolllösung wurde $CaCl_2$ durch $MgCl_2$ ersetzt. ($n = 3 \pm$ SD). (d) PTK2- K^+ -Ströme als Reaktion auf Einzelspannungspulse von -150 mV (Haltespannung = -30 mV) in Badlösungen mit pH 7.4 und 5.6. Die pH Lösungen setzten sich aus 30 mM Kgluconat, 1 mM $CaCl_2$, 1.5 mM $MgCl_2$ zusammen und waren auf pH 7.4 bzw. 5.6 gepuffert.

3.4.2 *In vivo* Kaliumströme in Protoplasten einer Pappel- Suspensionskultur

An Protoplasten einer Suspensionskultur wurden erstmals mit der Patch-Clamp Methode *in vivo* Kaliumkanäle der Pappel nachgewiesen und charakterisiert. Im „whole cell“- Experiment (vgl. 2.10.2) wurden Kalium-Auswärts- und -Einwärtsströme sichtbar (Abb. 25 a und b; Langer *et al.*, 2002).

Die Auswärtsströme folgten auf depolarisierende Membranpotentiale und zeigten, wie PTORK-exprimierende Oocyten (Langer, 2000), langsame, sigmoidale Aktivierungskinetiken, die typisch für die Vertreter der SKOR-Unterfamilie auswärtsgerichteter Kaliumkanäle sind (Gaymard *et al.*, 1998; Ache *et al.*, 2000). Der Efflux-Kanal wurde als Kalium-selektiv eingestuft, weil sich durch Erhöhung der externen Kaliumkonzentration das Umkehrpotential und die Spannungsabhängigkeit zu positiveren Werten verschob (vgl. Langer *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit der Expressionsanalyse der Zellkultur (vgl. 3.5.2.2) lag die Vermutung nahe, dass dieser Auswärtsgleichrichter durch PTORK repräsentiert wurde.

Durch Hyperpolarisation wurden spannungsabhängige, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (s. Abb. 25 b) aktiviert. Wurde die externe Kaliumkonzentration verringert, reduzierten sich abhängig davon auch die Amplituden des Einwärtsstroms (Langer *et al.*, 2002). Gleichzeitig verschob sich das Umkehrpotential nach Nernst, so dass zusammen mit der hohen Sensitivität gegenüber dem Kaliumkanal-Blocker Cäsium (Abb. 25 c) auch der Einwärtsgleichrichter als K^+ - selektiv klassifiziert werden konnte. Eine Erhöhung der externen Calcium-Konzentration von 1 mM auf 20 mM führte zu einem spannungsabhängigen Block des einwärtsgerichteten Kanals (Abb. 25 d).



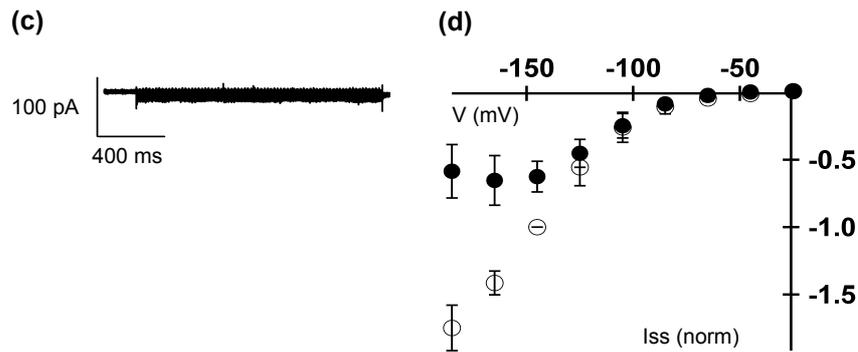


Abb. 25: Patch-Clamp Messungen von Protoplasten einer Pappel-Suspensionskultur. (a) Typische zeitabhängige, auswärtsgerichtete Ströme in der „whole cell“ Konfiguration der Patch-Clamp Technik. Spannungspulse von +75 mV bis -185 mV wurden in 20 mV Schritten angelegt, ausgehend von einem Haltepotential bei -85 mV. Die untere Einzelstromspur zeigt die sigmoidale Aktivierungskinetik der gemessenen Auswärtsströme mit hoher Ähnlichkeit zur Kinetik der PTORK-Ströme in Oocyten. (b) Spannungs- und zeitabhängige, einwärtsgerichtete Kaliumströme bei Spannungen negativ von -100 mV. (c) Nach Zugabe von 5 mM CsCl waren die Einwärtsströme vollständig geblockt. (Zur Kontrolle vgl. a und b.) (d) Spannungsabhängiger Calcium-Block von Gleichgewichtsströmen I_{ss} , aufgetragen gegen das Membranpotential in Anwesenheit von 20 mM Ca^{2+} (●) bzw. 1 mM Ca^{2+} (○). Die Strom-Spannungskurven wurden auf Ströme bei -145 mV in 1 mM $CaCl_2$ normiert, $n = 3 \pm$ SE.

Obwohl sich die Spannungsabhängigkeit deutlich von der PTK2-exprimierender Oocyten unterschied und zudem die Ströme, im Gegensatz zur heterologen Expression von PTK2, strikt einwärtsgerichtet waren (vgl. 4.3), deuteten die hohe Empfindlichkeit gegenüber Cäsium sowie der spannungsabhängige Calcium-Block darauf hin, dass PTK2 an dieser Kalium-Leitfähigkeit beteiligt war (vgl. Szyroki *et al.*, 2001).

3.4.3 Komplementation eines K^+ -Aufnahme-defizienten *E.coli* Stammes durch PtKUP1 und KPT1

E.coli LB2003 wurde freundlicherweise von K. Altendorf, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm zeichnet sich durch das Fehlen der Kalium-Aufnahmesysteme Trk (TrkG und TrkH), Kdp und Kup (TrkDa) aus und wächst daher nicht auf Medien mit Kaliumkonzentrationen von weniger als 5 mM. Für die halbmaximale Wachstumsrate benötigt die Mutante mind. 25 mM Kalium (Epstein and Kim., 1971). Zellen von LB2003 wurden mit KPT1/pCRII TOPO und PtKUP1/pCRII TOPO sowie dem Vektor pCRII TOPO als Kontrolle transformiert und auf Medien mit hohen (134 mM) und niedrigen Kaliumkonzentrationen (3 mM) kultiviert (vgl. 2.6.1). Im Gegensatz zu den mit dem

Kontroll-Vektor transformierten Zellen, die nicht auf Medium mit 3 mM Kalium wuchsen, bildeten dort sowohl die mit dem Kaliumkanal *KPT1* als auch die mit dem *PtKUP1* transformierten Bakterien unter K^+ -limitierenden Bedingungen Kolonien (Abb. 26). Beide Transporter komplementierten somit die fehlende Kalium-Aufnahmefähigkeit in *E. coli*.

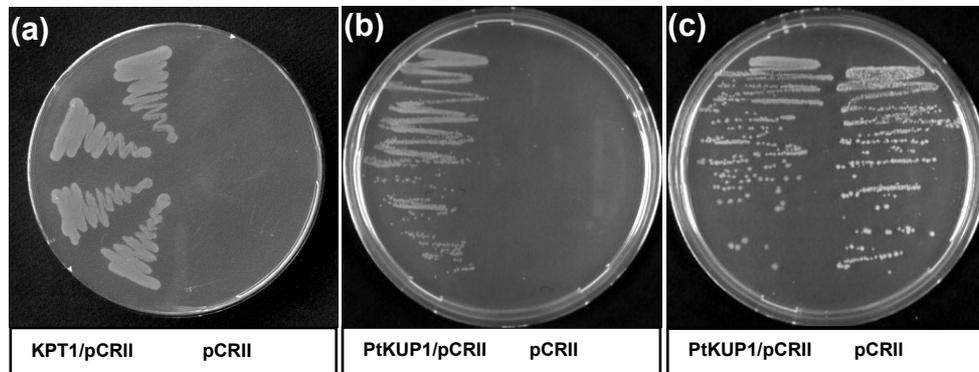


Abb. 26: Funktionelle Expression von PtKUP1 und KPT1. (a) KPT1 und (b) PtKUP1 komplementierten die K^+ -Aufnahme von *E. coli* LB2003. Auf 3 mM Kalium (a und b) bildeten die mit *KPT1* bzw. *PtKUP1* (jeweils links) transformierten Bakterien Kolonien. Im Gegensatz dazu wuchsen die mit dem leeren Vektor pCRII TOPO transformierten LB2003-Bakterien (Kontrolle, jeweils rechts) nicht. (c) Auf 134 mM Kalium wuchsen sowohl die Kontrolle als auch die mit PtKUP1 transformierten *E. coli*.

Um die Transport-Eigenschaften von KPT1 und PtKUP1 weiter zu charakterisieren wurden die Effekte von Calcium, Kaliumkanal-Blockern und pH-Änderungen im „Halo-Essay“ (Becker *et al.*, 1996) untersucht (s. 2.5.2). Es wurde der Einfluss von Calcium, Cäsium, TEA^+ (Tetraethylammonium) und Barium auf das Wachstum PtKUP1-exprimierender LB2003 geprüft. Nach einer Inkubation von 36 – 48 h war die starke Inhibition, erkennbar an einem dunklen Hof um das Filterplättchen, nach Calcium-Behandlung auffällig. Cäsium verringerte das Wachstum nur schwach und die bekannten Kaliumkanal-Blocker Barium und TEA^+ (Abb. 27) sowie pH-Veränderungen zeigten keine Wirkung.

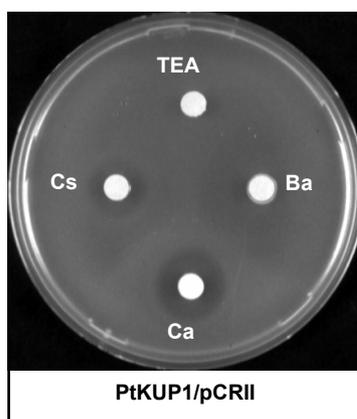
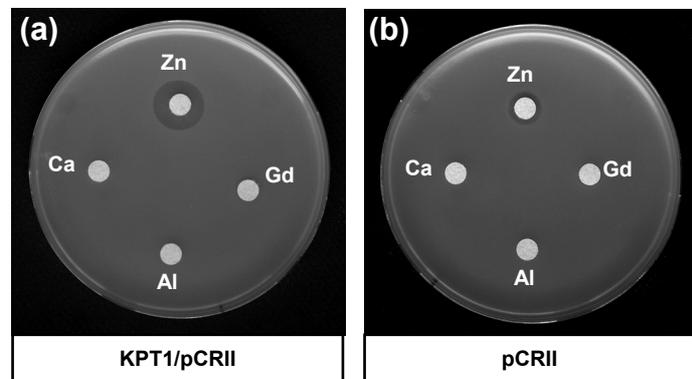


Abb. 27: Einfluss von 1 M TEA^+ , Cs^+ , Ba^{2+} und Ca^{2+} auf das Wachstum PtKUP1-exprimierender Bakterien. Calcium zeigt starke und Cäsium schwache Wachstumshemmung.

Darüber hinaus wurden die Effekte von Metallen, wie Lithium, Zink, Gadolinium und Aluminium, auf KPT1-exprimierende LB2003 untersucht. Das Wachstum wurde ausschließlich durch Zink inhibiert, wobei auch bei der Kontrolle eine leichte Wachstumseinschränkung zu beobachten war (Abb. 28).

Abb. 28: Einfluss von Zn^{2+} , Ca^{2+} , Gd^{2+} und Al^{3+} auf das Wachstum KPT1-exprimierender Bakterien.

Zink verminderte das Wachstum KPT1-exprimierender Bakterien. (a) 3 mM Kalium und (b) 134 mM Kalium.



Zusammenfassend wurden KPT1 und PtKUP1 als funktionelle Kalium-Aufnahmesysteme in *E. coli* charakterisiert. Dabei erwiesen sich PtKUP1 als sensitiv gegenüber Ca^{2+} und Cs^{+} und KPT1 gegenüber Zn^{2+} .

3.5 Lokalisation

Für die Aufklärung der physiologischen Rolle der isolierten Kaliumtransporter stellte sich nun die Frage, wo sind die isolierten Transporter in der Pappel lokalisiert. Dazu wurden Expressionsanalysen und immunologische Nachweisverfahren angewandt. Basierend auf Aminosäuren-Sequenzvergleiche wurden Bereiche mit den niedrigsten Übereinstimmungen gewählt und anhand der korrespondierenden cDNA Primerpaare für die Herstellung spezifischer Northern-Sonden (Fragmente von 600 – 750 bp), Quantitative Realtime PCR im LightCycler (Fragmente von 400 – 500 bp) sowie für *in situ* PCR (Abschnitte von maximal 180 bp) konstruiert. Zur Protein-Lokalisation mittels Glucuronidase-Essay wurden Promotor-GUS-Konstrukte hergestellt und für die Synthese von Antikörpern wurden geeignete Peptidsequenzen höchster Spezifität mit einer Länge von ca. 20 Aminosäuren identifiziert.

3.5.1 Northern Analyse

Verschiedene Gewebe, wie Blätter, Petiolen, Xylem, Phloem und Wurzel, wurden für die Northern Analyse eingesetzt. Als „sink“-Blatt wurden junge, nicht ausdifferenzierte Blätter

bezeichnet, „source“-Blätter waren ausdifferenziert und photosynthetisch voll aktiv. Die höchste Expression von *PTORK* und *PTK2* zeigte sich in den leitbündelreichen Blattstielen. Darüber hinaus waren *PTORK* und *PTK2* im Phloem und in „sink“-Blättern lokalisiert (Abb. 29).

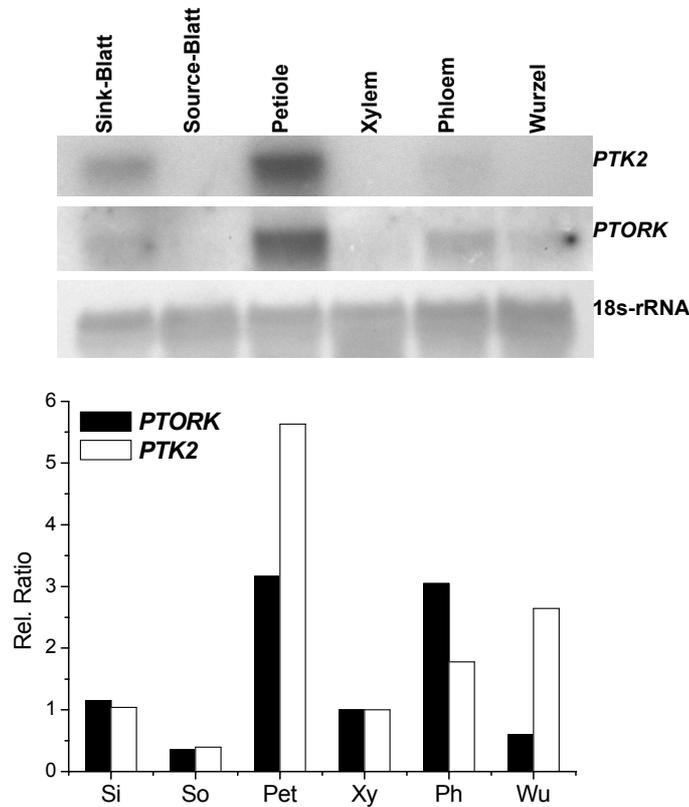


Abb. 29: Northern Analyse verschiedener Gewebe von *Populus tremula* x *P. tremuloides*. Oben: Autoradiogramm der Hybridisierungen mit den *PTORK*- und *PTK2*-Sonden. Eine 18S-Sonde wurde als Mengen-Kontrolle benutzt. Abb. 29 unten: Densitometrische Auswertung der Expression von *PTORK* und *PTK2* in Blättern (Si) und (So), Petiolen (Pet), Xylem (Xy), Phloem (Ph) und Wurzeln (Wu).

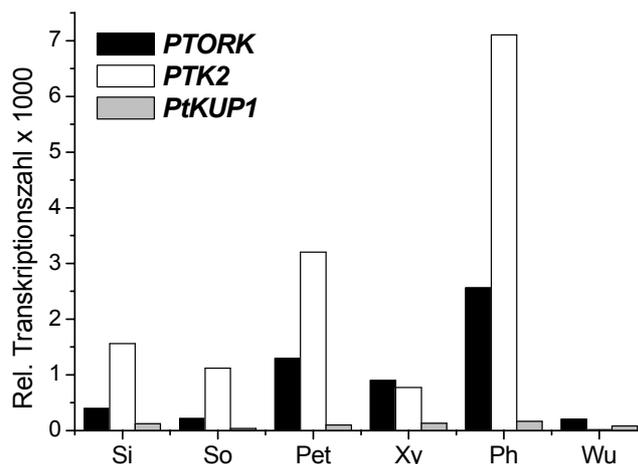
3.5.2 Quantitative Realtime PCR

3.5.2.1 Der Baum *P.tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.

Wie im Northern Blot wurde RNA von „sink“- und „source“-Blättern, Blattstielen, Xylem und Phloem von jungen Zweigen und Wurzeln einer zweijährigen Pappel-Pflanze untersucht. Die quantitative Expressionsanalyse im LightCycler zeigte, wie die Northern Analyse, hohe Expression von *PTORK* und *PTK2* in den Petiolen. Zweifach so hohe und maximale, relative Transkriptmengen von *PTK2* und *PTORK* wies hier jedoch die Phloemangereicherte Fraktion auf (Abb. 30). *PTK2* und *PTORK* waren im Xylem-Kambium-

Gewebe und in Blättern im Vergleich zum Phloem 70 - 90 % geringer exprimiert. In Phloem, Petiolen und Blättern überwog die *PTK2*-Expression. Dagegen wurden im Xylem beide Kanäle gleich hoch exprimiert. In der Wurzel wurde lediglich *PTORK* in sehr geringen Mengen, *PTK2* dagegen überhaupt nicht nachgewiesen. Im Gegensatz zu den beiden Kaliumkanälen war *PtKUP1* in allen untersuchten Geweben in nahezu gleichbleibend geringen Mengen vertreten.

Abb. 30: Expressionsanalyse von *PTORK*, *PTK2* und *PtKUP1* mittels Realtime Quantitativer PCR.



KPT1 konnte nur in Blättern und im Phloem in geringsten Mengen detektiert werden. Die Expression im Blatt ließ im Vergleich mit der schließzellspezifischen Expression des orthologen Kanals *KAT1* in *A. thaliana* eine Lokalisation in der Schließzelle erwarten. Nach quantitativer PCR zeigte *KPT1* in Schließzellen-angereicherter RNA hohe Expressionswerte (Abb. 31 a), die um das Fünffache höher waren, als die von *PTORK* oder *PTK2* (Abb. 31 b). Für *PTORK* wurden in den Schließzellen etwa gleich hohe Expressionswerte wie in der Petiole ermittelt.

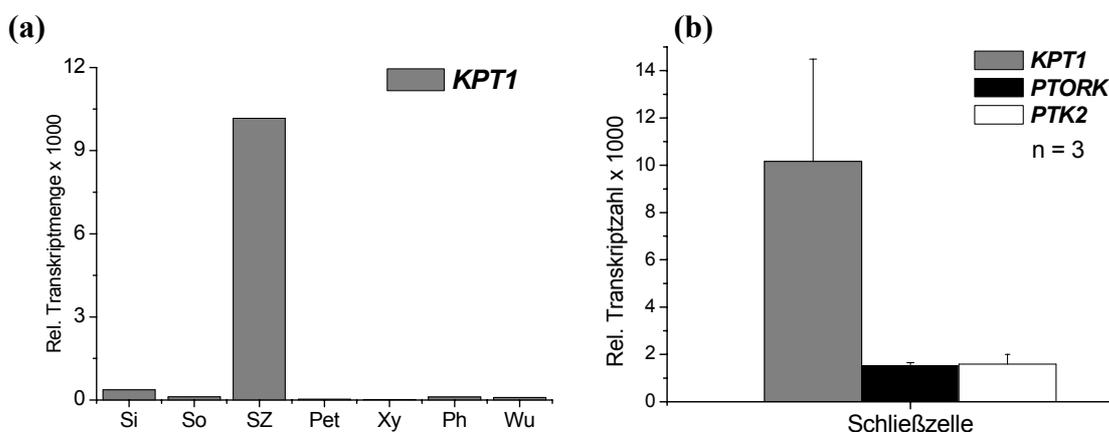


Abb. 31: Expressionsanalyse von *KPT1* und Expressionsmuster in Schließzellen mittels Realtime Quantitativer PCR. (a) Relative Transkriptzahlen von *KPT1* in verschiedenen Geweben. (b) Expression von *KPT1*, *PTORK* und *PtKUP1* in der Schließzelle (SZ).

Die Daten der Northern- und der LightCycler-Analyse ergaben zusammengefasst folgende Expressionsmuster:

	Blatt	Petiole	Xylem	Phloem	Schließzelle	Wurzel
	Northern/ LC	Northern/ LC	Northern/ LC	Northern/ LC	LC	Northern/ LC
<i>PTORK</i>	+/+	+++/>+	++/>+	+++/>+	++	+/+
<i>PTK2</i>	+/+	+++/>+	+/+	++/>+	++	++/-

Tab. 3.1: Lokalisation von *PTORK* und *PTK2* im Vergleich Northern/ LightCycler (= LC). (+) Geringfügiges Vorkommen, (++) mittleres Vorkommen und (+++) starke Präsenz. (-) Nicht vorhanden.

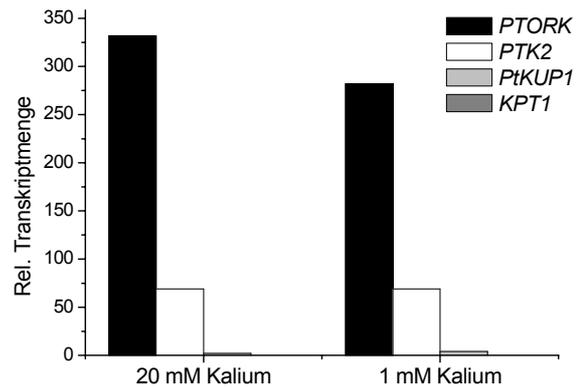
	Blatt	Petiole	Xylem	Phloem	Schließzelle	Wurzel
	LC	LC	LC	LC	LC	LC
<i>KPT1</i>	+	-	-	+	+++	+
<i>PtKUPI</i>	+	+	+	+		+

Tab. 3.2: Lokalisation von *KPT1* und *PtKUPI* nur im LC. (+) Minimales Vorkommen, (+++) starke Präsenz und (-) nicht vorhanden.

3.5.2.2 Suspensionskultur von *P. tremula* x *P. tremuloides*

Die LightCycler Analyse der Suspensionskultur von *P. tremula* x *P. tremuloides* ergab: *PTORK* war am häufigsten vertreten, wenn auch im Vergleich zu den relativen Transkriptzahlen in anderen Pflanzengewebe in sehr geringen Zahlen. *PTK2* wurde zu 80 % geringer exprimiert, *KPT1* konnte nicht detektiert werden und *PtKUPI*, wie in allen bisher untersuchten Geweben, in äußerst geringen Mengen (Abb. 30). Im Vergleich mit der Ausstattung an Kaliumkanälen der *A. thaliana* Zellkultur, die sich wie Wurzelhaarzellen verhält (Ivashikina *et al.*, 2001), deutete sich für die Pappel ein ähnliches Expressionsmuster an. Um den Einfluss der Kaliumversorgung auf die Expression der Transporter zu untersuchen, wurde diese von 20 auf 1 mM reduziert. Diese Änderung zeigte keinen Effekt (Abb. 32 rechts).

Abb. 32: Expressionsanalyse der Suspensionskultur. Die Zellkultur wurde in MS-Medium mit ca. 20 mM Kalium (links) bzw. in einer veränderten Hoagland-Lösung mit nur 1 mM Kalium (rechts) kultiviert. Die Expression der Kaliumtransporter war in beiden Kulturen annähernd gleich.



3.5.3 Klonierung der Promotoren

Die Promotorregionen von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* wurden mit dem Genome-Walker™ Kit (Clontech, vgl. 2.4.7) aus genomischer DNA von Wurzelgewebe isoliert. Mit geeigneten Promotor-GUS-Konstrukten wurden *A. thaliana* Pflanzen transformiert und die Transporter *in vivo* gewebespezifisch nachgewiesen.

3.5.3.1 Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung der genomischen DNA (vgl. 2.3.3) zeigte hochmolekulare DNA mit einer mittleren Größe von ca. 15 kb (Abb. 33). Die Restriktion der DNA mit DraI, Ecl136II, EcoRV und PvuII führte zu einer Verteilung über den gesamten Bereich des Gels, mit einer Häufung zwischen 5 und 15 kb (s. Abb. 33). Für die Isolierung der Promotorregionen wurde so behandelte DNA aufgereinigt.

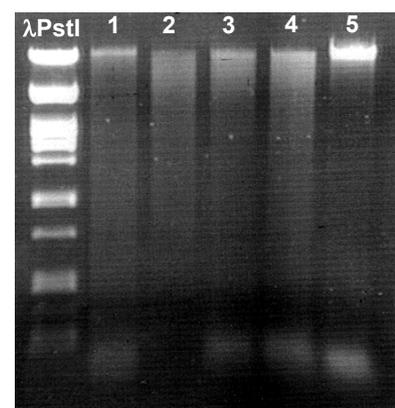


Abb. 33: Genomische DNA. Es wurden gleiche Mengen mit den Restriktionsenzymen DraI (1), Ecl136II (2), EcoRV (3) und PvuII (4) behandelte DNA und ungeschnittene DNA aufgetragen (5). Im Vergleich zur ungeschnittenen Kontrolle (5) waren die Restriktionsprodukte über den Bereich von 5 – 15 kb verteilt

3.5.3.2 Isolierung der Promotoren von *PTORK*, *PTK2*, *PtKUP1* und *KPT1*

Nach Restriktion und Aufreinigung der genomischen DNA wurden an die 5'- und 3'-Enden Adaptoren ligiert (s. 2.4.7). Anschließend konnten Fragmente im 5'-Bereich der

cDNA-Sequenzen über PCR amplifiziert werden (2.4.8.3.3). Nach einer zweiten PCR mit Nested Primern wurden die in Frage kommenden Banden mit einer Länge von mind. 1000 bp eluiert (2.4.10), kloniert (2.4.11) und analysiert (3.4.3.3).

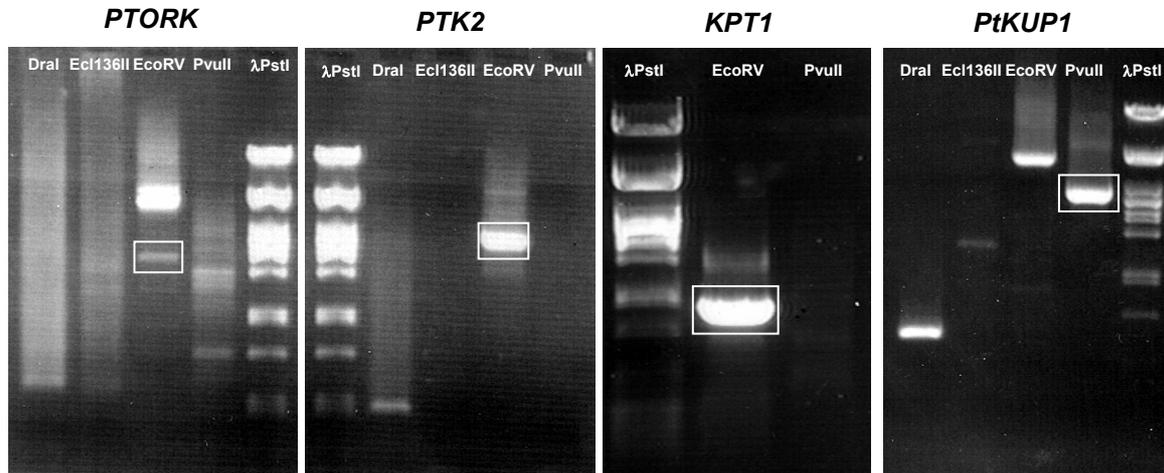


Abb. 34: PCR-Produkte mit genspezifischen Primern für *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* auf vier DNA-Banken. Die Banden, die sich als Promotorregionen heraus stellten, sind weiß eingerahmt.

Folgende DNA-Fragmente, der in Abb. 34 eingerahmten Banden, konnten jeweils als Promotorregion der entsprechenden Kaliumtransporter-Gene identifiziert werden:

- *PTORK* (1,7 kb, s. Abb. 34 *PTORK*, 3. Spur von links),
- *PTK2* (2,5 kb, s. Abb. 34 *PTK2*, 4. Spur von links),
- *KPT1* (1 kb, s. Abb. 34 *KPT1*, 2. Spur von links),
- *PtKUP1* (2,5 kb, s. Abb. 34 *PtKUP1*, 4. Spur von links).

3.5.3.3 Promotor-Sequenzanalysen

Sequenzanalysen der Promotoren und Vergleiche mit bekannten Gen-regulierenden Elementen einer Internet-Datenbank (<http://www.dna.affr.go.jp/htdocs/PLACE/wais.html>, Higo K. *et al.*, 1999) zeigten für alle Promotoren eine ähnliche Zusammensetzung mit den folgenden Signal-Motiven:

- Lichtabhängige Transkription (z. B. -10PEHVPSBD, Thum *et al.*, 2001; DPBF COREDCDC3, Kim *et al.*, 1997; INRNTPSADB, Nakamura *et al.*, 2002; REALPHALGLHC B21, Degenhardt and Tobin, 1996; TATABOX5, Tjaden *et al.*, 1995),

- Gewebespezifische Expression im Leitgewebe (z. B. ASFMOTIFCAMV und GATABOX, Lam *et al.*, 1989; NTBBF1ARROLB, Baumann *et al.*, 1999), in den Schließzellen (TAAAGSTKST1, Plesch *et al.*, 2001) und in den Wurzeln (ROOTMOTIFAPOX1, Elmayan and Tepfer, 1995),
- eine mit dem pflanzenspezifischen Kohlenstoff-Stoffwechsel verbundene Transkription (DOFCOREZM, Yanagisawa, 2000),
- Reaktivierung von Genen während der Pollen- (POLLEN1LELAT52, Bate and Twell, 1998) und Samenreifung (SEFMOTIFGM7S, Allen *et al.*, 1989). Die Promotoren von *PTK2* und *PtKUP1* enthielten dafür mit RYREPEATBNNAPA (Excurra *et al.*, 1999) ein zusätzliches Motiv,
- Induktion durch niedrige Temperaturen (DPBFCOREDCDC3, Kim *et al.*, 1997), in den *PTORK*- und *PTK2*-Promotoren war außerdem noch das LTRE1HVBLT49-Motiv (Dunn *et al.*, 1998) enthalten,
- Transkriptregulationen durch die Hormone Auxin (z. B. ARFAT, Ulmasov *et al.*, 1999), Abscisinsäure (PYRIMIDINEBOXHV, Cercos *et al.*, 1999; fehlte in *PTORK*) und Gibberellinsäure (MYBGAHV, Gubler *et al.*, 1995; fehlte in *KPT1*)
- Trockenstress (MYBCORE, Urao *et al.*, 1993)
- Pathogenabwehr (z. B. WBOXATNPR1, Yu *et al.*, 2001, fehlte in *KPT1*),
- Repression durch Zucker (MYBGAHV, Morita *et al.*, 1998), der *PTK2*-Promotor enthielt zusätzlich TATCCAYMOTIFOSR, Toyofuku *et al.*, 1998).

Die einzelnen Bezeichnungen für die aufgeführten Erkennungssequenzen sind im Anhang 8.4 angegeben.

Die sehr lange Sequenz des isolierten *PtKUP1*-Promotors (2587 bp) unterschied sich durch zusätzliche Motive in Bezug auf die mögliche, zelluläre Bindung des Proteins an Strukturen des Cytoskeletts (z. B. MARABOX1, Gasser *et al.*, 1989) und enthielt, ebenso wie der *PTK2*-Promotor, ein „housekeeping“-Motiv (S1FBOXSORPS1L21, Lagrange *et al.*, 1993).

3.5.3.4 Herstellung von Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten

Die *PTORK*- und *PTK2*-Promotoren wurden zur gewebespezifischen Lokalisation mittels Glucuronidase-Essay in geeignete Vektoren überführt. Nach Überprüfung auf erfolgreiche Insertion in den binären pVKH-GUS Vektor wurden *A. thaliana* Pflanzen transformiert

(vgl. 2.6.1), die reifen Samen geerntet und ausgesät (2.2.1). Nachdem die Pflanzen eine ausreichende Größe erlangt hatten, wurde die Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen (s. 2.2.2 und 3.5.4). Zur Herstellung transgener Pflanzen wurden Agrobakterien des Stamms GV3101 mit den Promotor-GUS-Konstrukten transformiert. Für den *PTORK*-Promotor ergaben sich 20 und für *PTK2* sechs transgene *Arabidopsis* Linien.

3.5.4 Glucuronidase Essay (GUS-Essay)

Die infolge der GUS-Färbung (s. 2.2.2) entstandene Blaufärbung von Blättern, der mit Promotor-GUS-Konstrukten transformierten *Arabidopsis* Pflanzen, zeigte sowohl für *PTORK* als auch für *PTK2* eine Lokalisation im Leitgewebe des Blattes und Blattstiels (Abb. 35 und 36). *PTORK* wurde vorrangig in den Blatt-Hauptadern im Phloem und im Xylemparenchym, das die Gefäße umgab, lokalisiert (Abb. 35).

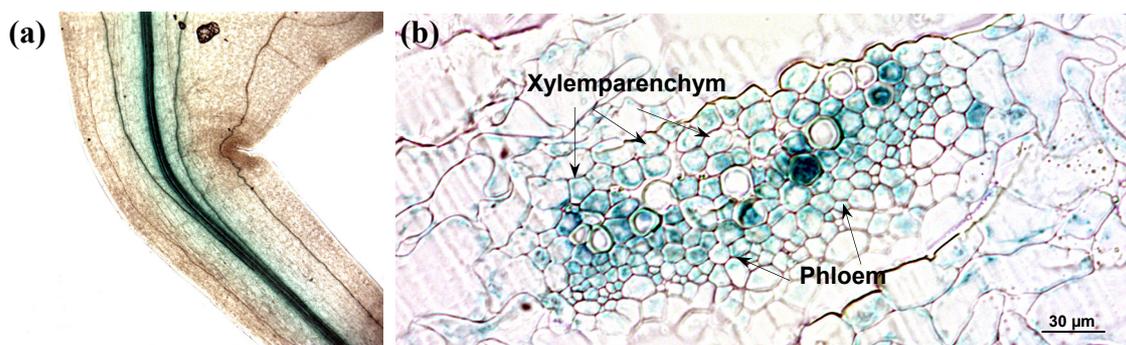


Abb. 35: *PTORK::GUS* Expression im Leitgewebe von Petiole und Blatt. (a) Blattaufsicht im Lichtmikroskop (b) Leitbündel im Querschnitt mit Blaufärbung im Phloem und Xylemparenchym.

Die Aktivität des *PTK2*-Promotors war in *A. thaliana* im Vergleich zu *PTORK* geringer, was sich in einer schwächeren Blaufärbung äußerte. Wie *PTORK*, war *PTK2* im Xylemparenchym und leicht im Phloem der Blatt-Hauptadern bzw. Blattstiele lokalisiert (Abb. 36).

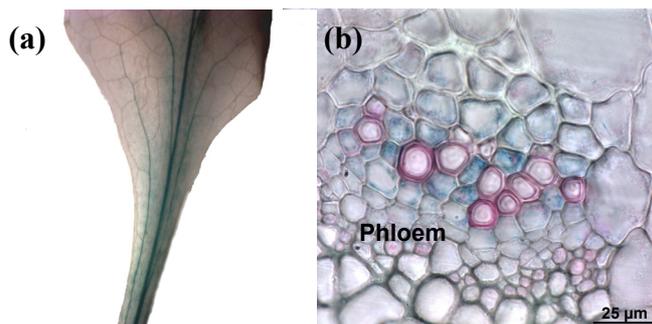


Abb. 36: *PTK2::GUS* Expression im Leitgewebe von Petiole und Blatt. (a) Blattaufsicht im Lichtmikroskop (b) Leitbündel im Querschnitt mit Blaufärbung im Xylemparenchym und Phloem. Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,1 % Safranin.

3.5.5 *In situ* PCR

Auf Dünnschnitten junger Stämmchen und Knospen von Hydrokultur-Pappeln wurde *in situ* PCR durchgeführt. Die *PTK2*-mRNA wurde als schwarz-violettes Präzipitat im Phloem junger Stämmchen und in den Blattspreiten embryonaler Blätter von apikalen Knospen nachgewiesen (Abb. 37 a und c).

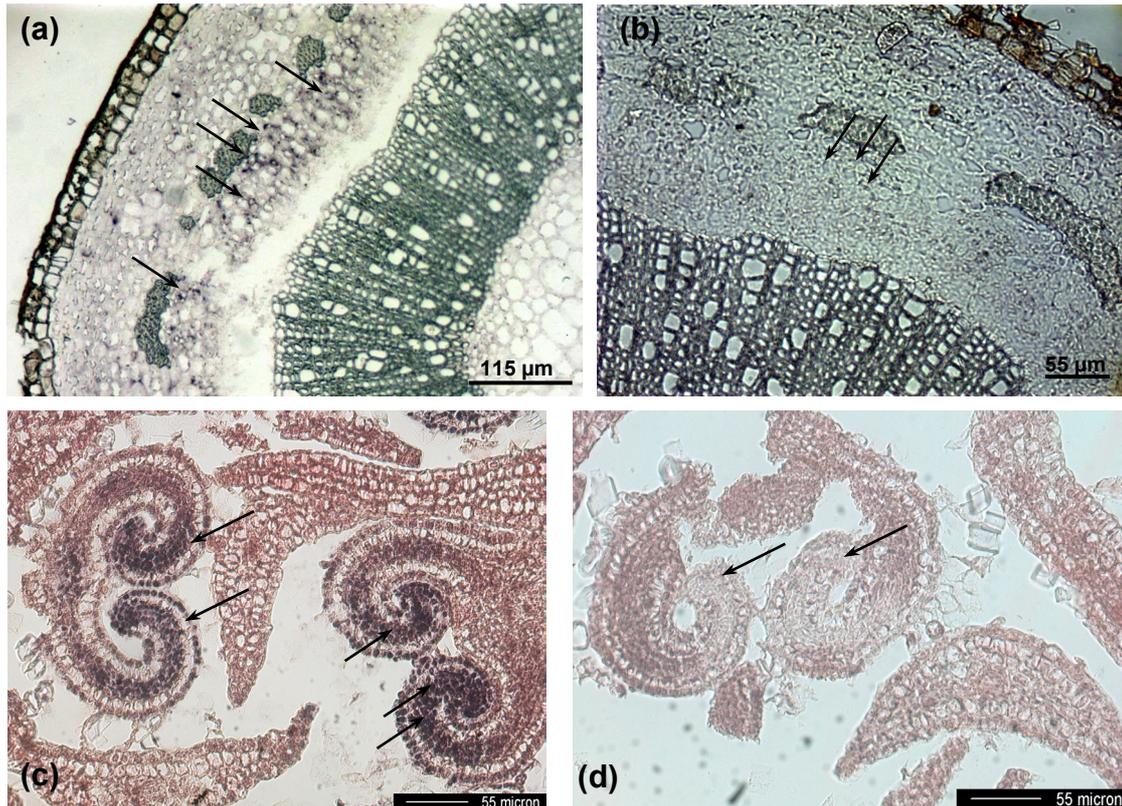


Abb. 37: Dünnschnitte von *P. tremula* x *P. tremuloides* Stämmchen und Knospen nach *in situ* PCR mit *PTK2* Primern und NBT/BCIP Färbung. (a) Stammquerschnitt mit *PTK2*-Signalen im Phloem. (b) Kontrolle ohne RT. (c) *PTK2*-Signale in Blattspreiten embryonaler Blätter auf einem Querschnitt einer apikalen Blattknospe. (d) Kontrolle ohne RT.

3.5.6 Immunologischer Nachweis mit PTORK- und PTK2-Antikörpern

Für immunologische Nachweise der Pappel-Kanalproteine PTORK und PTK2 wurden geeignete Sequenzen für die Antikörper-Synthese gewählt. Die Proteinlokalisierung wurden von C. Wind, Institut für Holzforschung, Technische Universität München, im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt (Wind, 2003). Sowohl PTORK als auch PTK2 waren in Übereinstimmung mit der Expressionsanalyse überwiegend im Leitgewebe der Pappel, speziell im Phloem und in Strahlzellen lokalisiert.

PTORK konnte im parenchymatischen Phloem, in Siebröhrenzellen, jungen, sich differenzierenden Fasern und in Holzstrahlzellen detektiert werden. Dort, wo Holzstrahlen in direktem Kontakt zu Gefäßen standen (Kontaktzellen), war während des aktiven Holzwachstums eine polare Anordnung der Signale zu den Gefäßen hin zu beobachten (Wind, 2003).

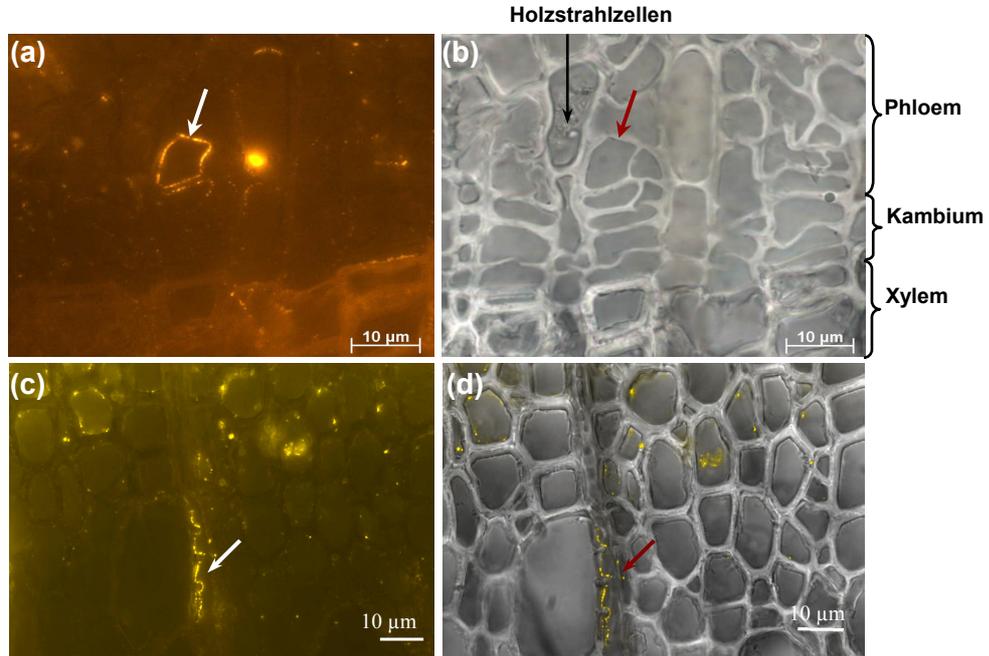


Abb. 38: Immunohistochemische Lokalisation des Kaliumkanals PTORK im Phloem des Pappelhybrids *P. tremula x P. tremuloides* im Fluoreszenzmikroskop. (a) Spezifische Markierung einer Siebröhrenzelle. (b) Gleicher Ausschnitt des Stammquerschnitts im Lichtmikroskop. (c) und (d) Polare Anordnung der PTORK-Signale in Holzstrahlen zu einem Gefäß.

PTK2 wurde, wie PTORK, in Strahlzellen, sowohl auf der Bast- als auch auf der Holzseite, jedoch ohne erkennbare Polarität lokalisiert (Abb. 39, persönliche Mitteilung C. Wind). Darüber hinaus wurden mit dem PTK2-Antikörper auch Phloemparenchymzellen markiert. Eine Markierung kambialer Zellen wurde mit diesem Antikörper nicht beobachtet.

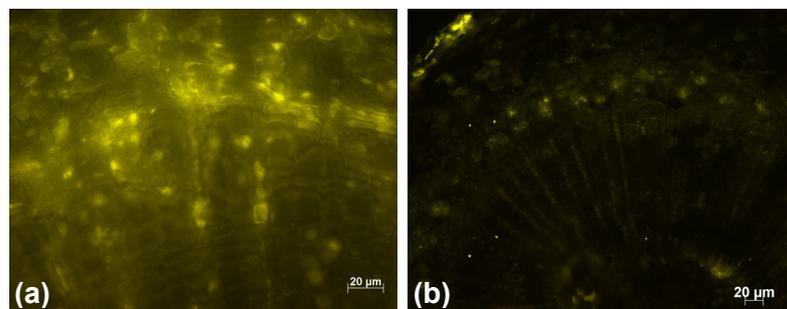


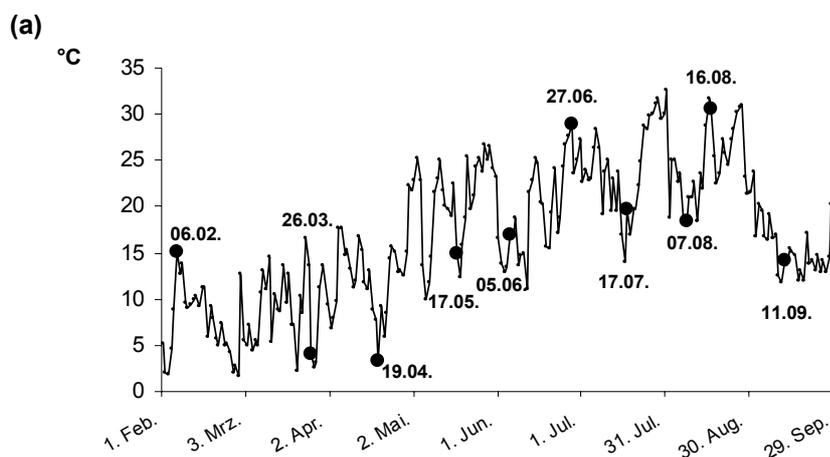
Abb. 39: Immunohistochemische Lokalisation des Kaliumkanals PTK2 im Fluoreszenzmikroskop. (a) Spezifische Markierung von Phloemzellen. (b) Kontroll-Anfärbung ohne Signale mit Prä-immunserum-abgesättigtem Antikörper.

3.6 Regulation

Die Regulation der Kaliumtransporter wurde vorrangig unter baumspezifischen Aspekten erforscht. Es wurde geprüft, ob sich einerseits die saisonal bedingte Aktivierung des Kambiums in Frühling und Sommer und damit die jahreszeitabhängige Holzbildung, andererseits die Ruhephase in Herbst und Winter, auch in der Expression der Kaliumkanäle bzw. des Transporters widerspiegeln. Als weiteres baumspezifisches Phänomen wurde die Entwicklung der Blattknospen von der Anlage bis zur Öffnung mit den Expressionen von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* verglichen. Aufgrund der Identifikation von Signalsequenzen in den Promotorregionen mit Bezug zur licht- und hormonabhängigen Regulation wurde in ersten Experimenten der Einfluss von Licht, ABA, Auxin und Salzstress auf die Pappeltransporter untersucht.

3.6.1 Jahrgang Stamm

Über einen Zeitraum von einem Jahr (2001) wurden alle zwei bis vier Wochen Zweigstücke von einer zu Beginn zweijährigen Pappel gesammelt, die den natürlichen Klimabedingungen ausgesetzt war. Von Juli bis August wurde die RNA des Xylems und Phloems angereichert und mittels quantitativer PCR ausgewertet (Abb. 40 b). Von September bis Juni ließen sich Xylem und Phloem nicht trennen, so dass RNA kompletter Stämmchen für die Expressionsanalyse verwendet werden musste. Um mögliche Zusammenhänge zwischen Transkriptzahlen und Temperaturschwankungen zu erkennen, wurden jeweils die örtlichen Mittags-Temperaturen (jeweils 12.00, <http://www.wetterstation-wuerzburg.de/wetter-historie.htm>) den Expressionsdaten gegenüber gestellt (Abb. 40 a).



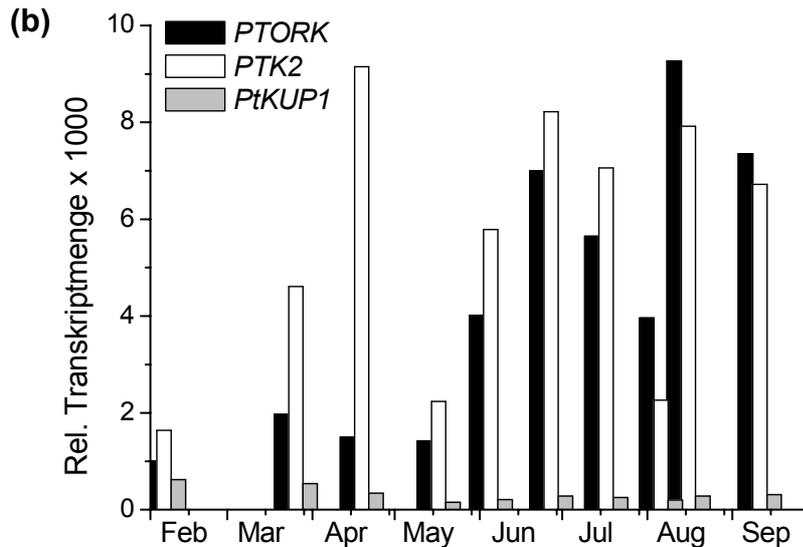


Abb. 40: Expressionsanalyse von *PTORK*, *PTK2* und *PtKUP1* im Pappelstamm während des Jahres 2001. (a) Temperaturprofil über den gesamten Zeitraum, im Diagramm sind jeweils die Datumsangaben der Probenahmen hervorgehoben und eingetragen. (b) Saisonale Änderungen der Kaliumtransporter-Transkripte im Stamm.

Der Kaliumtransporter *PtKUP1* war im Gegensatz zu den Kaliumkanälen *PTORK* und *PTK2*, die um ein Vielfaches höher exprimiert waren, das ganze Jahre hindurch auf vielfach niedrigerem Niveau präsent. Vor der Aktivierung des Kambiums im Frühling waren *PTORK* und *PTK2* ebenfalls niedrig exprimiert (s. Februar, Abb. 40 b). Die Transkriptmengen der Kaliumkanäle wurden aber während der Zeit der umfangreichsten Holzbildung von Juni bis August auf das Drei- bis Fünffache gesteigert. Die Induktion von *PTORK* setzte im Vergleich zu *PTK2* auffälligerweise erst drei Monate später ein. Zeitgleich mit der kambialen Reaktivierung erreichte *PTK2* seine maximale Expression bereits im April und zeigte im Mai sowie Anfang August vorübergehend wieder niedrige Werte. Das Absinken der Expression von *PTK2* auf etwa 1/3 des zweiten Juni-Wertes (29°C) Anfang August (s. Abb. 40 b) wurde von einer Temperaturabnahme um 10°C begleitet. Im gleichen Zeitraum wurde auch *PTORK* um ca. 50 % reprimiert (Abb. 40 b). Zur August-Mitte stiegen die Temperaturen noch einmal auf 30°C an. Parallel dazu wurden beide Kaliumkanäle innerhalb von 10 Tagen auf mehr als das Doppelte induziert und *PTORK* erreichte maximale Transkriptmengen für 2001 (s. Abb. 40 b). Bemerkenswert erschien die Tatsache, dass *PTK2* von Februar bis Juli immer zahlreicher als *PTORK* vorhanden war, dagegen ab Spätsommer/Anfang August der auswärtsgerichtete Kanal *PTORK* überwog.

Diese Daten lieferten Hinweise, dass die Expressionsmuster von *PTK2* und *PTORK* mit saisonal bedingten Abläufen des Kambiums bzw. Temperaturschwankungen korrelierten. Nach Einzelauswertung von *PtKUP1* und unter Berücksichtigung seiner allgemein niedrigeren Expression, wurden auch für diesen Transporter Änderungen der Expression im Stamm deutlicher (Abb. 41). Im Gegensatz zu den Kanälen erreichte *PtKUP1* im Winter und zeitigem Frühling etwa zwei- bis dreifach so hohe Transkriptzahlen wie zu den restlichen Jahreszeiten.

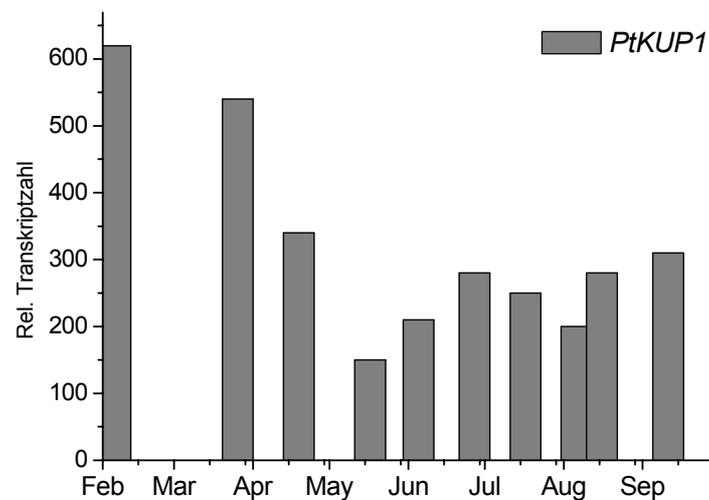


Abb. 41.: *PtKUP1*-Expressionsanalyse im Stamm des gleichen Zeitraums wie in Abb. 40, mit anderer Skalierung.

3.6.2 Blattknospen

3.6.2.1 Jahresgang

Von zwei- und vierjährigen Pappeln, die unter Freiland-Bedingungen im Botanischen Garten der Universität Würzburg wuchsen, wurden 2002 und 2003 Knospen in zwei- bis vierwöchigen Abständen gesammelt. Die Transkriptmengen der Pappel-Transporter wurden mittels quantitativer PCR ermittelt und sind in den Abbildungen 42 (a) und (b) gegen die Zeit aufgetragen. Im April/Mai öffneten sich die Knospen und die Blätter entfalteteten sich. Von da an dauerte es ca. einen Monat bis neue Knospen angelegt waren, die dann wieder in regelmäßigen Abständen von zwei bis vier Wochen bis zur Winterruhe gesammelt wurden.

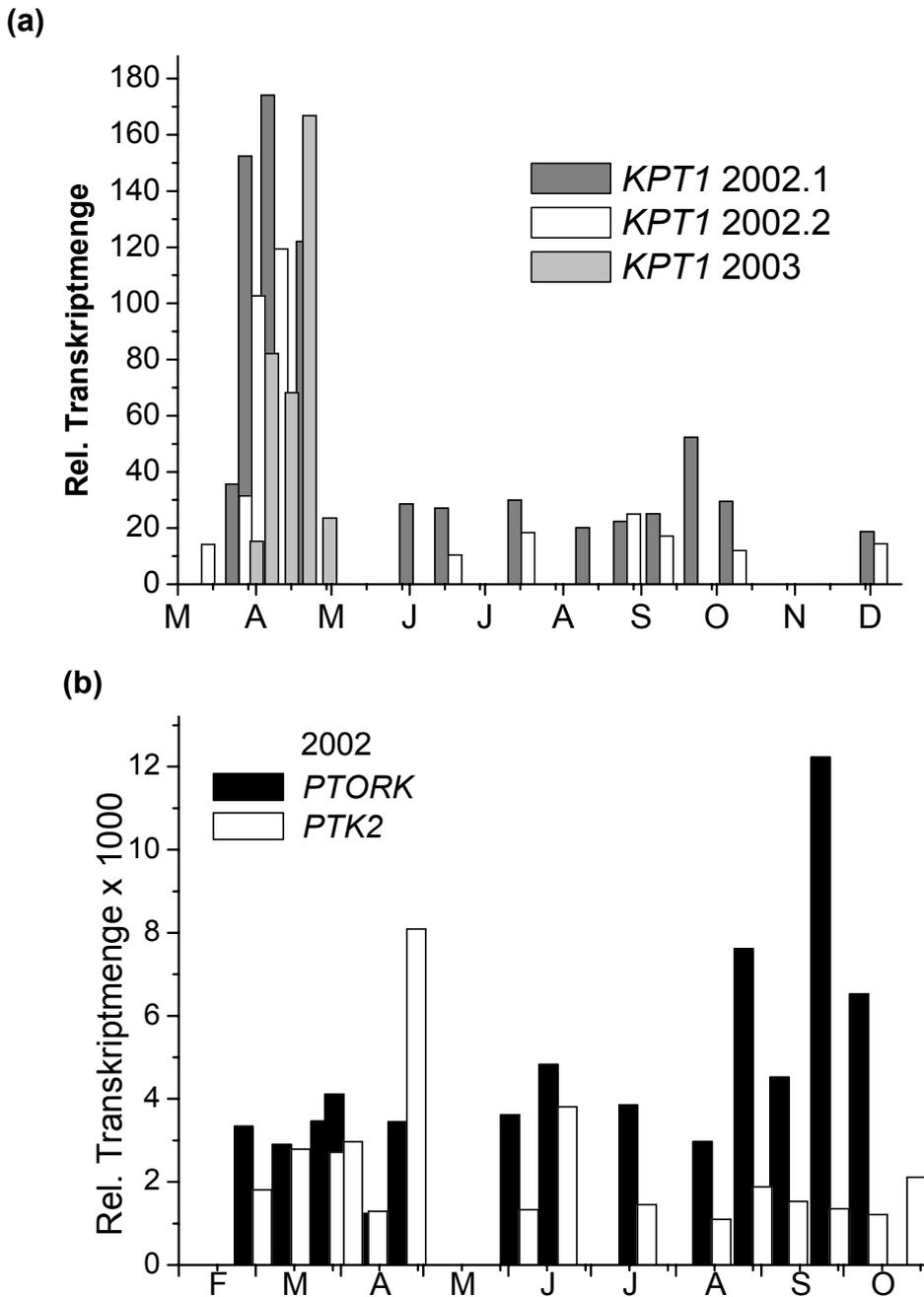


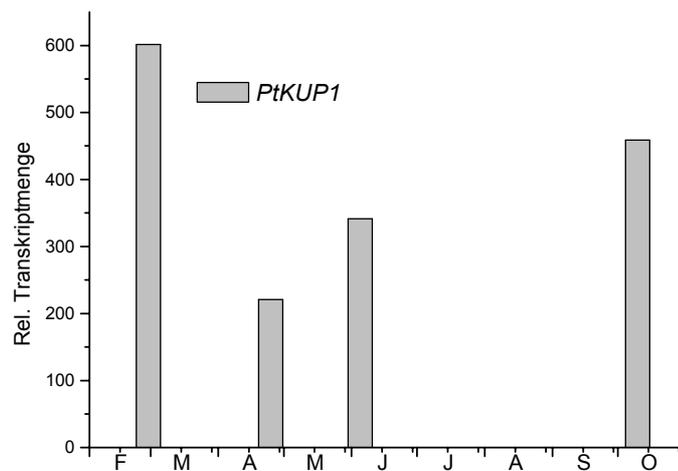
Abb. 42: Expressionsanalyse von *KPT1*, *PTORK* und *PTK2* in Knospen (2002 und 2003). (a) und (b) Saisonale Änderungen der Kaliumkanal-Transkripte *PTORK*, *PTK2* und *KPT1* in den Knospen.

Der hauptsächlich in Schließzellen lokalisierte *KPT1* wurde transient zur Knospenöffnung innerhalb eines kurzen Zeitfensters auf 6-fache Transkriptwerte induziert, im Vergleich zur restlichen Jahreszeit (Abb. 42 a). Insgesamt deutlich höhere Werte wurden für *PTORK* und *PTK2* (s. Skalierungen Abb. 42 a und b) ermittelt. Eine Regulations während der Blattknospenentwicklung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die *PtKUP1*-Transkripte wurden aus vier Knospen-Proben, jeweils im Winter, Frühling, Sommer und Herbst, ermittelt. Im Gegensatz zu den drei Kaliumkanälen wurde, wie schon

im Stamm, die höchste Transkriptzahl im Winter bestimmt, während die Expression im Frühling auf etwa ein Drittel des Maximalwertes abfiel (Abb. 43).

Abb. 43: Expressionsanalyse von *PtKUP1* in Knospen zu den vier Jahreszeiten (2002).



3.6.2.2 Künstliche Knospenreifung

Zweige mit Knospen wurden nach einer Frostperiode, Ende Februar, vom Baum abgeschnitten und solange unter Langtagbedingungen in der Klimakammer in Hydrokultur gehalten, bis sich die Blätter entfalteten. Während dieser Zeit wurden Knospen in drei äußerlich unterschiedlichen Entwicklungsstufen (s. Abb. 44) geerntet:

- 1) „Ruhestadium“: die Knospen waren braun und vollkommen geschlossen,
- 2) „früh aktives Stadium“: die Knospen sind bereits grün gefärbt, waren aber immer noch vollständig geschlossen und
- 3) beim „Öffnen der Knospen“.

Die Expression von *KPT1* wurde in drei unabhängigen Proben quantitativ bestimmt. Wie unter natürlichen Bedingungen (vgl. 3.6.2) wurde *KPT1* mit fortschreitendem Schwellen der Knospen induziert und erreichte zur Knospenöffnung maximale Transkriptwerte (Abb. 44). Da *KPT1* während der Knospenöffnung nur innerhalb eines sehr kurzen Zeitabschnitts induziert wurde (vgl. Abb. 42), war es schwierig den richtigen Zeitpunkt für die Probenahme des dritten Stadiums zu treffen. Dies spiegelte sich in der Größe des Standardfehlers wider.

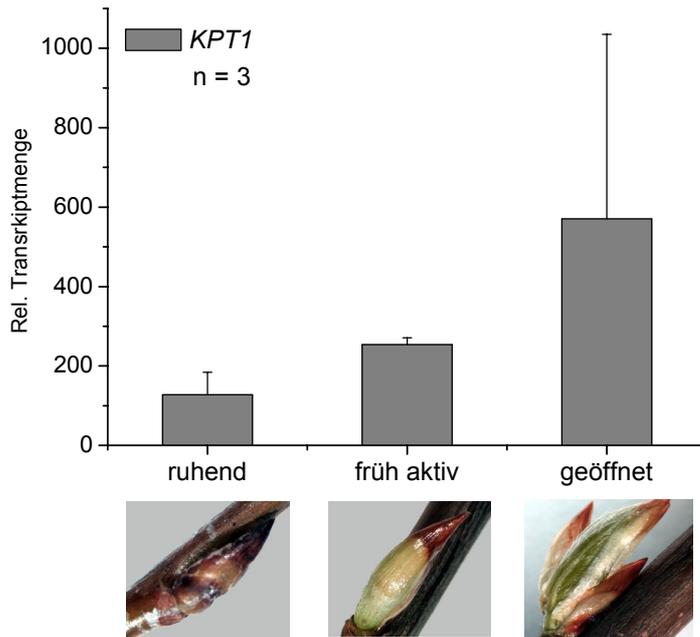


Abb. 44: *KPT1*-Expression während künstlicher Knospenreife. (n = 3 +/- SE).

3.6.3 Licht

Aufgrund von identifizierten Signalmotiven zur lichtabhängigen Expression sowie Regulationen durch Hormone und Salzstress (vgl. 3.5.3.3) wurden in ersten Experimenten der Einfluss von Licht, ABA und Salzstress auf die Expression der isolierten Pappel-Kaliumtransporter untersucht.

Im Langtag gehaltene Hydrokultur-Pappeln wurden unterschiedlich belichtet. Die RNA aus Petiolen und Hauptadern wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Die Entnahme der Licht-Proben erfolgte um 14.00 (das entsprach einer Lichtdauer von 8 h) und die der Dunkel-Proben um 2.00 (4 h Dunkelheit). Zusätzlich wurde eine Hydrokulturpflanze mittags um 12.00 für 2 h verdunkelt. Abbildung 45 zeigt die Expressionswerte für *PTORK* und *PTK2*, dargestellt als relative Transkriptzahlen (a) oder prozentual, bezogen auf die Dunkelprobe (b).

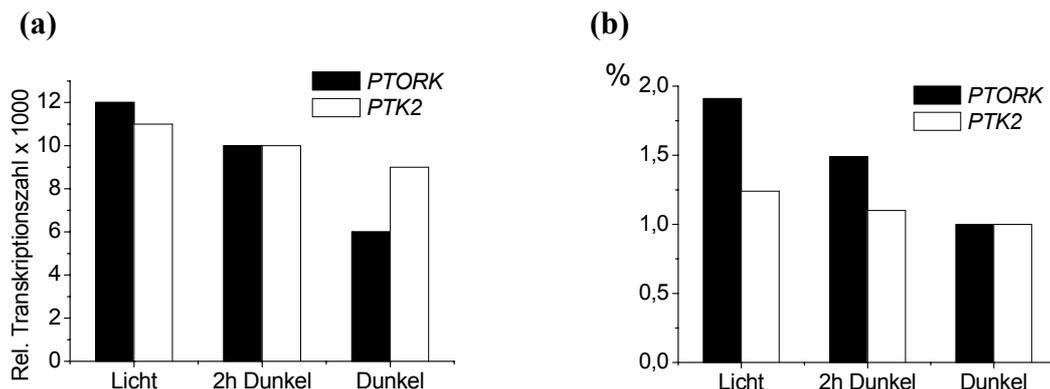


Abb. 45: Expression von *PTORK* und *PTK2* in Petiolen und Blatthauptadern nach unterschiedlicher Belichtung. (a) Relative Transkriptzahlen von *PTORK* und *PTK2* nach 8 h Licht, 2 h und 4 h Dunkelheit. (b) Gleiches Experiment in % angegeben und auf die Dunkelprobe bezogen.

Während *PTK2* bezüglich Licht keinen Effekt zeigte, sank die *PTORK*-Expression bereits nach 2 h leicht und reduzierte sich auf etwa die Hälfte der Transkriptwerte der Lichtexpression nach 4 h Dunkelheit. Dies deutete darauf hin, dass *PTORK* lichtabhängig reguliert wurde oder einem Tag/Nacht-Rhythmus unterlag.

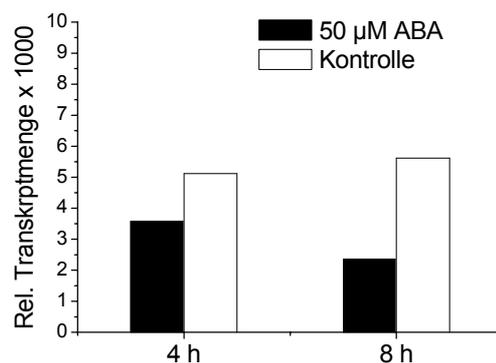
3.6.4 Hormone

Von Stämmchen junger Hydrokultur-Pappeln wurden Blätter, Blattstiele und Wurzeln abgetrennt. Die in ca. 0,5 bis 1 cm Stücke zerteilten Stämmchen wurden in Lösungen mit und ohne Hormone für zwei, vier bzw. acht Stunden inkubiert und regelmäßig geschwenkt (vgl. 2.1.5.3 und 2.1.5.6). Anschließend wurden von allen Proben Expressionsanalysen mittels quantitativer PCR durchgeführt und grafisch ausgewertet.

3.6.4.1 Abscisinsäure

Nach einem ersten Experiment, in denen Stämmchen in Abscisinsäure inkubiert wurden, deutete sich an, dass *PTK2* durch ABA reprimiert wurde (Abb. 46 a). So verringerte sich die Expression im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 4 h und reduzierte sich nach 8 h auf weniger als die Hälfte.

Abb. 46: Einfluss von ABA auf die Expression von *PTK2* im Stamm. (a) Relative Transkriptmengen von *PTK2* nach 4 bzw. 8 h ABA-Behandlung. (b) Analoge Analyse für *PTORK*.



3.6.4.2 Auxin

KPT1 wurde im Stamm allgemein nur sehr niedrig exprimiert (vgl. 3.5.2.1). Nach Auswaschen des internen Auxins durch eine leicht saure, gepufferte 10 mM KCl-Lösung wurde der Kanal stark induziert (Abb. 47). Nach Zugabe von 10 µM 1-NAA fiel die Expression

wieder auf den Anfangswert zurück (Abb. 47). Dies deutete, zumindest im Stamm, auf eine Auxin-Repression von *KPT1* hin.

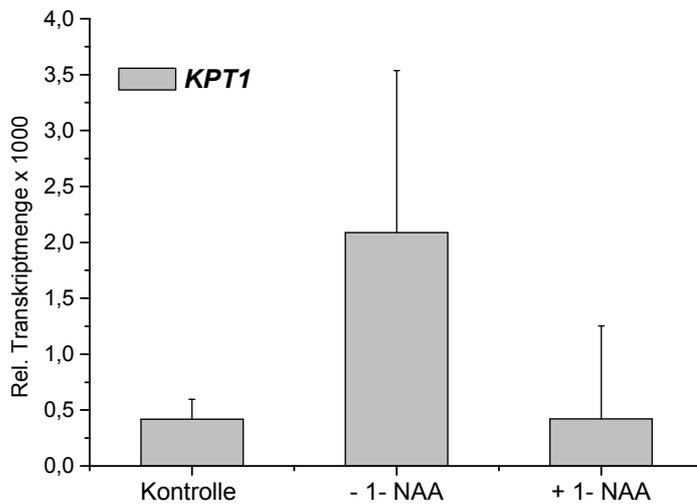


Abb. 47: *KPT1*-Expression in jungen Stämmchen nach 1-NAA-Behandlung. (n = 5 +/-SD).

3.6.5 Salzstress

Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurden Hydrokulturpflanzen einem Salzstress (100 mM NaCl) ausgesetzt. Nach 1, 6 und 15 Tagen wurden jeweils ein bis drei Blätter und nach 15 Tagen die kompletten Stämmchen geerntet. Im Gegensatz zu *PtKUP1*, dessen Transkriptzahlen mit und ohne Salzstress nahezu identisch waren, verringerte sich die *PTORK*-Expression im Stamm um 50 % nach 15 Tagen Salzstress (Abb. 48 a). Noch deutlicher verminderte sich die *PTORK*-Transkriptzahl in den Blättern (Abb. 48 b), so reduzierten sich die Transkripte auf etwa 1/8 des Wertes 15 Tage nach Zugabe von 100 mM NaCl. Die niedrigeren Expressionswerte deuteten auf eine Repression von *PTORK* durch Salzstress hin.

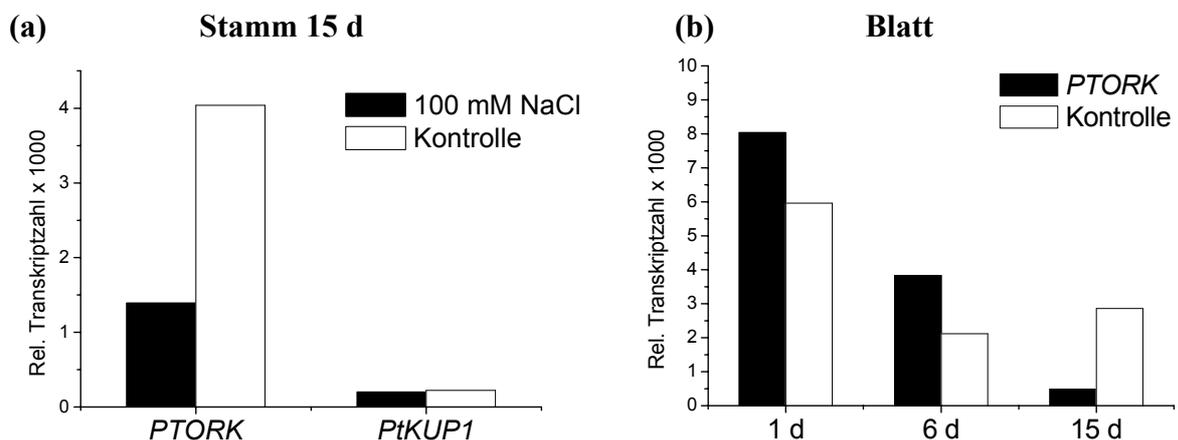


Abb. 48: Expressionsanalyse von *PTORK* und *PtKUP1* nach Zugabe von 100 mM NaCl.

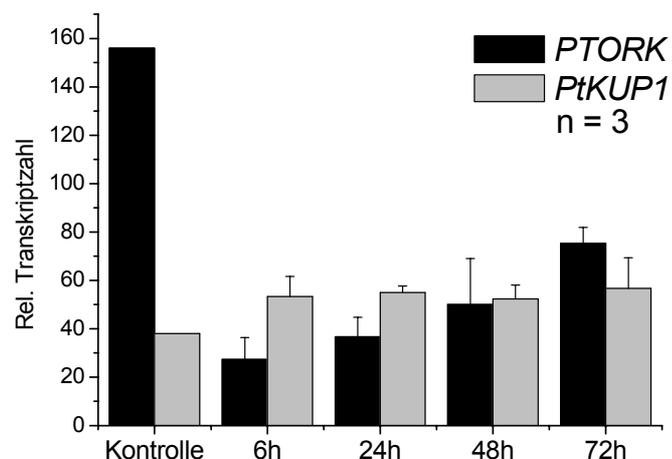
(a) Rel. Transkriptzahlen von *PTORK* und *PtKUP1* in jungen Stämmchen nach 15 Tagen Salzstress. Die Kontrollen sind jeweils weiß dargestellt. (b) Rel. Transkriptmengen von *PTORK* in Blättern salzgestresster Hydropflanzen nach 1, 6 und 15 Tagen mit der entsprechenden Kontrolle.

3.6.6 Salzstress - Zellkultur

Die Pappel-Suspensionskultur bestand sowohl aus ungleich großen Zellhaufen als auch aus Einzelzellen. Daher konnten keine Aussagen zu eingesetzter Zelldichte bzw. Zellzahl getroffen werden. Die einzelnen Suspensionskulturen wurden so gut wie möglich gleichbehandelt. Es wurden gleiche Volumina Kultur mit gleichen Anteilen Testlösungen in identischen Kolben geschüttelt.

Die mit nur 1 mM K^+ kultivierte Suspensionskultur aus oberirdischem Sprossgewebe wurde für 48 h mit Hoagland-Lösung versetzt, die zusätzlich 300 mM Natrium enthielt. Nach jeweils 6, 24 und 48 h wurden Proben genommen. 48 h nach Beginn des Salzstresses wurde die Zellkultur wieder in das ursprüngliche Erhaltungsmedium mit 1 mM K^+ überführt. Nach weiteren 24 h (72 h nach Beginn des Experiments) wurden wiederum Proben entnommen und die *PTORK*- bzw. *PtKUP1*-Transkripte mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Kontrollen entsprachen den Expressionen von *PTORK* bzw. *PtKUP1* in der Kultur vor Beginn des Salzexperiments. *PTORK* wurde, wie in Blatt und Stamm, auch in der Suspensionskultur durch Salz reprimiert (Abb. 49). *PtKUP1* reagierte dagegen nicht.

Abb. 49: Rel. Transkriptzahlen von *PTORK* und *PtKUP1* in Suspensionskultur nach Zugabe von 300 mM NaCl. *PTORK* (schwarz) wurde reprimiert, *PtKUP1* (grau) dagegen nicht, (n = 3 +/- SD).



3.6.7 Zusammenfassung Regulation

Die Expressionsanalysen zur Regulation der Pappel-Kaliumtransporter lassen sich wie folgt zusammenfassen:

	<i>PTORK</i>	<i>PTK2</i>	<i>KPT1</i>	<i>PtKUPI</i>
Jahresgang:	Sommer und Herbst	Frühjahresanfang	/	Winter
Stamm	(+++)	transient (+++) und Sommer (+++)		(+)
Jahresgang:	September bis Oktober	Knospenöffnung	Knospenöffnung	Winter
Knospe	(++)	(+++)	(+)	(+)

Tab. 3.3 Regulation von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUPI* im Jahresverlauf. (+) Minimale, (++) mittlere und (+++) maximale Induktion.

	<i>PTORK</i>	<i>PTK2</i>	<i>KPT1</i>	<i>PtKUPI</i>
Licht	(+)	NR	/	NR
ABA	(-)	(-)	NR	NR
Auxin	NR	NR	(-)	NR
Salz	(-)	NR	NR	NR

Tab. 3.3 Einfluss von Hormonen und Salz auf die Regulation von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUPI*. (-) Repression, (+) Induktion, NR = Nicht Reguliert.

4. Diskussion

Zellteilung und -streckung sind kaliumabhängige Prozesse (Philippar *et al.*, 1999) und speziell in Bäumen beeinflusst Kalium, zusammen mit Magnesium und Calcium, kambiale Zellteilungen und Differenzierungsprozesse (z. B. Larson, 1967; Wardrop, 1981; Eklund and Eliasson, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Pflanzen, die ausreichend mit Kalium versorgt wurden, die Streckung der Gefäß-Initialzellen unter kaliumlimitierenden Bedingungen früher abgeschlossen war und auch die Auflagerung sekundärer Wandschichten zeitiger einsetzte. Aufgrund abnehmender Gefäßweiten verringerte sich die Zone der sich streckenden Xylemzellen und zusätzlich fehlten in der sich differenzierenden Holzzone zwei bis vier Zellschichten. Die Abnahme der Zellzahl der holzbildenden Zone hat, ebenso wie die eingeschränkte Zellstreckung, vermindertes Holzwachstum zur Folge. Der gleiche Effekt auf die Gefäßweiten wurde durch lokal begrenzte Applikation des Kaliumkanal-Blockers TEA⁺ erzielt. Dies deutete auf eine wichtige Rolle der Aktivität von Kaliumkanälen bei der Holzbildung hin (siehe auch Langer *et al.*, 2002) und belegte den Befund, dass die Kaliumversorgung einen starken Einfluss auf die Entwicklung der holzproduzierenden Zellen ausübt (Arend, 2001).

Eschrich *et al.* (1988) und Fromm *et al.* (1987) wiesen mittels EDXA und Perkolationsanalysen erhebliche, saisonal bedingte Kaliumverschiebungen nach. So werden zu Beginn der Wachstumsperiode im Frühling beträchtliche Mengen von Kaliumionen aus den lebenden, speichernden Holzparenchym- und Strahlzellen zu den meristematischen Geweben des Kambiums in Stamm und Blattachsen transportiert. Im Herbst dagegen, mit Einsetzen der Ruheperiode, kehrt sich die Richtung des Kaliumflusses um und Kalium wird aus den Blättern in die Speichergewebe des Holzes in Stamm und Zweigen befördert. Die hierbei auftretenden Membran-Übertritte der Kaliumionen werden von integralen Transportproteinen, den Kanälen und Carriern, vermittelt.

Da über die molekularen Mechanismen des Kaliumtransports in mehrjährigen Pflanzen und der kaliumabhängigen Holzbildung noch wenig bekannt war, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die zugrunde liegenden Transportwege untersucht werden. Expressionsmuster und (elektro-) physiologische Charakteristika der beteiligten Kaliumtransporter sollten mit der saisonabhängigen Aktivität des Kambiums im Stamm und der Holzbildung verknüpft werden. Als weitere baumspezifische Besonderheit, mit Übergängen von Ruhephasen im Herbst/Winter und Reaktivierungsprozessen im Frühling, wurden Blattknospen

im Hinblick auf die Expression von Kaliumtransportern untersucht, die in der jahresabhängigen Blattknospenentwicklung eine Rolle spielten. Neben dem bereits klonierten Kaliumeffluxkanal *PTORK* konnten aus der Pappel zwei weitere Kaliumkanäle, ortholog zu den *Arabidopsis* Kanälen *AKT2/3* und *KAT1*, sowie ein Kaliumtransporter der *KT/KUP/HAK*-Familie isoliert und funktionell charakterisiert werden. Mit *in situ* Techniken wurden mRNA und Proteine der Transporter im Leitgewebe lokalisiert. Dies konnte in heterologen Promotor-Reporterstudien bestätigt werden. Für die Kanalgene *PTK2* und *PTORK* konnte eine transkriptionelle Korrelation mit der jahresabhängigen Aktivitätsänderung des Kambiums im Stamm und für *KPT1* in den Blattknospen nachgewiesen werden.

4.1 Die cDNA-Moleküle *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1*

Die vollständigen cDNA-Moleküle *PTK2* und *PtKUP1* wurden aus Geweben des Phloems, Kambiums und Xylems eines einjährigen Pappelstammes isoliert. Dagegen wurde die cDNA des K^+ -Kanals *KPT1* aus sich teilendem, oberirdischem Sprossgewebe gewonnen. Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden *PTK2* und *KPT1* als Untereinheiten pflanzlicher Kaliumkanäle des *Shaker*-Typs identifiziert. Dabei konnte *PTK2* der *AKT2/3*-Unterfamilie zugeordnet werden und *KPT1* dem *KAT1*-Subtyp (s. Abb. 18). Funktionelle Kaliumkanäle des *Shaker*-Typs sind Tetramere und weisen pro Untereinheit eine Porenregion und sechs transmembrane Bereiche auf (Uozumi *et al.*, 1998). Die Transmembranen fünf und sechs umgeben die Porenregion, während die vierte membran-durchspannende Domäne als Spannungssensor fungiert. Die *KPT1*-Aminosäuresequenz wies eine Besonderheit innerhalb der *KAT1*-Unterfamilie auf. So verfügte *KPT1* C-terminal über eine möglicherweise regulatorische Ankyrin-Domäne, die bislang nur in den Unterfamilien *SKOR*, *AKT1* und *AKT2/3* identifiziert wurde. Im Gegensatz zu den Mitgliedern dieser Unterfamilien, die oft sechs Wiederholungen dieser Sequenz zeigen, umfasste die Aminosäuresequenz von *KPT1* nur eine putative Ankyrin-ähnliche Domäne. Lediglich der orthologe *SIRK* aus *Vitis vinifera* weist als *KAT1*-artiger Kanal dieses Sequenz-Motiv auf. Da es sich hier ebenfalls um eine mehrjährige Pflanze handelt, ist zu vermuten, dass diese mögliche Interaktion mit dem Cytoskelett eine besondere Funktion bei den *KAT1*-Kanälen holziger Pflanzen hat. Das allen pflanzlichen Kaliumkanälen gemeinsame Sequenzmotiv einer putativen Bindestelle für cyclische Nukleotide im C-Terminus wurde auch für *PTK2* und *KPT1* nachgewiesen (Abb. 17), genauso wie die nahe dem Stoppcodon lokalisierte, konservierte Domäne, die durch Anhäufung hydrophober und saurer Amino-

säuren charakterisiert ist. Vermutlich sind diese Sequenzbereiche zur Aggregation der Tetramere der Kanäle notwendig (Daram *et al.*, 1997 und Ehrhardt *et al.*, 1997).

PtKUP1 wurde der KT/KUP/HAK-Familie zugeordnet. Die Vertreter dieser Familie ähneln bakteriellen \underline{K}^+ uptake Transportern (KUP's, Schleyer and Bakker, 1993) und high-affinity \underline{K}^+ Transportern aus Pilzen (HAK, Banuelos *et al.*, 1995; Haro *et al.*, 1999). Die KT/KUP/HAK-Transporter lassen sich ebenfalls in Unterfamilien einteilen (Abb. 21). PtKUP1 war AtTrh1, AtKT3/KUP3 und HvHAK2 am ähnlichsten. Entsprechend konnten 12 putative, transmembrane Bereiche identifiziert werden (Abb. 20). Ob sich diese Transporter, wie die *Shaker*-Kanäle, ebenfalls aus vier, mehr oder weniger Untereinheiten funktionell zusammensetzen, ist bislang noch ungeklärt. Über einen möglichen Selektivitätsfilter, vergleichbar mit dem GYGD-Motiv in der Porenregion pflanzlicher K^+ -Kanäle des *Shaker*-Typs, wird im ersten transmembranen Segment spekuliert (Rodriguez-Navarro, 2000). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von AtKT1/KUP1 und anderen Vertretern dieser Familie zeigt in diesem Bereich das fast identische Motiv IYGD, darüber hinaus sind die ambienten Aminosäuren **GVVYGD LGTSPLY** in Pflanzen und Pilzen hoch konserviert (Rodriguez-Navarro, 2000). In PtKUP1 war jedoch das zweite hochkonservierte Glycin durch Serin (Pos. 24) und das Serin (Pos. 29) durch Prolin ausgetauscht (Abb. 50). Sowohl bei AtTrh1 als auch bei PtKUP1 sind die ersten beiden Aminosäuren IY (Isoleucin, Tyrosin) des putativen Selektivitätsfilters IYGD gegen VF (Valin, Phenylalanin) ausgetauscht. Demzufolge bleibt die Bedeutung dieses Aminosäuren-Bereichs als Selektivitätsfilter höchst spekulativ. Eine Erklärung könnte innerhalb von Struktur-Funktions-Analysen durch den Austausch einzelner Aminosäuren herbeigeführt werden.

```

PtKUP1      15 A Y Q S F G V V F S D L S T P P L Y V
AtTRH1     15 A Y Q S F G L V F G D L S I S P L Y V
AtKT1 / KUP1 29 A Y Q S L G V I Y G D L S T S P L Y V

```

Abb. 50: Sequenzvergleich der putativen Porenregion in der ersten transmembranen Domäne der Kaliumtransporter der KUP/HAK/KT-Familie. Identische Aminosäuren sind schwarz, konservierte grau unterlegt.

4.2 Die Promotoren

Die Promotoren von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* wurden aus genomischer DNA gewonnen. Folgende Abschnitte wurden dabei in 5'-Orientierung vom jeweiligen Translationsstart isoliert:

- *PTORK* (1941 bp)
- *PTK2* (2335 bp)
- *KPT1* (945 bp)
- *PtKUP1* (2585 bp)

Die Analyse der Promotorsequenzen zeigte für alle Pappel-Transporter eine Häufung von Signal-Motiven für die lichtabhängige Transkription, gewebespezifische Expression in Leitgewebe, Schließzellen und Wurzeln sowie eine Verbindung zum pflanzenspezifischen Kohlenstoff-Stoffwechsel und Genaktivierung während der Pollen- und Samenreifung. Die Promotoren von *PTK2* und *PtKUP1* enthielten für letzteres noch eine zusätzliche Motiv-Sequenz. Dies deutete auf eine Funktion, vor allem dieser beiden Kaliumtransporter, bei Übergängen von Ruheperioden in aktive Teilungsphasen, wie z. B. bei der kambialen Reaktivierung im Frühling. In allen Promotorregionen waren Sequenzen zur temperaturabhängigen Expression vorhanden. Die *PTORK*- und *PTK2*-Promotoren enthielten zudem noch ein weiteres „low temperature regulatory sequence“ Motiv (LTRE1HVBLT49). Licht und Temperatur lösen Übergänge zwischen Ruhe- und Wachstumsperioden des Holzes aus (Olsson and Little, 2000). Dies würde für *PTORK* und *PTK2* bedeuten, dass sie saisonabhängig durch diese beiden Faktoren reguliert sein könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu erste Hinweise geliefert. So ließ die Expressionsanalyse von Stamm und Knospen im Jahresverlauf eine Korrelation der Kaliumkanäle *PTK2* und *PTORK* mit der Temperatur vermuten (s. 3.6.1, 3.6.2 und ausführliche Diskussion in 4.5). Ferner enthielten die Promotoren Motive zur hormonellen Regulation durch Auxin, Abscisinsäure und Gibberellinsäure (GA). Dabei fehlten im *PTORK*-Promotor ABA- und im *KPT1*-Promotor GA-regulierte Motive. Auxin spielt, ebenso wie Licht und Temperatur, eine wichtige Rolle beim An- und Abschalten von Promotoren. Für *KPT1* konnte gezeigt werden, dass der Kanal im Stamm durch Auxin reprimiert wurde. Dies stand im Einklang mit dem Befund, dass *KPT1* kurz vor dem Öffnen der Knospe sein Expressions-Maximum erreichte, welches dann, wenn die kambiale Aktivität auxinabhängig ansteigt, stark abfällt und während der ganzen Wachstumszeit auf niedrigem Niveau bleibt. Die Promotoren von *PTORK*, *PTK2* und *PtKUP1* enthielten außerdem noch Motive für Pathogenabwehr, Trockenstress und zuckerabhängige Repression. Zuckerregulierte Motive des *PTK2*-Promotors ließen auf eine ähnliche Rolle, wie bei den orthologen Vertretern *AKT2/3* und *VFK1*, die beide am Zuckertransport beteiligt sind, schließen.

4.3 Funktionen

Die Kanäle und der Transporter wurden mit verschiedenen Methoden funktionell charakterisiert. Nach Injektion von cRNA in Oocyten wurde PTK2 elektrophysiologisch analysiert. PTK2 zeigte sich als kaliumpermeabler, schwach spannungsabhängiger Kanal. Bei Spannungen negativ vom Kaliumgleichgewichtspotential (E_K) vermittelte PTK2 eine Kalium-Aufnahme, dagegen entließ er K^+ -Ionen bei Spannungen positiv von E_K (Abb. 24). Typisch für die AKT2/3-Unterfamilie zeigte PTK2 instantane sowie zeitabhängige Stromkomponenten und wurde spannungsabhängig durch Calcium geblockt. Wie schon für AKT3 und ZMK2 (Marten *et al.*, 1999; Philippart K., 1999) gezeigt, verringerten sich die Stromamplituden durch extrazelluläre Ansäuerung (vgl. Abb. 24 d). Patch-Clamp-Messungen an Protoplasten einer Pappel-Suspensionskultur präsentierten einen einwärtsgerichtenden, spannungsabhängigen und K^+ -selektiven Kanal mit ausschließlich zeitabhängigen Stromkomponenten. Dieser Einwärtsgleichrichter zeigte allerdings, wie PTK2-exprimierende Oocyten, einen spannungsabhängigen Calcium- und Cäsium-Block (s. Abb. 25 c und d). Obwohl der Calcium-Block und die hohe Sensitivität gegenüber Cäsium charakteristisch für die AKT2/3-Familie waren, differierten Spannungsabhängigkeit und Gleichrichtung von denen PTK2-exprimierender Oocyten deutlich. Möglicherweise exprimieren Zellen der Suspensionskultur weitere α -Untereinheiten, die in der Bildung heteromerer, funktioneller Kanäle resultieren, deren Transporteigenschaften sich von homomeren Kanälen unterscheiden (Daram *et al.*, 1997; Dreyer *et al.*, 1997). Ferner könnte PTK2 *in vivo* in einen Einwärtsgleichrichter modifiziert werden, wie es für AKT2/3 durch die Proteinphosphatase AtPP2CA gezeigt wurde (Vranova *et al.*, 2001). Protoplasten der Zellkultur zeigten nach Depolarisation des Membranpotentials kalium- und spannungsabhängige Kalium-Auswärtsströme mit langsamen, sigmoidalen Aktivierungskinetiken (s. Abb. 25 a). Die Ströme ähnelten jenen PTORK-exprimierender Oocyten (Langer *et al.*, 2002) und Strömen, die durch die *Arabidopsis*-Kanäle SKOR und GORK (Guard Cell Outward Rectifying K⁺ channel, Ache *et al.*, 2000) vermittelt werden. Darüber hinaus deuteten weitere Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei dem untersuchten Auswärtsgleichrichter der Zellkultur um PTORK handelte. So enthielt der *PTORK*-Promotor entsprechende Motive zur wurzelspezifischen Expression. Ferner wurde mittels Realtime Quantitativer PCR und Northern Analyse gezeigt, dass PTORK in der Zellkultur und in minimalen Mengen auch in der Wurzel vorhanden war. Dies stand im Einklang mit dem Befund, dass sich hete-

rotrophe Zellkultur-Zellen in ihrer Kaliumkanal-Ausstattung wie Wurzelzellen verhalten (Ivashikina *et al.*, 2001).

Die Funktionen von KPT1 und PtKUP1 konnten in Kalium-Aufnahme-defizienten Bakterien nachgewiesen werden. Nach Expression von KPT1 und PtKUP1 in dem Bakterienstamm LB2003 wurde deren stark eingeschränkte Fähigkeit zur Kaliumaufnahme komplementiert, so dass entsprechend transformierte Bakterien auch auf kaliumlimitierenden Medien wachsen konnten (s. Abb. 26). Die Transporteigenschaften wurden im Halo-Essay näher charakterisiert. Dabei ergab sich für PtKUP1-exprimierende Bakterien eine starke Wachstumshemmung durch Calcium und eine schwache Hemmung durch Cäsium. Barium und TEA⁺, zwei typische Kaliumkanal-Blocker, zeigten keinen Effekt auf das Bakterienwachstum (vgl. Abb. 27). KPT1-exprimierende Bakterien wurden dagegen in ihrem Wachstum nur durch Zink eingeschränkt, wobei auch die Kontrolle eine geringfügige Wachstumshemmung aufwies. Es ist zu prüfen, ob die Zink-Sensitivität der Bakterien auf das Kalium-Mangelmedium zurückzuführen oder tatsächlich KPT1-spezifisch war. Durch die Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl der *Shaker*-Kanal KPT1 als auch der Transporter der KT/KUP/HAKT-Familie PtKUP1 eine Kaliumaufnahme vermittelten. Es bleibt zu klären, warum KPT1 als erster Vertreter der KAT1-Subfamilie im heterologen Expressionssystem der Froschoocyte nicht funktionell charakterisiert werden konnte.

4.4 Lokalisationen

Die Transkriptgehalte von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* in verschiedenen Geweben konnten durch Realtime Quantitativer PCR und Northern Blot Analyse bestimmt werden. Die Realtime PCR-Analyse von Juli-Gewebeproben zeigte *PTK2*- und *PTORK*-Transkripte in jungen Pappelzweigen. *PTK2* und in geringerem Ausmaß auch *PTORK* wurden dabei hauptsächlich in der Phloem-Fraktion, in den leitbündelreichen Petiolen und in Schließzellen detektiert (s. Abb. 30 und 31 b). Beide Kanalgene waren außerdem im Xylem und in Blättern zu finden, dagegen nur in Spuren bzw. gar nicht in der Wurzel. Die Expressionswerte von *PTORK* und *PTK2* im Gesamtblatt könnten durch die hohen Werte in Schließzell-angereicherten Fraktionen und in den Leitgeweben der Blätter erklärt werden. Signalsequenzen in den Promotoren deuteten ebenso auf eine gewebespezifische Lokalisation im Leitgewebe und in den Schließzellen hin.

Die Promotoranalyse ließ auch eine wurzelspezifische Expression vermuten, die sich eben-

so im Northern Blot für *PTK2* angedeutet hatte. Das im LightCycler nur äußerst geringe Transkriptwerte für die Transporter in der Wurzel ermittelt wurden, könnte darauf hinweisen, dass das zum Abgleich verwendete Aktin in der Wurzel anders als in anderen Geweben exprimiert wird und so die ermittelten Transkriptgehalte in der Wurzel nicht im richtigen Verhältnis dargestellt wurden. Erst durch die vollständige Genomsequenzierung der Pappel können Marker- und „housekeeping“-Gene der Pappel identifiziert und so verschiedene Gewebe exakt miteinander verglichen werden. Die *KPT1*-Expression war mit außerordentlich hohen Werten auf Schließzellen und Knospen beschränkt. In Zellen des Phloems und der Wurzel war die Transkription minimal. In Blättern dominierten wieder die hohen Transkriptwerte der Schließzellen. Im Gegensatz zu den *Shaker*-Kaliumkanälen der Pappel konnte *PtKUP1* durchgängig nur in sehr geringen Mengen detektiert werden, dafür aber in allen untersuchten Geweben (Abb. 30). Wie *PtKUP1* wird auch *AtTrh1*, der Transporter mit der größten Sequenzübereinstimmung aus *Arabidopsis thaliana*, in allen Geweben exprimiert und ist in der Wurzel essentiell für die Bildung der Wurzelhaare. Da auch der *PtKUP1*-Promotor Signalmotive für die wurzelspezifische Expression enthielt (vgl. 8.4.2.4), sollte in weitergehenden Untersuchungen der Wurzel und Wurzelhaare geprüft werden, ob *PtKUP1* in der Pappel eine ähnliche Funktion wie *AtTrh1* in *Arabidopsis thaliana* ausübt.

Neben den verschiedenen Geweben der Pappelpflanze wurde auch die Suspensionskultur auf Expression der Transporter untersucht. Während *PTORK* und *PTK2* in der Zellkultur nachgewiesen wurden, konnten *PtKUP1* auch hier nur minimal (Abb. 32) und *KPT1* gar nicht detektiert werden. Nachdem aber Patch-Clamp Messungen an Zellkultur-Protoplasten eindeutig einen Einwärtsgleichrichter identifizierten, musste mit der Expression eines weiteren, bisher unbekanntes Kanals in der Suspensionskultur gerechnet werden.

Da Pappeltransformationen langwierig sind, wurden zunächst *A. thaliana* Pflanzen mit *PTK2*- und *PTORK*-Promotor-GUS-Konstrukten transformiert und die β -Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen. Sowohl die mit dem *PTORK*- als auch die mit dem *PTK2*-Promotor transformierten *Arabidopsis* Pflanzen zeigten eine Blaufärbung in den Leitgeweben von Blatt und Blattstiel (Abb. 35 und 36). Dies war deutlich in Blatt-Querschnitten zu sehen, wo durch den *PTORK*-Promotor im Leitbündel Phloem- und Xylemparenchymzellen stark angefärbt wurden (Abb. 35 a). Dagegen war die Färbung durch *PTK2* nur schwach im Phloem und Xylemparenchym zu erkennen, was auf eine geringere Aktivität des Pappel-Promotors in *Arabidopsis thaliana* schließen ließ.

Transkripte von *PTK2* konnten durch *in situ* PCR auf Querschnitten junger Stämmchen in Phloem-Zellen und in den Blattknospen in embryonalen Blättern lokalisiert werden (Abb. 37). Wie die orthologen Kaliumkanäle VFK1 (Ache *et al.*, 2001) und AKT2/3 (Deeken *et al.*, 2002) aus *Vicia faba* und *Arabidopsis thaliana*, die beide im Phloem lokalisiert sind und beim Zuckertransport eine Rolle spielen, konnte der Pappelkanal *PTK2* dem Phloem zugeordnet werden.

Die Kaliumkanäle *PTORK* und *PTK2* konnten, als erste Kaliumkanal-Proteine überhaupt, durch Immunolokalisation mit Antikörpern zellulär nachgewiesen werden. *PTORK* wurde in Siebröhren, jungen sich differenzierenden Faserzellen und in Markstrahlen detektiert (Abb. 38). In den Holzstrahlen war während des aktiven Holzwachstums eine Konzentration von *PTORK*-Signalen in den Kontaktzellen zu erkennen, wobei die Signale polar zu den Gefäßen hin angeordnet waren. Dies belegte die vorhergesagte Entladung des Kaliums in das apoplastische Leitgewebe des Xylems durch *PTORK*. *PTK2* wurde zwar ebenso in Strahlen, Siebröhren und im Phloemparenchym lokalisiert (Abb. 39), jedoch ohne erkennbare polare Anordnung. *PTK2* könnte aufgrund seiner Lokalisation und Funktion an den Speichervorgängen der Nährstoffe im Herbst beteiligt sein. Im Frühling wiederum könnte durch *PTK2* Kalium aus den Speichergeweben des Xylems, Phloems und der Strahlen wieder aufgenommen werden und so den „sink“-Gewebe zugeführt werden.

4.5 Regulationen

Nachdem Expressionsanalysen und Immunologische Nachweise die vorhergesagten Lokalisationen der Transporter bestätigt hatten, wurde nun deren Regulation untersucht.

4.5.1 Stamm/Holz

Die Daten aus vorherigen Experimenten von Arend, 2001, Dünisch and Bauch, 1994 und Dünisch *et al.*, 1998, belegten bereits eine Kaliumabhängigkeit der Holzbildung. Um herauszufinden, ob die saisonal bedingten Änderungen der Teilungsfähigkeit des Kambiums und damit die jahresabhängige Holzbildung von Expressions-Änderungen der Kaliumtransporter begleitet werden, wurden 2001 Zweige eines zu Beginn zweijährigen Pappelhybrids gesammelt und deren Xylem-Kambium-Phloem-Gewebe einer Expressionsanalyse unterzogen. Im Gegensatz zu dem ubiquitär auftretenden Carrier *PtKUPI*, der das ganze Jahr über gleichbleibend niedrig im Stamm vorhanden war, änderten sich die Transkriptzahlen sowohl für *PTORK* als auch für *PTK2* signifikant (Abb. 40). Prinzipiell wurden die

Kaliumkanäle während der Ruhephase des Kambiums im Winter auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Im Frühjahr, als die Zellen des Kambiums ihre Teilungsfähigkeit wieder aufnahmen (April), stiegen die Transkriptzahlen von *PTK2* transient auf den maximalen Jahreswert an. Im Sommer und Herbst erreichten *PTK2* sowie *PTORK* mit den Jahreshöchsttemperaturen maximale Transkriptwerte, die dann im Winter wieder abfielen. Offensichtlich wurden *PTK2* und *PTORK* zeitversetzt im Jahresgang induziert. Über *PTK2* könnte im Frühling mit steigenden Temperaturen und Tageslängen, parallel zur Reaktivierung des Kambiums, der Kaliumtransport aus den Speicher- zu den „sink“-Gewebe vermittelt werden. Diese Vermutung wurde durch entsprechende Motive zur licht- und temperaturabhängigen Gen-Regulation im Promotor von *PTK2* unterstützt. Die Transkription von *PTK2* fiel im Mai wieder auf Jahresanfangswerte zurück um dann mit dem Temperaturanstieg im Sommer wieder auf maximale Werte anzusteigen. *PTORK*, der ausschließlich Kaliumionen aus der Zelle entlassen kann und dessen Expression im Stamm erst in Hochsommer und Herbst auf maximale Werte anstieg, könnte eine wichtige Funktion bei der Speicherung von Kalium im Herbst übernehmen, indem Kalium aus den Blättern in die lebenden, als Speicher fungierenden Markstrahlen des Stammes transportiert wird. Diese Ergebnisse zeigten, dass *PTORK* und *PTK2* saisonabhängig im Stamm reguliert werden und mit der Aktivität des Kambiums und somit der Holzbildung zusammenhängen.

4.5.2 Blätter/Blattstiele

Transkriptionelle Expressionsanalysen von Blattstielen und -Adern ergaben für *PTORK* eine Induktion durch Licht (s. Abb. 45). Damit könnte die Zunahme der *PTORK*-Expression an den längsten Tagen im Sommer erklärt werden. Im Dunkeln wurde *PTORK* reprimiert (s. Abb. 45), was auf einen Rückgang der Expressionsaktivität des Kaliumkanals an Tagen mit kürzerer Lichtdauer schließen lässt. *PTK2* wurde dagegen in denselben Geweben nicht durch Licht reguliert, folglich könnte die temperaturabhängige Regulation für *PTK2* eine übergeordnete Rolle spielen. Ferner enthielten der *PTORK*- sowie der *PTK2*-Promotor Motive, die auf eine Regulation durch das Seneszenz-Hormon ABA deuten. Für *PTK2* wurde im Stamm gezeigt, dass sich die Transkriptzahl des Kaliumkanals nach einer Inkubation von 8 h mit ABA halbierte (vgl. Abb. 46). Eine Repression durch ABA, das zur Einleitung von Ruheprozessen, wie z. B. der Überwinterung, freigesetzt wird, würde die Reduktion der *PTK2*-Transkripte im Spätherbst untermauern.

4.5.3 Knospen

Auf der Suche nach weiteren saisonabhängigen Phänomenen, die durch Kalium beeinflusst werden, wurde, ähnlich wie für den Stamm, ein Jahresgang der ausschließlich in mehrjährigen Pflanzen vorkommenden Blattknospen erstellt. In diesem baumspezifischen Gewebe korrelierten die *KPT1*-Transkripte mit der Knospenöffnung. So zeigte der in Schließzellen lokalisierte Kaliumkanal eine transiente Induktion seiner Transkription beim Öffnen der Knospen, die spätestens nach Anlage neuer Knospen auf ein ganzjährig niedriges Level reduziert wurde (Abb. 42 a). Der Promotor von *KPT1* enthielt entsprechende Motive, die auch für Reaktivierungsprozesse bei der Samen- und Pollenreifung entscheidend sind. Der starke Anstieg von *KPT1* während des fortschreitenden Schwellens der Blattknospen konnte in der Klimakammer durch künstliche Knospenreifung bestätigt werden (Abb. 44). Durch Induktion eines Kalium-Aufnahmekanals könnte so gesichert werden, dass ausreichend osmotisch aktives Kalium für die Zellstreckung und Stomaöffnung in die Schließzellen noch vor Öffnen der Blattknospen gelangt.

Für die anderen bislang isolierten Pappel-Kaliumtransporter konnte keine Regulation während der Blattknospenentwicklung nachgewiesen werden (Abb. 42 b und 43).

4.5.4 Hormone

KPT1 wurde im Stamm durch das Wachstumshormon Auxin beeinflusst. Im Gegensatz zu *ZMK1* (Philippar *et al.*, 1999) wurde *KPT1* im Stamm nach Auswaschen des endogenen Auxins induziert und durch Zugabe des physiologisch aktiven 1-NAA reprimiert (s. Abb. 47). Eine mögliche Wirkung des Auxins auf die *KPT1*-Transkription wurde durch Signalmotive in der Promotorregion zur auxinabhängigen Transkription gestützt. Diese Daten korrelierten mit denen der Knospenöffnung. *KPT1* wurde kurz vor der Reaktivierung, wenn Auxin vermutlich noch nicht wirksam ist, innerhalb kürzester Zeit induziert. Hierfür sind wahrscheinlich Licht und Temperatur verantwortlich. Die *KPT1*-Expression würde dann, wenn der wirksame Auxin-Gehalt ansteigt, runterreguliert werden.

4.5.5 Salz

Da auch Bäume in ihrem Wachstum durch Salzstress negativ beeinflusst werden, wurde der Effekt erhöhter NaCl-Konzentrationen auf *PTORK* und *PtKUP1* untersucht. Einige Mitglieder der KT/KUP/HAK-Familie, wie z. B. HvHAK1 (Santa-Maria *et al.*, 1997) und

AtKUP1 spielen vermutlich beim Salzstress eine Rolle (Fu and Luan, 1997). Der Vertreter aus der Pappel dagegen wurde durch NaCl in keinerlei Weise reguliert (Abb. 48 und 49). *PTORK* jedoch wurde in Blättern und im Stamm von Hydropflanzen, die zwei Wochen lang Salzstress ausgesetzt waren, reprimiert. Den gleichen Effekt zeigte die Suspensionskultur bereits nach 6 h Salzstress (vgl. Abb. 48 und Abb. 49). Dies würde bedeuten, dass bei Salzstress weniger Kalium in das Xylem gelangt. Dafür könnte Natrium in toxischen Mengen ins Xylem aufgenommen werden.

4.6 Physiologische Bedeutung für die Pappel

Der Kaliumgehalt des Pappel-Kambiums nimmt während der Wachstumsperiode, in Abhängigkeit vom Kaliumangebot, zu. Unter kaliumlimitierenden Bedingungen und nach lokal begrenzter Applikation des Kaliumkanalblockers TEA⁺ wurden die Gefäßweiten und die Streckungszone signifikant reduziert. Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen Kaliumgehalt bzw. Kaliumkanälen und holzbildenden Zellen hergestellt werden.

4.6.1 PTORK

Das Kanalgen *PTORK* konnte den Leitgeweben, hier vor allem dem Phloem sowie den Schließzellen zugeordnet werden. *PTORK* gehörte zur Unterfamilie der K⁺-Kanäle des SKOR-Typs. Von diesem Subtyp existieren in der einjährigen Pflanze *A. thaliana* mit SKOR und GORK nur zwei Vertreter. SKOR entlässt Kaliumionen ausschließlich ins Xylem der Wurzel (Gaymard *et al.*, 1998) und GORK, der hauptsächlich in Schließzellen, darüber hinaus im Stengel, Blatt, Blüten, Wurzel und Wurzelhaaren exprimiert wird, ist maßgeblich an der Regulation der Stomabewegung und der Osmoregulation der Wurzelhaare beteiligt (Ache *et al.*, 2000; Ivashikina *et al.*, 2001). Nachdem *PTORK* ebenfalls sehr hoch in Schließzellen exprimiert war und auch im Promotor schließzellspezifische Signalmotive gefunden wurden (vgl. 34 b und 8.4.2.1), war zu vermuten, dass er, wie GORK, an der Stomabewegung beteiligt ist. Sein Expressionsmuster und die Lokalisation in Strahlzellen des Phloems mit Kontakt zu den Siebröhren sowie die polare Anordnung in den Markstrahlen an der Gefäßseite (Abb. 38) ließen dagegen auf eine wichtige Rolle bei der Einlagerung von Kalium ins Holz, vor Einsetzen der Ruheperiode, schließen. Darüber hinaus wurde *PTORK* auch im Xylemparenchym lokalisiert (s. Abb. 29, 30 und 35), so dass *PTORK*, wie SKOR, die Entladung von Kalium aus dem Xylemparenchym in die Gefäße vermitteln könnte. *PTORK* vereinigte also Funktionen, wie sie von GORK und SKOR be-

kannt sind. Es bleibt daher zu prüfen, ob in der Pappel überhaupt ein weiterer auswärts- gleichrichtender Kaliumkanal, wie in *Arabidopsis*, existiert. Das laufende Genom- Sequenzierungs-Projekt der Pappel wird dazu Aufschluss geben.

4.6.2 PTK2

PTK2 ließ sich der AKT2/3-Unterfamilie zuordnen, deren Vertreter AKT2/3 aus *A. thaliana*, VFK1 aus *V. faba* und ZMK2 aus *Z. mays* allesamt im Phloem lokalisiert sind. Auch für das Pappel-Mitglied wurde eine Lokalisation im Leitgewebe, vorwiegend im Strahl- und Phloemparenchym, nachgewiesen (vgl. Abb. 36, 37 und 39). Die elektrophysiologi- sche Charakterisierung zeigte einen schwach spannungsabhängigen, K^+ -selektiven Kanal, der Kaliumionen aufnehmen aber auch entlassen kann. Seine Lokalisation in Strahlzellen und Parenchym, seine Fähigkeit Kaliumionen in die Zelle aufzunehmen und abzugeben sowie seine hohe, transiente Expression im März und April lassen auf eine wichtige Rolle bei der Versorgung der „sink“-Gewebe mit Kalium im Frühjahr schließen. Die Induktion von *PTK2* im Frühling könnte durch Temperaturänderungen und Reaktivierungsprozesse hervorgerufen werden, was sich durch entsprechend vorhandene Promotor-Motive begrün- den ließe. Wie für VFK1 gezeigt, könnte über *PTK2* der Zuckertransport in den lebenden Siebröhren (vertikal) und Baststrahlen (radial) durch Kontrolle des Membranpotentials gesichert werden. Im frühen Herbst könnten die Transportprozesse zur Nährstoff- Speicherung im Mark in umgekehrter Richtung ablaufen, was ebenfalls hohe Transkript- zahlen von *PTK2* im August und September erfordern würde (vgl. Abb. 40).

4.6.3 KPT1

KPT1 wurde der KAT1-Unterfamilie zugeordnet, deren Vertreter strikte Kalium-Einwärts- gleichrichter sind. Für *KPT1* konnte in Bakterien, die ihre Fähigkeit zur Kalium-Aufnahme verloren hatten, ebenfalls eine Funktion als Kalium-Aufnahmesystem nachgewiesen wer- den. Wie für *SIRK* (Pratelli *et al.*, 2002), *KAT1* und *KST1* gezeigt (Nakamura *et al.*, 1995; Müller-Röber *et al.*, 1995), wurde auch der Pappelvertreter *KPT1* fast ausschließlich in Schließzellen exprimiert (s. Abb. 31). *KAT1* und *KST1* sind dort vor allem für die regu- lierte Stomaöffnung wichtig (Szyroki *et al.*, 2001). Eine ähnliche Funktion kann auch für *KPT1* vermutet werden.

4.6.4 PtKUP1

PtKUP1 stellte sich als neues Mitglied der KT/KUP/HAK-Familie heraus. Dabei zeigte PtKUP1 die größte Sequenzähnlichkeit zu dem *Arabidopsis* Carrier Trh1. Wie *Trh1* (Rigas *et al.*, 2001) wurde auch *PtKUP1* ubiquitär und nur in geringen Mengen exprimiert. Dementsprechend war der Pappel-Carrier in Blättern, Petiolen, in den Leitgeweben Xylem und Phloem, in der Wurzel, in Blattknospen und auch in der Suspensionskultur zu finden. Nach Komplementation Kalium-Aufnahme-defizienter Bakterien konnte PtKUP1 als Kalium-Aufnahmesystem klassifiziert werden und sichert vermutlich eine ausreichende Kaliumversorgung, auch unter limitierenden Bedingungen. Die Tatsache, dass *PtKUP1*, im Gegensatz zu allen *Shaker*-Kanälen, im Winter sowohl im Stamm als auch in den Blattknospen höher exprimiert wurde, unterstützte die Vermutung, dass PtKUP1 die Kaliumversorgung lebender Zellen in Ruhephasen gewährleistet.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation bilden den Grundstein für eine intensive, molekulargenetische und physiologische Forschung zur Aufklärung des kaliumabhängigen Holzwachstums. Trotz intensivster Anstrengungen gelang es bisher nicht, transgene *sense* und *antisense* Pappeln dieses Hybrids zu generieren. Für die Charakterisierung des Phänotyps und der Holzeigenschaften, die auf veränderten Kaliumbedingungen beruhen, bleibt dies jedoch erforderlich. Die Herstellung transgener Pappeln soll nun im Rahmen der neu gegründeten DFG-Pappel-Forschergruppe von der Arbeitsgruppe Mendel/Haensch, Technische Universität Braunschweig, verwirklicht werden. Ferner sollen auch Pappelpflanzen mit den Promotor-Gus-Konstrukten von *PTORK* und *PTK2* transformiert werden, um die Lokalisationen der Kaliumkanäle in der einjährigen, krautigen Pflanze *Arabidopsis* mit denen im mehrjährigen Baum *Populus* vergleichen zu können. Für die exakte Lokalisation von KPT1 und PtKUP1 in der Pflanze sollen ebenfalls Antikörper eingesetzt und von den bereits isolierten Promotorregionen Promotor-Reporter-Konstrukte hergestellt werden. Mit der Laser-Microdissection-Methode ist möglich cDNA aus einzelnen, kambialen und sich differenzierenden Phloem- bzw. Xylemzellen zu isolieren, so dass auf zellulärer Ebene Transporter-Gene identifiziert werden könnten, die an Zellteilung, Expansion, Differenzierung und Xylognese beteiligt sind. Darüber hinaus ist für die Aufklärung des gesamten Kaliumstromes von der Aufnahme in der Wurzel, über den Transport im Stamm bis zur

Speicherung in Blättern bzw. Stamm die Isolierung weiterer Kaliumkanäle des *Shaker*-Typs und ihrer Promotoren erforderlich. Mittlerweile konnte ein Fragment eines AKT1-artigen Kanals, die an der Kaliumaufnahme der Wurzel beteiligt sind, ebenfalls isoliert werden. Aufgrund der großen, natürlichen Schwankungen des Jahres-Klimas und auch der Holzeigenschaften müssen die Expressionsmuster aus den Jahresgängen für Stamm und Blattknospen verifiziert werden. Mit der Patch-Clamp Technik und Einstichmessungen an lebenden Zellen sollen die elektrischen Eigenschaften einzelner Zelltypen mit den Expressionsmustern in Bezug gebracht werden. *In vivo* Messungen an Holz-Lebend-Schnitten der Pappel und Patch-Clamp Analysen an Protoplasten sollen mit *in vitro* Daten aus heterologen Expressionssystemen verglichen werden. Schließlich sollen Kaliumverschiebungen im Jahresverlauf (EDXA) und biophysikalische Eigenschaften von Wildtyp und transgenen Pflanzen gegenüber gestellt werden. Basierend auf diesen Daten kann ein Modell entwickelt werden, dass die Korrelation zwischen Größe und Richtung der saisonalen Kaliumströme und der Anwesenheit und den Eigenschaften der Kaliumtransporter erklärt, die für die Holzbildung relevant sind.

5. Zusammenfassung

Mit molekularbiologischen und biophysikalischen Analysen sowie immunologischen Nachweisen wurden Grundlagen des kaliumabhängigen Holzwachstums erforscht. Dazu lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

- (i.) Aus Holz-Kambium-Bast-Gewebe wurden ausgehend von EST's die Vollängen der cDNA-Moleküle *PTK2* (*Populus tremula* K^+ channel 2) und *PtKUP1* (*Populus tremula* K^+ uptake transporter 1) mittels RACE-Technik isoliert. *PTK2* ließ sich anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz der AKT2/3-Unterfamilie des *Shaker*-Typs zuordnen, während sich *PtKUP1* in die Familie der KT/KUP/HAK-Transporter einreichte.
- (ii.) Der Kaliumkanal *KPT1* (K^+ channel *Populus tremula* 1) wurde mit degenerierten Primern in hoch konservierten Bereichen pflanzlicher *Shaker*-Kanäle aus sich teilendem, oberirdischem Sprossgewebe isoliert und anschließend mittels 3'- und 5'-RACE komplettiert. Nach Aminosäuren-Sequenzanalyse ist *KPT1* ein KAT1-ähnlicher Kaliumkanal.
- (iii.) Der direkte Zusammenhang zwischen Kaliumkanälen und holzbildenden Zellen konnte durch Verringerung der Gefäßweiten und signifikante Schrumpfung der Streckungszone nach lokal begrenzter Applikation des Kaliumkanalblockers TEA^+ sowie durch kaliumlimitierende Bedingungen hergestellt werden.
- (iv.) Die Transkripte von *PTK2* und *PTORK* (*Populus tremula* outward rectifying K^+ channel) wurden beide in den Leitgeweben des Stammes, dort besonders im Phloem und in Schließzellen lokalisiert. Die mRNA von *PtKUP1* war ubiquitär in geringen Mengen vorhanden. *KPT1* wurde fast ausschließlich in den Schließzellen nachgewiesen.
- (v.) *PTK2* wurde nach heterologer Expression in Frosch-Oocyten als schwach spannungsabhängiger, K^+ -selektiver, nicht-gleichrichtender Kaliumkanal charakterisiert. Wie AKT2/3-ähnliche Kaliumkanäle, wurde *PTK2* durch Protonen und spannungsabhängig durch Calcium geblockt.
- (vi.) *KPT1* und *PtKUP1* waren in der Lage einen Kalium-Aufnahme-defizienten Bakterienstamm zu komplementieren. *KPT1* und *PtKUP1* repräsentieren demnach Kalium-Aufnahmesysteme. Dabei erwies sich *KPT1* als sensitiv gegenüber Zink und der durch *PtKUP1* vermittelte K^+ -Transport wurde durch Calcium und Cäsium inhibiert.

-
- (vii.) In Protoplasten einer Pappel-Suspensionskultur konnte mittels Patch-Clamp Technik ein auswärtsgleichrichtender, kalium- und spannungsabhängiger, K^+ -selektiver Kanal nachgewiesen werden. Dieser Auswärtsgleichrichter zeigte langsame, sigmoidale Aktivierungskinetiken, ähnlich den Kaliumströmen PTORK-exprimierender Oocyten. Des Weiteren wurde in der Suspensionskultur ein einwärtsgleichrichtender, spannungsabhängiger K^+ -selektiver Kanal detektiert, der, wie PTK2 in *Xenopus*-Oocyten, spannungsabhängig durch Calcium geblockt wurde. Nach Zugabe extrazellulären Cäsiums kam der Einwärtsstrom vollständig zum Erliegen.
- (viii.) Für die drei Kaliumkanäle der Pappel sowie den Kalium-Carrier wurden die Promotorregionen isoliert. Sie enthielten Motive für licht- und temperaturabhängige Transkription, gewebespezifische Expression im Leitgewebe, in Schließzellen und in Wurzeln, hormonabhängige Transkription und Motive zur Reaktivierung bei der Pollen- und Samenreifung.
- (ix.) Die Genaktivitäten von PTORK und PTK2 wurden nach Transformation von *A. thaliana* mit geeigneten Promotor-GUS-Konstrukten im Phloem und Xylemparenchym von Blattstielen nachgewiesen.
- (x.) Erstmals für Pflanzen wurden mit PTORK und PTK2 Kaliumkanal-Proteine immunologisch durch Antikörper in Phloem- und Strahlzellen detektiert. Während PTK2 gleichmäßig in den Strahlzellen verteilt war, wurde im gleichen Zelltyp für PTORK eine polare Anordnung zu den angrenzenden Gefäßen hin beobachtet.
- (xi.) Um die verschiedenen Kaliumtransporter mit der kambialen Aktivität und dem Holzwachstum zu verknüpfen, wurden die Expressionsprofile mit jahreszeitlichen Änderungen der Kaliumgehalte im Stamm verglichen. Die Transkriptanalyse von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1* über den Zeitraum eines Jahres in Stamm- und Blattknospen zeigte eine transkriptionelle Korrelation der cDNA-Moleküle *PTORK* und *PTK2* mit der saisonal begrenzten Holzbildung. Ihre Induktionen im Herbst lassen, zusammen mit ihrer Expression im Leitgewebe und ihren funktionellen Eigenschaften, auf eine Beteiligung der beiden Kaliumkanäle an Speichervorgängen in die lebenden Mark- und Baststrahlen im Herbst schließen. Im Frühjahr dagegen, wenn sich die Kaliumströme umkehren um die „sink“-Gewebe mit Kalium zu versorgen, wird das Kalium vermutlich hauptsächlich über PTK2, der dann maximal exprimiert wird, aus den Strahlen und Gefäßen zu den Meristemen in Stamm und Knospen transportiert. *KPT1*, der hauptsächlich in Schließzellen lokalisiert ist, scheint eine wichtige Rolle beim Öffnen der Stomata zu spielen. *PtKUP1* war in al-

-
- len Geweben während des gesamten Jahres niedrig exprimiert und sicher daher vermutlich eine ausreichende Kaliumversorgung auch unter limitierenden Bedingungen.
- (xii.) Zur Vermehrung und Schaffung neuen Pflanzenmaterials wurde eine sterile Agarkultur aus *P. tremula* x *P. tremuloides* sowie eine Pappel-Suspensionskultur aus oberirdischem, sich teilendem Sprossgewebe etabliert. Die Expressionsanalyse der Zellkultur deutete auf eine Ausstattung an Kaliumkanälen wie in Wurzelhaaren hin, mit hohen Transkriptzahlen für *PTORK*, geringer Expression von *PTK2* und minimalsten *PtKUP1*-Transkripten.

6. Summary

The current work focussed on the elucidation of the molecular basis for K^+ -dependent wood formation. Using molecular techniques in combination with biophysical and immunological approaches the results can be summarised as follows:

- (i.) Starting from available EST's the cDNA's of *PTK2* (*Populus tremula* K⁺ channel 2) and *PtKUP1* (*Populus tremula* K⁺ uptake transporter 1) were isolated from wood-cambium-phloem tissue with use of the RACE technique. Based on the deduced amino acid sequences, PTK2 was assigned to the AKT2/3-subfamily of *Shaker*-type channels, while PtKUP1 was grouped into the family of the KT/KUP/HAK-transporters.
- (ii.) The potassium channel *KPT1* (K⁺ channel *Populus tremula* 1) was isolated from dividing, over ground stem tissues using degenerated primers for highly conserved regions of *Shaker* channels and the cDNA was completed in 3'- und 5'-directions by RACE-PCR. The obtained amino acid sequence revealed that KPT1 represents a KAT1-like K^+ channel.
- (iii.) The contribution of potassium channels for wood formation was shown by local application of the K^+ channel blocker TEA⁺ as well as under limiting K^+ conditions. Both treatments resulted in a decrease of vessel lumen area, a significant reduction of the zone of expanding xylem cells and a premature initiation of secondary cell wall synthesis.
- (iv.) The transcripts of both *PTK2* and *PTORK* (*Populus tremula* outward rectifying K⁺ channel), were mainly localised in the phloem of the vascular tissue and in guard cells. In contrast, the mRNA of *PtKUP1* was ubiquitously present at low levels while the *KPT1* expression was restricted to guard cells.
- (v.) Following the heterologous expression in frog oocytes, PTK2 was characterised as a weakly voltage-dependent, K^+ -selective channel mediating potassium currents into and out of the cell. Reminiscent to AKT2/3-like channels, PTK2 was sensitive to extra cellular protons and blocked by calcium in a voltage-dependent manner.
- (vi.) KPT1 and PtKUP1 were able to complement a potassium uptake deficient strain of *E. coli*. Therefore KPT1 and PtKUP1 represent potassium uptake transport proteins. These studies showed that K^+ -transport mediated by KPT1 was inhibited by zinc. PtKUP1 was inhibited by calcium and caesium.

-
- (vii.) Protoplasts from poplar suspension cultures analysed with the patch-clamp technique displayed an outward rectifying, potassium- and voltage-dependent, K^+ -selective channel. This outward rectifier exhibiting slow sigmoidal activation kinetics, reminiscent of PTORK when heterologously expressed in *Xenopus* oocytes. In addition, an inward rectifying, voltage-dependent, K^+ -selective channel was detected in suspension cultured cells, showing a voltage-dependent calcium block like PTK2 expressed in *Xenopus* oocytes. The currents carried by this channel were completely abolished after application of extra cellular caesium.
- (viii.) The promotor regions of the three poplar potassium channels and the potassium transporter were isolated. Sequence analysis revealed signal motifs for temperature- and light-dependent regulation as well as tissue-specific expression in vascular tissue, guard cells and roots, motifs for hormonal dependent transcription, reactivation during pollen and seed development.
- (ix.) Transformation of *A. thaliana* with the promotor-GUS-constructs showed that PTORK and PTK2 gene activities were predominantly observed in the phloem and xylem parenchyma of petioles.
- (x.) For the first time in plants the K^+ channel proteins PTORK and PTK2 were immunologically detected with antibodies in phloem and rays. In contrast to PTK2 which was equally distributed within ray cells PTORK was polar arranged to neighbouring vessels.
- (xi.) In order to link the different potassium transporters to cambial activity and wood formation expression profiles were compared to seasonal changes of potassium content of the stems. The annual expression analysis of *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* and *PtKUP1* in stems and buds revealed a correlation of the mRNA molecules of *PTORK* and *PTK2* with seasonally limited wood formation. Their induction in autumn, as well as their localisation in vascular tissues and their functional properties, indicated an involvement of both potassium channels in loading the still living pit and bast rays in autumn. In contrast in spring, when K^+ fluxes reverse from the rays and vessels to the meristematic tissues to ensure cambial activity, this ion is probably transported via PTK2, which is maximal expressed at this time. *KPT1*, which is mainly localised in guard cells, probably plays an important role in stomatal opening. Finally, *PtKUP1* may represent a gene ensuring sufficient potassium nutrition under limiting conditions since transcript levels were low in all tissues throughout the year.

- (xii.) A sterile agar culture of *P. tremula* x *P. tremuloides* was generated for propagation and a sterile poplar suspension culture was established from over ground dividing stem tissue. The K⁺-channel expression profile of the cell culture was similar to that described for root hairs showing high transcript levels of *PTORK*, little expression of *PTK2* and minimal amounts of *PtKUP1* transcripts.

7. Literatur

Ache P. (1997) Molekulare Charakterisierung und Lokalisation eines Kaliumkanals aus Leitgeweben und Kotyledonen von *Vicia faba* L., Dissertation der Universität Würzburg, 106 S.

Ache P., Becker D., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsma M.R.G. and Hedrich R. (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. FEBS Lett., 486, 93-98.

Ache P., Becker D., Deeken R., Dreyer I., Weber H., Fromm J. and Hedrich R. (2001) VFK1, a *Vicia faba* K⁺ channel involved in phloem unloading. Plant J., 27, 571-580.

Allen R.D., Bernier F, Lessard P.A. and Beachy R.N. (1989) Nuclear factors interact with a soybean β -Conglycinin enhancer. Plant Cell, 1, 623-631.

Aloni R. (1995) The induction of vascular tissue by auxin and cytokinin. In Plant Hormones and their Role in Plant Growth Development, 2nd ed., Davies P.J., ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, 531-546. Zitiert in Plant Physiology, 2nd ed., Taiz L. and Zeiger E., Sinauer Associates (1998), S. 472.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basis local alignment search tool. J. Mol. Biol., 215, 403-410.

Anderson J.A., Huprikar S.S., Kochian L.V., Lucas W.J. and Gaber R.F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 3736-3740.

Arend M. and Fromm J. (2000) Seasonal variation in the K, Ca and P content and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in the cambium of *Populus trichocarpa*. In: Cell and Molecular Biology of Wood Formation, R.A. Savidge, J.R. Barnett and R. Napier, eds (Oxford, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited), 5, 67-70.

Arend M. (2001) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum kaliumabhängigen

Holzwachstum bei *Populus trichocarpa* Torr. et Gray., Dissertation TU München, 101 S.

Arend M., Weisenseel M.H., Brummer M., Osswald W. and Fromm J.H. (2002) Seasonal changes of plasma membrane H⁺-ATPase and endogenous ion current during cambial growth in poplar plants. *Plant Phys.*, 129, 1651-1663.

Arend M. and Fromm J. (2003) Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. *Plant Biology*, 5, 255-264.

Baldino F., Chesselet M.-F. and Lewis M.E. (1989) High-Resolution *in situ* hybridisation histochemistry. *Meth. in Enzym.*, 168, 761-777.

Banelos M.A., Klein R.D., Bowman S.J. and Rodriguez-Navarro A. (1995) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.*, 14, 3021-3027.

Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J.M. and Frommer W.B. (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 12, 1153-1164.

Bate N. and Twell D. (1998) Functional architecture of a late pollen promoter: pollenspecific transcription is developmentally regulated by multiple stagespecific and codependent activator elements. *Plant Mol. Biol.*, 37, 859-869.

Bauer C.S., Hoth S., Haga K., Philippar K., Aoki N. and Hedrich R. (2000) Differential expression and regulation of K⁺ channels in the maize coleoptile: molecular and biophysical analysis of cells isolated from cortex and vasculature. *Plant J.*, 24, 139-245.

Baumann A., Frings S., Godde M., Seifert R. and Kaupp U.B. (1994) Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO J.*, 13, 5040-5050.

Baumann E., Lewald J., Saedler H., Schulz B. and Wisman E. (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population

generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* 97, 729-734.

Baumann K., De Paolis A., Costantino P. and Gualberti G. (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and Auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. *Plant Cell*, 11, 323-333.

Becker D., Dreyer I., Hoth S., Reid J.D., Busch H., Lehnen M., Palme K. and Hedrich R. (1996) Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 8123-8128.

Van Bel A.J.E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment*, 26, 125-149.

Benayoun J. (1983) A cytochemical study of cell wall hydrolysis in the secondary xylem of poplar (*Populus italica* Moench.). *Ann. Bot.*, 52, 189-200.

Bilkova J., Albrechtova J. and Opatrna J. (1999) Histochemical detection and image analysis of non-specific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce. *J. Exp. Bot.*, 35 (336), 1129-1138.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513-1523.

De Boer A.H. and Volkov V. (2003) Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant, Cell and Environment*, 26, 87-101.

Brüggemann L., Dietrich P., Becker D., Dreyer I., Palme K. and Hedrich R. (1999) Channel-mediated high-affinity K⁺ uptake into guard cells from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96, 3298-3302.

Cercós M., Gómez-Cadenas A. and Ho T.-H.D. (1999) Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, *EPB-I*, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant J.*, 19, 197-118.

Chaffey N., Barlow P. and Barnett J. (2000) A cytoskeletal basis for wood formation in angiosperm trees: the involvement of microfilaments. *Planta*, 210, 890-896.

Chaffey N., Barlow P. and Sundberg B. (2002) Understanding the role of the cytoskeleton in wood formation in angiosperm trees: hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) as the model species. *Tree Phys.*, 22, 239-249.

Chaffey N. (2002) Why is there so little research into the cell biology of the secondary vascular system of trees? *New Phyt.*, 153, 213-223.

Chen C., Meyermans H., Burggraeve B., De Rycke R.M., Inoue K., De Vleeschauwer V., Steenackers M., Van Montagu M.C., Engler G.J. and Boerjan W.A. (2000) Cell-specific and conditional expression of Caffeoyl-Coenzym A-3-O-Methyltransferase in poplar. *Plant Phys.*, 123, 853-867.

Clark J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerises. *Nucl. Acids Res.*, 16, 9677-9686.

Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P. and Schroeder J.I. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 12043-12048.

Clough S.J. and Bent A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16 (6), 735-743.

Czempinski K., Zimmermann S., Ehrhardt T. and Müller-Röber B. (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.*, 16, 2565-2575.

Czempinski K., Gaedeke N., Zimmermann S. and Müller-Röber B. (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.*, 50, 955-966.

Dannenhoffer J.M., Suhr S.C. and Thompson G.A. (2001) Phloem-specific expression of the pumpkin fruit trypsin inhibitor. *Planta*, 212, 155-162.

Daram P., Urbach S., Gaymard F., Sentenac H. and ChereI I. (1997) Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.*, 16, 3455-3463.

Deeken R., Sanders C., Ache P. and Hedrich R. (2000) Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 23, 285-290.

Deeken R., Geiger D., Fromm J., Koroleva O., Ache P., Langenfeld-Heyser R., Sauer N., May S.T. and Hedrich R. (2002) Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta*, 216, 334-344.

Degenhardt J. and Tobin E.M. (1996) A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an *Lhcb* promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *Plant Cell*, 8, 31-41.

Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T. and McKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.

Dreyer I., Antunes S., Hoshi T., Müller-Röber B., Palme K., Pongs O., Reintanz B. and Hedrich R. (1997) Plant K⁺ channel α -subunits assemble indiscriminately. *Biophys. J.*, 72, 2143-2150.

Dünisch O. and Bauch J. (1994) Influence of mineral elements on wood formation of old growth spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Holzforschung*, 48, 5-14.

Dünisch, O., Bauch J., Müller M. and Greis O. (1998) Subcellular quantitative determination of K and Ca in phloem, cambium, and xylem cells of spruce (*Picea abies* L. Karst.) during earlywood and latewood formation. *Holzforschung*, 52, 582-588.

Dunn A.M., White A.J., Vural S. and Hughes M.A. (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.*, 38, 551-564.

Durell S.R. and Guy H.R. (1999) Structural models of the KtrB, TrkH and trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys. J.*, 77, 789-807.

Ehrhardt T., Zimmermann S. and Müller-Röber B. (1997) Association of plant K⁺_{in} channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett.*, 409, 166-170.

Eklund L. and Eliasson L. (1990) Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. *J. Exp. Bot.*, 41, 863-867.

Elmayan T. and Tepfer M. (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res.*, 4, 388-396.

Epstein and Kim (1971) Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 108, 639-644.

Eschrich W., Fromm J. and Essiamah S. (1988) Mineral partitioning in the phloem during autumn senescence of beech leaves. *Trees*, 2, 73-83.

Excurra I., Ellerström M., Wycliffe P., Stålberg K. and Rask L. (1999) Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.*, 40, 699-709.

Filatti J.J., Sellmer J., McCown B., Haissig B. and Comai L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. and Gen. Genetics*, 206, 192-199.

Finkel A.S. and Gage P.S. (1985) Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In: voltage and patch clamping with microelectrodes. Smith T., Leacar H., Redman S.J. and Gage P.W. eds., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 47-94.

Frewen B.E., Chen T.H.H., Howe G.T., Davis J., Rohde A., Boerjan W. and Bradshaw Jr. H.D. (2000) Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in

Populus. Genetics, 154, 837-845.

Frohman M.A., Dush M.K. and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8998-9002.

Fromm J. and Bauer T. (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. J. Exp. Bot., 45, 463-469.

Fromm, J. and Eschrich, W. (1986) Changes of adenine nucleotide and orthophosphate concentrations in buds of deciduous trees during spring activation. Trees, 1, 42-46.

Fromm J. and Eschrich W. (1988) Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. Trees, 2, 18-24.

Fromm J. and Eschrich W. (1993) Electric signals from roots of willow (*Salix viminalis*) change transpiration and photosynthesis. J. Plant Phys., 141, 673-680.

Fromm J., Essiamah S. and Eschrich W. (1987) Displacement of frequently occurring heavy metals in autumn leaves of beech (*Fagus sylvatica*). Trees, 1, 164-171.

Fu H.-H. and Luan S. (1998) AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. Plant Cell, 10, 63-73.

Gasser S.M., Amati B.B., Cardenas M.E. and Hofmann J.F.X. (1989) Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. Intnatl. Rev. Cyto., 119, 57-96.

Gassman W., Rubio F. and Schroeder J.I. (1996) Alkali cation selectivity of the root high-affinity potassium transporter HKT1. Plant J., 10, 869-883.

Gaymard F., Pilot G., Lacombe B., Bouchez D., Bruneau D., Boucherez J., Michaux-Ferrière N., Thibaud J.-B. and Sentenac H. (1998) Identification and disruption of a plant *Shaker*-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. Cell, 94, 647-655.

Gehrig H.H., Winter K., Cushman J., Borland A. and Taybi T. (2000) An improved RNA - isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 18, 369-379.

Gubler F., Kalla R., Roberts J.K. and Jacobson J.V. (1995) Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for *myb* transactivation of a high-pl α -amylase Gene Promoter. *Plant Cell*, 7, 1879-1891.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. and Sigwort F.J. (1981) Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391, 85-100.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.

Haro R., Sainz L., Rubio F. and Rodriguez-Navarro A. (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 31, 511-520.

Hartmann T. (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, 207, 483-495.

Hedrich R. and Roelfsma M.-R.G. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Available: <http://www.els.net:Macmillan> Reference Ltd.

Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomquist K., Bhalerao R., Uhlen M., Teeri T.T., Lundeberg J., Sundberg B., Nilsson P. and Sandberg G. (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 14732-37.

Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. and Korenaga T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucl. Acids Res.*, 27 (1), 297-300.

Hirsch R., Lewis B.D., Spalding E.P. and Sussmann M.R. (1998) A role for the AKT1 po-

tassium channel in plant nutrition. *Science*, 280, 918-921.

Iliev I. and Savidge R. (1999) Proteolytic activity in relation to seasonal cambial growth and xylogenesis in *Pinus banksiana*. *Phytochem.*, 50, 953-960.

Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene*, 96, 23-28.

Ivashikina N., Becker D., Ache P. Meyerhoff O., Felle H.H. and Hedrich R. (2001) K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS lett.*, 508, 463-469.

Jeknic Z. and Chen T.H.H. (1999) Changes in protein profiles of poplar tissues during the induction of bud dormancy by short-day photoperiods. *Plant Cell Phys.*, 40 (1), 25-35.

Jian L.-C., Li P.H., Sun L.-H. and Chen T.H.H. (1997) Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J. Exp. Bot.*, 48 (311), 1195-1207.

Johansen, B. (1997) *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Ann. Bot.*, 80, 697-700.

Kagaya Y., Ohmiya K. and Hattori T. (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucl. Acids Res.*, 27, 470-478.

Kato Y., Sakaguchi M., Mori Y., Saito K., Nakamura T., Bakker E.P., Sato Y., Goshima S. and Uozumi N. (2001) Evidence in support of four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 6488-6493.

Kempers R., Ammerlaan A. and van Bel A.J.E. (1998) Symplasmic constriction and ultrastructural features of the sieve element/companion cell complex in the transport phloem of apoplasmically and symplasmically phloem-loading species. *Plant Phys.*, 116, 271-278.

Kim H.-J., Kim Y.-K., Park J.-Y. and Kim J. (2002) Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/ dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 29, 693-704.

Kim E.J., Kwak J.M., Uozumi N. and Schroeder J.I. (1998) AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 10, 51-62.

Kirch H.H., Vera-Estrella R., Gollmack D., Quigley F., Michalowski C.B., Barkla B.J. and Bohnert H.J. (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Phys.*, 123, 111-124.

Köhler C., Merkle T. and Neuhaus G. (1999) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 18 (1), 97-104.

Krabel D. (2000) Influence of sucrose on cambial activity. In: *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*, R.A. Savidge, J.R. Barnett and R. Napier, eds (Oxford, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited), 9, 113-125.

Kuhn A.J., Schröder W. and Bauch J. (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Holzforschung*, 51, 487-496.

Lacombe B., Pilot G., Michard E., Gaymard F., Sentenac H. and Thibaud J.B. (2000) A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12, 837-851.

Lagrange T., Franzetti B., Axelos M., Mache R. and Lerbs-Mache S. (1993) Structure and expression of the nuclear gene coding for the chloroplast ribosomal protein L21: developmental regulation of a housekeeping gene by alternative promoters. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 2614-2622.

Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B. and Ward J.M. (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 11, 707-

726.

Lam E., Benfey P.N., Gilmartin P.M., Fang R.X. and Chua N.H. (1989) Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 7890-7897.

Langer K. (2000) Kaliumabhängiges Holzwachstum der Pappel: Klonierung und Charakterisierung von Kaliumtransportern aus *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx., Diplomarbeit der Universität Würzburg, 75 S.

Langer K., Ache P., Geiger D., Stinzling A., Arend M., Wind C., Regan S., Fromm J. and Hedrich R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. Plant J., 32, 997-1009.

Langhans M., Ratajczak R., Lützelshwab M., Michalke W., Wächter R., Fischer-Schliebs E. and Ullrich C.E. (2001) Immunolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L.. Planta, 213, 11-19.

Larson P.R. (1967) Assessing wood quality of fertilized coniferous trees. Forest Fertilization Symposium, Gainesville, 275-280.

Lepié J. C., Brasileiro A.C.M., Michel M.F., Delmotte F. and Jouanin L. (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. Plant Cell Rep., 11, 137-141.

Liman E.R., Tytgat J. and Hess P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. Neuron, 9, 861-871.

Linz U. and Degenhardt H. (1990) Die Polymerase-Kettenreaktion. Naturwissenschaften, 77, 515-530.

Marchuk D., Drumm M., Saulino A. and Collins F.S. (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucl. Acids Res.,

19 (5), 1154.

Marten I., Hoth S., Deeken R., Ache P., Ketchum K.A., Hoshi T. and Hedrich R. (1999) AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96, 7581-7586.

Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J.M., Salt D.E., Kim S.A. and Guerinot M. (2001) Phylogenetic relationships within cation-transporter families of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.*, 126, 1646-1667.

Mäser P., Gierth M. and Schroeder J.I. (2002) Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil*, 247, 43-54.

Mattila P., Korpela J., Tenkanen T. and Pitkanen K. (1991): Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucl. Acids Res.*, 19, 4967-4973.

Mellerowicz E.J., Baucher M., Sundberg B. and Boerjan W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol. Biol.*, 47, 239-274.

Morita A., Umemura T.-A., Kuroyanagi M., Futsuhara Y., Perata P. and Yamaguchi J. (1998) Functional dissection of a sugar-repressed α -amylase gene (*RAmy1A*) promoter in rice embryos. *FEBS Lett.*, 412, 81-85.

Murakami Y., Funada R., Sano Y. and Ohtani J. (1999) The differentiation of contact cells and isolation cells in the xylem ray parenchyma of *Populus maximowiczii*. *Ann. Bot.*, 84, 429-435.

Müller-Röber B., Ellenberg J., Provart N., Willmitzer L., Busch H., Becker D., Dietrich P., Hoth S. and Hedrich R. (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K^+ channel expressed in potato guard cells. *EMBO J.*, 14, 2409-2416.

Nakamura R.L., McKendree W.L., Hirsch R.E., Sedbrook J.C., Gaber R.F. and Sussman

M.R. (1995) Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Phys.*, 109, 371-374.

Nakamura M., Tsunoda T. and Obokata J. (2002) Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.*, 29, 1-10.

Nauerby B., Billing K. and Wyndaele R. (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 123, 169-177.

Olsson O. and Little C.H.A. (2000) Molecular control of the development and function of the vascular cambium. In *Molecular Biology of Woody Plants*, Vol. 1, S.M. Jain and S.C. Minocha, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 155-180.

Oparka K.J. and Santa Cruz S. (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Ann. Rev. of Plant Phys. and Plant Mol. Biol.*, 51, 323-347.

Page R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.

Panshin A.J. and de Zeeuw C. (1980) *Textbook of Wood Technology*. McGraw-Hill, New York.

Parsons T.J., Sinkar V.P., Stettler R.F., Nester E.W. and Gordon M.P. (1986) Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Bio/Technology*, 4, 533-536.

Philipp K. (1999) K⁺-Kanäle der Koleoptile von *Zea mays* L. und ihre Beteiligung an auxininduzierten Wachstumsprozessen, Dissertation Universität Würzburg, 136 S.

Philipp K., Fuchs I., Lüthen H., Hoth S., Bauer C., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Böttger M., Becker D. and Hedrich R. (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96, 12186-12191.

Pilot G., Lacombe B., Gaymard F., Cherel I., Boucherez J., Thibaud J.B. and Sentenac H. (2001) Guard cell inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J. Biol. Chem.*, 276 (5), 3215-3221.

Plesch G., Ehrhardt T. and Müller-Röber B. (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.*, 28, 455-464.

Pratelli R., Lacombe B., Torregrosa L., Gaymard F., Romieu C., Thibaud J.-B. and Sentenac H. (2002) A grapevine gene encoding a guard cell K⁺ channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Phys.*, 128, 564-577.

Rasmussen R., Morrison T., Herrmann M. and Wittwer C. (1998) Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2, 8-11.

Reintanz B., Szyroki A., Ivashikina N., Ache P., Godde M., Becker D., Palme K. and Hedrich R. (2002) AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99, 4079-4084.

Rigas S., Debrosses G., Haralampidis K., Vicente-Agullo F., Feldmann K., Grabov A., Dolan L. and Hatzopoulos P. (2001) Trh1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*, 13 (1), 139-151.

Rodriguez-Navarro A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469, 1-30.

Rhodes J., Thain J.F. and Wilson D.C. (1996) The pathway for systemic electrical signal transduction in the wounded tomato plant. *Planta*, 200, 50-57.

Rohde, A., Howe, G.T., Olsen, J.E., Moritz, T., Van Montagu, M., Junttila, O. and Boerjan, W. (2000) Molecular aspects of bud dormancy in trees. In *Molecular Biology of Woody Plants*, Vol. 1, S.M. Jain and S.C. Minocha, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 89-134.

Rohde A., Prinsen E., De Rycke R., Engler G., Van Montagu M. and Boerjan W. (2002) PtABI3 impinges on the growth and differentiation of embryonic leaves during bud set in poplar. *Plant Cell*, 14, 1885-1901.

Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B. and Lucas W.J. (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Opinion in Plant Biol.*, 4, 202-209.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5463-5467.

Santa-Maria G.E., Rubio F., Dubcovsky J. and Rodriguez-Navarro A. (1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*, 9, 2281-2289.

Sauter J.J. (2000) Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems. In: *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*, R.A. Savidge, J.R. Barnett and R. Napier, eds (Oxford, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited), 6, 71-83.

Schachtman D.P., Kumar R., Schroeder J.I. and Marsh E.L. (1997) Molecular and functional characterization of a novel-low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 11079-11084.

Schleyer M. and Bakker E.P. (1993) Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K⁺-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.*, 175, 6925-6931.

Schönknecht G., Spoormaker P., Steinmeyer R., Brüggeman L., Ache P., Dutta R., Reintanz B., Godde M., Hedrich R. and Palme L. (2002) KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Lett.*, 28-30.

Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.-M., Gaymard F. and Grignon C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, 256, 663-665.

Siebert P.D, Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A. and Lukyanov S.A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucl. Acids Res.*, 23(6), 1087-1088.

Spalding E.P., Hirsch R.E., Lewis D.R., Qi Z., Sussman M.R. and Lewis B.D. (1999) Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. *J. Gen. Phys.*, 113, 909-918.

Stadler R. and Sauer N. (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta*, 109, 299-306.

Sterky F., Sharon R., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villarroel R., van Montagu M., Sandberg G., Olsson O., Teeri T., Boerjan W., Gustafsson P., Uhlen M., Sundberg B. and Lundberg J. (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 13330-13335.

Stoesser G., Baker W., van den Broek A., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Lombard V., Lopez R., Parkinson H., Redaschi N., Sterk P., Stoehr P. and Tuli M.A. (2001) The EMBL nucleotide sequence database. *Nucl. Acids Res.*, 29 (1) 17-21.

Stoesser G., Baker W., van den Broek A., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Redaschi N., Stoehr P., Tuli M.A., Tzouvara K. and Vaughan R. (2002) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucl. Acids Res.*, 30(1), 21-26.

Stürzl M. and Roth W.K. (1990) "Run-off" synthesis and application of defined single-stranded DNA hybridisation probes. *Analyt. Biochem.*, 185, 164-169.

Szyroki A., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M.R., Ache P., Reintanz B., Deeken R.,

Godde M., Felle H., Steinmeyer R., Palme K. and Hedrich R. (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98(5), 2917-2921.

Taiz L. and Zeiger E., Sinauer Associates (1998) *Plant Physiology* 2nd ed.: Translocation in the Phloem. Sinauer Associates, S. 256.

Taylor G. (2002) *Populus*: Arabidopsis for Forestry. Do we need a model tree? *Ann. Bot.*, 90, 681-689.

Thum K.E., Kim M., Morishige D.T., Eibl C., Koop H.-U. and Mullet J.E. (2001) Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 47, 353-366.

Tjaden G., Edwards J.W. and Coruzzi G.M. (1995) *Cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast Glutamine synthetase. *Plant Phys.*, 108, 1109-1117.

Toyofuku K., Umemura T.-a. and Yamaguchi J. (1998) Promoter elements required for sugar-repression of the *RAmy3D* gene for α -amylase in rice. *FEBS Lett.*, 428, 275-280.

Tuominen H. (1997): Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå. "Secondary xylem formation in transgenic hybrid aspen trees with an altered Indole-3-Acetic Acid balance".

Tusnady S.D. and Simon I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.*, 283, 489-506.

Tzfira T., Jensen C.S., Wang W., Zuker A., Vinocur B., Altman A. and Vainstein A. (1997) Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol Rep.*, 15, 219- 235.

Uggla C., Moritz T., Sandberg G and Sundberg B. (1996) Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 9282-9286.

Uggla C., Magel E., Moritz T. and Sundberg B. (2001) Function and dynamics of auxin

and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiol.*, 125, 2029-2039.

Ulmasov T., Hagen G. and Guilfoyle T. J. (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.*, 19, 309-319.

Uozumi N., Nakamura T., Schroeder J.I. and Muto S. (1998) Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 9773-9778.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S. and Shinozaki K. (1993) An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 5, 1529-1539.

Véry A.-A. and Sentenac H. (2002) Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 7, 168-175.

Vranova V., Tähtiharju S., Sriprang R., Willekens H., Heino P., Palva E.T., Inze D. and van Camp W. (2001) The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C. *J. Exp. Bot.*, 52, 181-182.

Wardrop A.B. (1981) Lignification and xylogenesis. In: *Xylem cell development*. Ed. J.R. Barnett. Castle House Publ. Ltd., London, 115-155.

Wegener L.H. and de Boer A.H. (1997) Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K⁺ homeostasis and long-distance signaling. *Plant Phys.*, 115, 1707-1719.

Wind C. (2003) Die Funktion des Kaliums bei der Holzbildung – Eine anatomisch-physiologische Analyse anhand der Modellbaumart *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.. Dissertation TU München, 120 S.

Wright J.P. and Fisher D.B. (1981) Measurement of sieve tube membrane potential. *Plant*

Phys., 67, 845-848.

Yanagisawa S. (2000) Dof 1 and Dof 2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.*, 21, 281-288.

Yu D., Chen C. and Chen Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell*, 13, 1527-1539.

Zhao R., Dielen V., Kinet J.-M. and Boutry M. (2000) Cosuppression of a plasma membrane H^+ -ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth and male fertility. *Plant Cell*, 12, 535-546.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
°C	Grad <u>C</u> elcius	EDTA	<u>E</u> thylen- <u>d</u> iamin- <u>t</u> etra- <u>a</u> ccetat
3'-	C-terminal	EDXA	<u>e</u> nergy <u>d</u> ispersive <u>x</u> -ray <u>a</u> nalysis
5'-	N-terminal	eng.	<u>e</u> nglisch
2,4 D	<u>2,4-D</u> ichlorophenoxyessigsäure	fwd	<u>f</u> or <u>w</u> ard (vorwärts, für 5'-3' Primer)
NAA	1- <u>N</u> aphtalenessigsäure (engl. <u>a</u> cetic <u>a</u> cid)	g	<u>G</u> ramm
A	<u>A</u> denin	G	<u>G</u> uanin
ABA	<u>A</u> bscisinsäure (engl. <u>a</u> cid)	GA	<u>G</u> ibberellinsäure (engl. <u>a</u> cid)
AKT	<u>A</u> rabidopsis thaliana <u>K</u> ⁺ - <u>T</u> ransporter	GMP	<u>G</u> uanosin- <u>m</u> ono- <u>p</u> hosphat
AMP	<u>A</u> denosin- <u>m</u> ono- <u>p</u> hosphat	GUS	β - <u>G</u> lucuronidase
AtKC	<u>A</u> rabidopsis thaliana <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel	h	<u>h</u> our (engl. Stunde)
AtKUP	<u>A</u> rabidopsis thaliana <u>K</u> ⁺ <u>u</u> ptake transporter	HAK	<u>h</u> igh- <u>a</u> ffinity <u>K</u> ⁺ -transporter
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat	HCK	Salzsäure
BAP	<u>B</u> enzyl- <u>a</u> mino- <u>p</u> urin	HKT	<u>h</u> igh- <u>a</u> ffinity <u>K</u> ⁺ - <u>T</u> ransporter
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare	IBA	<u>I</u> ndole- <u>b</u> utyric- <u>a</u> ccetat
BSA	<u>B</u> ovin (engl. Rind) - <u>s</u> erum- <u>a</u> lbumin	ICP-OES	<u>O</u> ptical <u>e</u> mission <u>s</u> pectroscopy with an <u>i</u> nductively <u>c</u> oupled <u>p</u> lasma flame
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise	k	<u>k</u> ilo-
C	<u>C</u> ytosin	kb	<u>K</u> ilobasen
ca.	zirka	kDa	<u>K</u> ilodalton
CC	<u>c</u> ompanion <u>c</u> ell (engl. Geleitzelle)	KAT	<u>K</u> ⁺ -Transporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
cDNA	<u>c</u> opy DNA = DNA Kopie von einer mRNA	KCO	<u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel <u>o</u> utward rectifier
cm	<u>Z</u> enti <u>m</u> eter	KEA	<u>K</u> ⁺ <u>e</u> xchange <u>a</u> ntiporter
cm ²	Quadrat <u>z</u> enti <u>m</u> eter	KPT	<u>K</u> ⁺ -channel <i>Populus tremula</i>
CNGC	<u>C</u> yclic- <u>n</u> ucleotide- <u>g</u> ated <u>c</u> hannel	KST	<u>K</u> ⁺ -Transporter aus <i>Solanum tuberosum</i>
cRNA	<u>c</u> opy RNA = RNA Kopie von einer DNA	KT	<u>K</u> ⁺ - <u>T</u> ransporter
C-Terminus	<u>C</u> arboxy-Terminus	KUP	<u>K</u> ⁺ <u>u</u> ptake transporter
d	<u>d</u> ay (engl. Tag)	KZM	<u>K</u> ⁺ -Kanal aus <i>Zea mays</i>
Da	<u>D</u> alton	l	<u>L</u> iter
DEPC	<u>D</u> iethyl <u>p</u> yro <u>c</u> arbonat	LCT	<u>l</u> ow- <u>a</u> ffinity <u>c</u> ation <u>t</u> ransporter
DEVClamp	<u>D</u> ouble- <u>E</u> lectrode- <u>V</u> oltage- <u>C</u> lamp	LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleinsäure (engl. <u>a</u> cid)	μ	Mikro-
Dnase	<u>D</u> esoxyribonuclease	M	<u>M</u> olar
dNTP	<u>d</u> esoxy- <u>N</u> ucleotid- <u>T</u> ri- <u>P</u> hosphat	MF	<u>M</u> ikr <u>i</u> fibrillen
EBI	<u>E</u> uropean <u>B</u> ioinformatics <u>I</u> nstitute	min	<u>M</u> inuten

ml	M illiliter	Rnase	R ibonuclease
MOPS	3 [-N- M orpholino]ethansulfonsäure	rRNA	r ibosomale RNA
mRNA	m essenger (engl. boten) RNA	RT	R aumtemperatur
ms	M illisekunden	RT	r ea t ime (engl. Echtzeit)
MS	M urashige und S koog	sec	S ekunde (engl. s econd)
mV	M illivolt	SDS	engl. für Natrium-Dodecylsulfat
NaOH	N atriumhydroxyd	SE	s ieve e lement (engl. Siebröhre)
N-Terminus	Amino (NH ₃)- T erminus	SIRK	S tomatal I nward R ectifying K ⁺ channel aus <i>Vitis vinifera</i>
ng	N anogramm	SKOR	S telar K ⁺ outward rectifying channel
oligo (dT)	o ligo D esoxy t hymidin	SKT	S olanum t uberosum K ⁺ - T ransporter
PBS	P hosphate b uffered s alt solution	SL-Zone	s econdary wall formation and i nignification z one
PCR	P olymerase Kettenreaktion (engl. c hain r eac-tion)	T	T hymidin
Poly-A ⁺ -	P oly A denin	TBE	T ris- B or- E DTA- P uffer
pmol	P icomol = 10 ⁻¹² Mol	TEM	T ransmissions e lektronen m ikroskop
PTORK	P opulus t remula outward rectifying	tRNA	t ransfer RNA
PTK	P opulus t remula K ⁺ -channel	UV	U ltraviolett
PtKUP	P opulus t remula K ⁺ uptake transporter	V	V olt
RACE	r apid a mplification of c DNA e nds	VFK	V icia f aba K ⁺ -channel
RE-Zone	r adial e nlargement z one	(v/v)	v olume/ v olume (engl. Volumen)
rATP	r ibo- A denosin t ri p hospat	(w/v)	w eight/ v olume (engl. Gewicht/ Volumen)
REM	R asterelektronen m ikroskop	xg	-mal Erdbeschleunigung
rev	r everse (rückwärts, für 3'-5' Primer)	z.B.	zum B eispiel
RNA	R ibonucleinsäure (engl. a cid)	ZMK	Z ea m ais K ⁺ -Transporter

8.2 Verwendete Geräte und aufgeführte Firmen

AGS, Heidelberg	Landgraf, Langenhagen
A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia Biotech)	LEHLE SEEDS, Round Rock, USA
Ambion über AMS Biotechnology, Wiesbaden	Leitz, Wetzlar
Amersham Biosciences, Freiburg	LightCycler (Roche), Penzberg
Apple, Cupertino, USA	Microm, Walldorf
Appligene Oncor, Heidelberg	MWG, Ebersberg
Beckman, Palo Alto, Kalifornien, USA	Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan
Biometra, Göttingen	Nasco, Fort Atkinson, Texas, USA
Bio-RAD, München	National Biosciences, Plymouth, England
Biozym, Hessisch Oldendorf	New England Biolabs, Schwalbach
Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen	Netzgerät für die Elektrophorese: Mini Power Pack P20 (Biometra)
Clontech, Heidelberg	NPI electronics
Dianova, Hamburg	

Drummond Scientific Company	Osram, München
Dynal, Hamburg	PeqLab, Erlangen
Easy-Cast Elektrophoresegeräte (AGS)	Pharmacia LKB, Freiburg
Eppendorf, Hamburg	Promega über Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Geigermüllerzählrohr Contamat FHT 111G	Qiagen, Hilden
Genequant II (Pharmacia Biotech)	Retsch, Haan
General Valve, Brookshire, Texas, USA	ROTH, Karlsruhe
Genomed, Bad Oeynhausen	Schlag GmbH, Bergisch Gladbach
GFL, Burgwedel	Schleicher & Schuell, Dassel
Gibco BRL, Eggenstein	Schüttler Typ 3017, (GFL)
GS 15-R Kühlzentrifuge (Beckman)	Serva über Boehringer Ingelheim, Heidelberg
HEKA, Lambrecht	Sigma, Deisenhofen
Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim	Sigma ARK, Darmstadt
Hitachi Software Engineering Europe, Olivet Cedex, Frankreich	Stratagene, Heidelberg
Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornien, USA	Sutter Instruments Corporation, Novato, CA, USA
ICN Biomedicals GmbH, Eschwege	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Invitrogen, NV Leek, Holland	TIB MolBiol, Berlin
	Tischzentrifuge Z 160 M (Hermle)
	Tropix über Boehringer Ingelheim, Heidelberg

8.3 Oligonukleotidprimer

Oligonukleotidprimer zur Synthese der cDNA-Moleküle *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1*

PTK2 Mrev	5'-GTG CAT TCT TGT TCC CCT TCA C-3'
PTK2 Mrev nest	5'-AAG CAT TTC GTT GAG GCT CGT G-3'
PTK2 VL fwd	5'-GGG CAC GTA ACG AGT T-3'
PTK2 VL rev	5'-TGC CTG ATG AGT ATT GAT TG-3'
PtKUP1 Mrev	5'-CCG GCA TCT TTG GCT TCC-3'
PtKUP1 Mrev nest	5'-CAC GGG AAT CCT TGT ATG TTG-3'
PtKUP1 VL fwd	5'-ACC GCA AAA CAC TCT AAA AA-3'
PtKUP1 VL rev	5'-CGG CCC TCT AAG CAA T-3'
5'-KPT1 GSP1	5'-CCC ATA CCC TGT TGT GGT T-3'
Nested 5'-KPT1 GSP2	5'-TGC AGT CAC GTA TCT ATT CCA TAG T-3'
3'-KPT1 GSP1	5'-ATA CCC TGA TCC GAA GAG AAC C-3'
Nested 3'-KPT1 GSP2	5'-TAC CAC ATT AAC CAC AAC AGG G-3'
KPT1 VL fwd	5'-TGA GAA TTC AAG CAA CCA GTG-3'
KPT1 VL rev	5'-CAC TTG GCC ATG ATG TCT TGC-3'

Marathon™ cDNA Amplification Kit:

AP1	5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'
AP2	5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3'

Smart™ cDNA Library Construction Kit:

SMART III Oligonukleotid	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG GCC GGG-3'
CDS III/ 3'PCR Primer	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T) ₃₀ N ₁ -3' (N = A, G, C or T; N ₁ = A, G or C)
5'PCR Primer	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'

Oligonukleotidprimer zur Isolierung Promotorregionen von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1*

PTORKpromGSP1	5'-AAT ATA AGC ATC AGA AAC GGA AGA CT-3'
PTORKpromGSP2	5'-CAT GAT GGT TTA CTT TCC CCT CTA AG-3'
PTORK_prom_VL_5'_SstI	5' GACT GAG CTC GGG CTG GTG TCG TTT TTA T-3'
PTORK_prom_VL_3'_BamHI	5' GACT GGA TCC AAT CTG CAA GAA TTT CAA CAG-3'
PTK2promGSP1	5'-TCA GAA ATG CAA CTT CAA AAG GGT AT-3'
PTK2promGSP2	5'-CTA TAG GAT TCT GGT TAA AGC TGG AA-3'
PTK2_prom_VL_5'_SstI	5' GACT GAG CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG-3'
PTK2_prom_VL_3'_BamHI	5' GACT GGA TCC GCT AGA GGT CAG GTG AAG ATT GTA-3'
KPT1promGSP1	5'-AGA ACA ACC AGC CAC ATC TCC CAA GC-3'
KPT1promGSP2	5'-GAA GTT TGG TTG CCC GAT TTA TCT GG-3'
PtKUP1promGSP1	5'-CAA AAA CGG TGT CTT CAT TCT GAT AA-3'
PtKUP1promGSP2	5'-ATA TAA CGG TGG AGT GCT TAA GTC AC-3'
PtKUP_prom_VL_5'_SstI	5' GACT GAG CTC TGG TCG ACG GCC CGG GCG GTC TGT A-3'
PtKUP_prom_VL_3'_BamHI	5' GACT GGA TCC GCT CGA AAC AGA AAT CAA AAC GAC A-3'

Universal GenomeWalker™ Kit

AP1	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
AP2	5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3'

Oligonukleotidprimer zur Expressionsanalyse von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und *PtKUP1*

PTORK LC fwd	5'-CAG GGG CAT CAC TGG CA-3'
PTORK LC rev	5'-GGT AAC CAC CTG AAG AT-3'
PTORK N fwd	5'-TGC TGC TTT TGA TGG GGA TT-3'
PTORK N rev	5'-GAA TTT TGC CAC CGT TTT CAG-3'
PTK2 fwd BglII	5'-CAG ATC TGG GCA CGT AAC GAA GTT-3'
PTK2 rev BglII	5'-GAG ATC TTG CCT GAT GAG TCT TGA TTG-3'
PTK2 LC fwd	5'-ATG CGA TAT ACA CCT G-3'
PTK2 LC rev	5'-TGC TCA CCC TAA TAC A-3'
PTK2 N fwd	5'-GCG GAA GTT GCT GAA G-3'
PTK2 N rev	5'-AAA GAT GCG GAT AAA CAT TAG-3'
PTK2 is fwd	5'-TCA TGA GTT CTC TTC C-3'
PTK2 is rev	5'-CGA TGA TGA TCC TTT G-3'
KPT1 LC fwd	5'-GAT GTC CCC ATG ATA GG-3'
KPT1 LC rev	5'-CAT GAT GTA TTG CGC T-3'

PtKUP1fwd BglII	5'-CAG ATC TAC CGC AAA ACA CTC TAA AAA-3'
PtKUP1rev BglII	5'-GAG ATC TCG GCC CTC TAA GCA AT-3'
PtKUP1 LC fwd	5'-CCC AAA CTT TAC AGG A-3'
PtKUP1 LC rev	5'-TCG CCT TAA TAT GAG AGT-3'
PtKUP1 N fwd	5'-GCC CCA AAC CTT ACA GGA-3'
PtKUP1 N rev = PtKUP1 VL rev	5'-CGG CCC TCT AAG CAA T-3'
PtACT2 fwd	5'-CCC AGA AGT CCT CTT-3'
PtACT2 rev	5'-ACT GAG CAC AAT GTT AC-3'

Oligonukleotidprimer zur Sequenzierung der cDNA-Moleküle *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und

PtKUP1

PTORK NT 2 fwd	5'-AGT CGG GCC AAA AGA GTG-3'
PTORK CT 2 rev	5'-CTC CTT TAG AAC CGC AAC AT-3'
PTK NT 2 rev	5'-GGG GTT CTT CCT TTG GAG TC-3'
PTK NT 2 fwd	5'-GGC ATC CAC TGT CCC CTT CG-3'
3'KPT1 T7 2	5'-ATG GCA GGA GAC ACG TTT G-3'
KPT1 fwd	5'-TGG TTT TAA CAT CCT CAG C-3'
KPT1 rev	5'-TAA CCA TTT CAA CAT GCC C-3'
PtKUP NT 2 fwd	5'-CGG CGG ATG AGG AGA TTT-3'
PtKUP NT 2 rev	5'-CGC CTT AAT ATG AGA GTG AC-3'

Oligonukleotidprimer zur Sequenzierung der Promotoren von *PTORK*, *PTK2*, *KPT1* und

PtKUP1

PTORKprom-M13rev	5'-AGC CCC ATT AAT TAT GTG C-3'
PTORKprom-M13uni	5'-TAG CAT TTT AAA TTT CTT C-3'
PTORKprom-SP6-2	5'-AAT ACT ATT TTG ATA TGA ACT CC-3'
PTORKprom-T7-2	5'-AGT TGA TAA GGG ATT CTA ACA GC-3'
PTORKprom-SP6-3	5'-TGA TAA ACT GAA AGA AAA TGA AG-3'
PTORKprom-T7-3	5'-ACG ATA AAT GAG TAA ATC AAA GG-3'
3'prom-PTORK-SP6	5'-TGA CTG GCA GTA GTA ATC-3'
3'prom-PTORK-T7	5'-AAG CGA GGG AGG TAA GTA-3'
3'prom-PTK2-SP6	5'-GGA TGG CAA TTA GAC CTA-3'
3'prom-PTK2-T7	5'-AAC TGA AGC CCA CAA ATC-3'
3'prom-PtKUP-SP6	5'-CCC-AAT CCC TAA TAA TCT-3'
3'prom-PtKUP-SP6-2	5'-GCA AAA TAA TAA ATG ATA AAG TT-3'
3'prom-PtKUP-T7	5'-CGG GTT TCT TTT TCT TCT-3'

8.4 Sequenzen

8.4.1 cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz

8.4.1.1 PTK2

																		Start ⇒
5'	CCC	GGG	CAC	GTA	ACG	AAG	TTC	ACT	CCA	TAC	AAT	CTT	CAC	CTG	ACC	TCT	AGC	ATG
	P	G	H	V	T	K	F	T	P	Y	N	L	H	L	T	S	S	M
	AGG	AGG	AGC	TCG	AAG	AAC	TAC	CAA	GAA	CAT	GAT	TCT	GAA	AAC	CCA	CAC	CAA	GAA
	R	R	S	S	K	N	Y	Q	E	H	D	S	E	N	P	H	Q	E
	GAA	GAT	GAC	TCT	CCT	CTT	TCT	CTC	TCA	AGC	TTG	TCA	AAG	ATT	ATT	CTT	CCT	CCT
	E	D	D	S	P	L	S	L	S	S	L	S	K	I	I	L	P	P
	CTC	GGT	GTT	TCC	AGC	TTT	AAC	CAG	AAT	CCT	ATA	GAG	TCC	AAG	GGG	TGG	ATA	ATC
	L	G	V	S	S	F	N	Q	N	P	I	E	S	K	G	W	I	I
	TCT	CCT	GTG	GGC	TCA	AGA	TAC	AGG	TGC	TGG	GGG	ACA	ATT	ATG	GCG	GTT	TTG	GTA
	S	P	V	G	S	R	Y	R	C	W	G	T	I	M	A	V	L	V
	GCT	TAT	TCT	CTG	TGG	GTA	TAC	CCT	TTT	GAA	GTT	GCA	TTT	CTG	AAC	TCC	TCG	CCG
	A	Y	S	L	W	V	Y	P	F	E	V	A	F	L	N	S	S	P
	TAT	AGA	GCA	CTG	TAC	ATC	GCC	GAC	AAC	GTT	GTC	GAC	CTC	TTT	TTT	GCT	GTG	GAT
	Y	R	A	L	Y	I	A	D	N	V	V	D	L	F	F	A	V	D
	ATC	GTT	CTA	ACA	TTC	TTC	GTT	GCA	TAC	ATC	GAC	TCA	AGA	ACA	CAA	CTG	CTT	GTT
	I	V	L	T	F	F	V	A	Y	I	D	S	R	T	Q	L	L	V
	CGT	GAC	AGA	AGA	AAG	ATT	GCT	CGG	AGG	TAC	CTC	TCA	ACA	TGG	TTT	TTG	ATG	GAT
	R	D	R	R	K	I	A	R	R	Y	L	S	T	W	F	L	M	D
	GTG	GCA	TCC	ACT	GTC	CCC	TTC	GAA	CTA	CTG	GCC	TAC	TTG	TTC	ACA	GGC	AAT	GAA
	V	A	S	T	V	P	F	E	L	L	A	Y	L	F	T	G	N	E
	AAA	GTA	GGG	CTC	TCT	TAT	TCC	CTC	CTG	GGC	CTG	CTC	AGA	TTC	TGG	AGA	CTT	CGA
	K	V	G	L	S	Y	S	L	L	G	L	L	R	F	W	R	L	R
	AGA	GTT	AAG	CAA	CTC	TTC	ACT	AGA	CTT	GAG	AAG	GAT	ATC	AGA	TTT	AGC	TAC	TTT
	R	V	K	Q	L	F	T	R	L	E	K	D	I	R	F	S	Y	F
	TGG	GTC	CGA	TGT	GCT	AGG	TTA	CTG	TGT	GTG	ACA	CTA	TTT	CTT	GTG	CAC	TGT	ACT
	W	V	R	C	A	R	L	L	C	V	T	L	F	L	V	H	C	T
	GGT	TGC	CTC	TAC	TAC	TTG	CTA	GCT	GAC	AGA	TAC	CCG	CAC	AAA	GGG	AAG	ACA	TGG
	G	C	L	Y	Y	L	L	A	D	R	Y	P	H	K	G	K	T	W
	ATA	GGT	GCT	GTG	ATA	CCA	AAT	TTC	AGA	GAG	ACA	AGC	CTT	TGG	ATC	AGA	TAT	ATT
	I	G	A	V	I	P	N	F	R	E	T	S	L	W	I	R	Y	I

TCA	GCC	819	TAC	TGG	828	ATC	ACC	837	ATG	ACT	846	GTT	GGT	855	GAT	864	CTC							
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---							
S	A	M	Y	W	S	I	T	T	M	T	T	V	G	Y	G	D	L							
CAT	GCT	873	AAC	TCC	882	GAA	ATG	891	ATT	TTC	900	ATC	TTC	909	ATG	CTC	918	TTC	AAC					
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
H	A	Q	N	S	M	E	M	I	F	I	I	F	Y	M	L	F	N							
CTT	GGT	927	CTA	ACT	936	TAT	TTG	945	ATC	GGT	954	ACA	AAT	963	CTA	GTC	972	GTC	GAA	GGA				
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
L	G	L	T	A	Y	L	I	G	N	M	T	N	L	V	V	E	G							
ACT	CGA	981	CGT	ACC	990	ATG	GAA	999	TTT	AGG	1008	AAC	AGC	1017	ATT	GAA	1026	GCA	GCA	TCA	AAT	TTT	GTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	R	R	T	M	E	F	R	N	S	I	E	A	A	S	N	F	V							
AGC	AGA	1035	AAC	CGT	1044	TTG	CCT	1053	CCA	AGA	1062	TTA	AAG	1071	GAT	CAG	1080	ATA	TTG	GCA	TAT	ATG	TGC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	R	N	R	L	P	P	R	L	K	D	Q	I	L	A	Y	M	C							
TTG	AGG	1089	TTC	AAG	1098	GCT	GAG	1107	AAC	TTG	1116	AAC	CAG	1125	CAT	CAA	1134	TTG	ATT	GAA	CAG	CAA	CCA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	R	F	K	A	E	N	L	N	Q	H	Q	L	I	E	Q	Q	P							
AAA	TCC	1143	ATC	TGC	1152	AAA	AGC	1161	ATT	TGC	1170	CTG	CAT	1179	TTT	CTG	1188	CCT	ACA	GTG	AAG	AAG		
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	S	I	C	K	S	I	C	L	H	L	F	L	P	T	V	K	K							
GTC	TAT	1197	CTT	TTC	1206	GAT	GGT	1215	ATC	TCA	1224	AGG	GAA	1233	ACA	CTC	1242	TTG	CAG	CTG	GTT	GCG	AAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	Y	L	F	D	G	I	S	R	E	T	L	L	Q	L	V	A	K							
ATC	AAA	1251	ACT	GAG	1260	TAC	ATC	1269	CCA	CCG	1278	AGA	GAA	1287	GAT	GTA	1296	GTC	ATG	CAA	AAT	GAA	GCT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	K	T	E	Y	I	P	P	R	E	D	V	V	M	Q	N	E	A							
CCA	GAT	1305	GAT	ATT	1314	TAC	ATA	1323	ATT	GTA	1332	TCA	GGA	1341	GAG	GTT	1350	GAG	ATC	ATC	GAA	TCC	CAT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	D	D	I	Y	I	I	V	S	G	E	V	E	I	I	E	S	H							
CTA	GAG	1359	AAG	GAA	1368	CGA	GCT	1377	GTG	GGG	1386	ACT	TTG	1395	CGT	TCT	1404	GGG	GAC	ATG	TTT	GGA	GAA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	E	K	E	R	A	V	G	T	L	R	S	G	D	M	F	G	E							
CTG	GGT	1413	GCG	CTT	1422	TGT	TGC	1431	AGA	CCT	1440	CAG	AGC	1449	CAT	TTA	1458	TTT	CGA	ACG	AAA	ACA	CTC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	G	A	L	C	C	R	P	Q	S	H	L	F	R	T	K	T	L							
TCA	CAG	1467	CTC	CTG	1476	AGG	ATC	1485	AAA	ACC	1494	ACA	GCT	1503	CTT	TTA	1512	AAA	GCA	ATG	CAG	ACC	AAT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	Q	L	L	R	I	K	T	T	A	L	L	K	A	M	Q	T	N							
CAA	GAC	1521	GAT	TAC	1530	GTA	GCT	1539	ATT	ATG	1548	AAG	AAC	1557	TTT	CTT	1566	CAG	CAT	TAC	AAA	AGG	CTT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	D	D	Y	V	A	I	M	K	N	F	L	Q	H	Y	K	R	L							
AAG	GGT	1575	TTG	AAG	1584	ATT	GGA	1593	GAT	TTA	1602	ACT	GTT	1611	GAG	AAT	1620	GGA	GAA	GAA	GAG	GAT	GAA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	G	L	K	I	G	D	L	T	V	E	N	G	E	E	E	E	D	E						
CCA	AAC	1629	ATG	GCT	1638	TTC	AAC	1647	TTG	CTA	1656	GCT	ACA	1665	GCA	AGC	1674	ACA	GGC	AAT	GCT	GCT	TTT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	N	M	A	F	N	L	L	A	T	A	S	T	G	N	A	A	F							

CTT	1683			1692			1701			1710			1719			1728		
---	GAA	GAG	CTT	CTC	AGG	GCA	AAA	TTG	GAT	CCT	GAT	GTT	GGA	GAC	TCC	AAA	GGA	
---	L	E	E	L	L	R	A	K	L	D	P	D	V	G	D	S	K	G
AGA	1737			1746			1755			1764			1773			1782		
---	ACC	CCA	TTG	CAC	ATA	GCA	GCA	TCA	AAA	GGA	CAT	GAA	GAG	TGT	GTG	GTG	GTG	
---	R	T	P	L	H	I	A	A	S	K	G	H	E	E	C	V	V	V
CTC	1791			1800			1809			1818			1827			1836		
---	CTT	AGG	CAT	GGA	TGC	GAT	ATA	CAC	CTG	AGA	GAT	GTT	AAT	GGT	AAT	ACT	GCT	
---	L	L	R	H	G	C	D	I	H	L	R	D	V	N	G	N	T	A
TTA	1845			1854			1863			1872			1881			1890		
---	TGG	GAA	GCC	ATA	TCA	TCG	AAG	CAT	CAT	TCC	ATA	TTT	AGG	ATT	CTC	TTT	CAA	
---	L	W	E	A	I	S	S	K	H	H	S	I	F	R	I	L	F	Q
AAT	1899			1908			1917			1926			1935			1944		
---	GCT	TCC	GTT	TCT	GAC	CCT	CAC	GCC	GCG	GGT	GAT	CTC	TTA	TGC	ACC	GCT	GCA	
---	N	A	S	V	S	D	P	H	A	A	G	D	L	L	C	T	A	A
AAA	1953			1962			1971			1980			1989			1998		
---	CAA	AAC	GAT	CTG	ATG	GTG	ATG	AAG	GAA	CTA	CTG	AAA	CAA	GGA	TTG	AAT	GTT	
---	K	Q	N	D	L	M	V	M	K	E	L	L	K	Q	G	L	N	V
GAT	2007			2016			2025			2034			2043			2052		
---	TCA	AAG	GAT	CGC	CAT	GGA	AAA	ACA	GCA	CTC	CAA	GTA	GCC	ATG	GCA	GAG	AAT	
---	D	S	K	D	R	H	G	K	T	A	L	Q	V	A	M	A	E	N
CAT	2061			2070			2079			2088			2097			2106		
---	GGG	GAC	ATG	GTA	AAC	TTG	CTA	GTA	ATG	AGC	GGC	GCG	GAA	GTT	GCT	GAA	GCA	
---	H	G	D	M	V	N	L	L	V	M	S	G	A	E	V	A	E	A
AAC	2115			2124			2133			2142			2151			2160		
---	ACT	CAT	GAG	TTC	TCT	TCC	ACG	AGC	CTC	AAC	GAA	ATG	CTT	CAA	AAG	AGA	GAG	
---	N	T	H	E	F	S	S	T	S	L	N	E	M	L	Q	K	R	E
ATC	2169			2178			2187			2196			2205			2214		
---	GGA	CAC	CGA	ATT	ACG	GTG	CCT	GAT	GTC	TTG	ACA	GCT	AAT	GAA	GTG	CTT	TTA	
---	I	G	H	R	I	T	V	P	D	V	L	T	A	N	E	V	L	L
AAG	2223			2232			2241			2250			2259			2268		
---	AGG	TGT	GAA	GGG	GAA	CAA	GAA	TGC	ACC	TCA	TGT	ACT	GGT	AAA	TCC	AAA	GGA	
---	K	R	C	E	G	E	Q	E	C	T	S	C	T	G	K	S	K	G
TCA	2277			2286			2295			2304			2313			2322		
---	TCA	TCG	GAT	TGT	ATT	AGG	GTG	AGC	ATA	TAC	AGA	GGA	CAT	CCC	ATG	GTT	AGA	
---	S	S	S	D	C	I	R	V	S	I	Y	R	G	H	P	M	V	R
AGA	2331			2340			2349			2358			2367			2376		
---	CAA	ACT	TGC	TGT	GTG	GAA	GCT	GGG	AGA	TTG	ATC	AAG	TTG	CCA	AAT	TCC	CTA	
---	R	Q	T	C	C	V	E	A	G	R	L	I	K	L	P	N	S	L
GAG	2385			2394			2403			2412			2421			2430		
---	GAG	CTA	AAG	AGC	ATT	GCA	GGT	GAA	AAG	TTT	GGA	TTC	GAT	GCA	AGA	AAT	GCC	
---	E	E	L	K	S	I	A	G	E	K	F	G	F	D	A	R	N	A
ATG	2439			2448			2457			2466			2475			2484		
---	GTG	ACA	GAT	GAA	GAA	GGT	TCA	GAG	GTT	GAC	TCC	ATT	GAA	GTG	ATT	AGA	GAC	
---	M	V	T	D	E	E	G	S	E	V	D	S	I	E	V	I	R	D
AAG	2493			2502			2511			2520			2529			2538		
---	GAC	AAG	CTT	TTC	ATA	GTT	GAA	GAT	CCA	ACT	TGC	TTA	ATC	CAT	TTG	GAT	GGA	
---	K	D	K	L	F	I	V	E	D	P	T	C	L	I	H	L	D	G

← **Stopp**
 2547 2556 2565 2574 2583 2592
 AAC **TAG** CTA GTT AAG GTT GCA ATC AAT ACT CAT CAG GCA TAC ATA ATT TTA TAG

 N * L V K V A I N T H Q A Y I I L *

 2601 2610 2619 2628 2637 2646
 ACA AGT ACG TAC TTA GAT CGA TCT CAC TTG ATA ATT AGC ATA TAT GCA AAT GTT

 T S T Y L D R S H L I I S I Y A N V

 2655 2664 2673 2682 2691 2700
 TAT ATG CTT CGT CTA AGG TCT CTA ATG TTT ATC CGC ATC TTT TAG CTG CTT CTT

 Y M L R L R S L M F I R I F * L L L

 2709 2718 2727 2736 2745 2754
 TGA TAT TTG GCA TCA AAT ATA TAT ATT GTA GCT GCA ATT TGT TTT TTT CAA TTT

 * Y L A S N I Y I V A A I C F F Q F

 2763 2772 2781 2790 2799 2808
 TTT GGT ATG TTG TTT ATT TCC TTA TAT ATT TTT GTT TGG GTG TCC TGT AAA TAA

 F G M L F I S L Y I F V W V S C K *

 2817 2826 2835 2844 2853 2862
 ATT TTC TAT GTT CCC GTC ATC TAT TGA CAT CTT CTA ATA CAA TAT TAT ACT TCT

 I F Y V P V I Y * H L L I Q Y Y T S

 CAA T 3'

 Q

8.4.1.2 KPT1

Start ⇒
 5' 9 18 27 36 45 54
 TGA TTA ATT AAG **ATG** GCA TTT TCC TAT GCC AAG TTC TTC TTC CAA CGC TTC TGT

 * L I K **M** A F S Y A K F F F Q R F C

 63 72 81 90 99 108
 TCC GAA GAG GTT CAT GTG GAG GGT GTT TCT CGT GGC AGC TTC TTC TCG AGC GAT

 S E E V H V E G V S R G S F F S S D

 117 126 135 144 153 162
 CTC CTA CCA TCC CTG GGA GCC CAG ATA AAT CGG GCA ACC AAA CTT CGA AGA TAC

 L L P S L G A Q I N R A T K L R R Y

 171 180 189 198 207 216
 ATA ATT TCC CCT TAC AAC TCC TGT TAT AGG GCT TGG GAG ATG TGG CTG GTT GTT

 I I S P Y N S C Y R A W E M W L V V

 225 234 243 252 261 270
 CTA GTC GTT TAC TCT GCC TGG TTC TCT CCA TTT GAG TTT GCT TTC CTA ACA TCC

 L V V Y S A W F S P F E F A F L T S

 279 288 297 306 315 324
 AAG AAA GAT GCC CTC TTC ATC TTT GAC AAC ATT GTC AAC GGT TTT TTT GCT GTT

 K K D A L F I F D N I V N G F F A V

 333 342 351 360 369 378
 GAT ATT GCT CTC ACC TTC TTC GTT GCG TTT CTA GAT AGC CAC TCT TAC CTC CTT

 D I A L T F F V A F L D S H S Y L L

ATC	GAC	387	GAC	CCT	AAG	396	AAG	ATA	GCA	405	ATA	AGG	TAC	414	ATA	TCA	ACG	423	TGG	TTT	ATT	432	TTC
I	D	D	P	K	K	I	A	I	R	Y	I	S	T	W	F	I	F						
GAT	GTC	441	TGC	TCG	ACA	450	GCC	CCA	TTC	459	CAG	TCT	CTT	468	AGT	CTC	CTG	477	TTC	AGA	AAT	486	CAC
D	V	C	S	T	A	P	F	Q	S	L	S	L	L	F	R	N	H						
GGT	AAT	495	GGA	CTT	GGT	504	TTT	AAC	ATC	513	CTC	AGC	ATG	522	CTC	AGA	CTT	531	TGG	CGT	CTC	540	AGA
G	N	G	L	G	F	N	I	L	S	M	L	R	L	W	R	L	R						
CGA	GTC	549	AGT	GCC	TTG	558	TTT	GCA	AGA	567	CTT	GAG	AAG	576	GAC	ATC	AGG	585	TTC	AAC	TAT	594	TTT
R	V	S	A	L	F	A	R	L	E	K	D	I	R	F	N	Y	F						
TGG	ACT	603	CGG	TGC	ACA	612	AAA	CTT	GTT	621	TCT	GTA	ACC	630	CTG	TTT	GCA	639	GTA	CAC	TGT	648	GCT
W	T	R	C	T	K	L	V	S	V	T	L	F	A	V	H	C	A						
GGA	TAC	657	TTT	AAC	TAT	666	TTG	ATT	GCA	675	GAT	AGA	TAC	684	CCT	GAT	CCG	693	AAG	AGA	ACC	702	TGG
G	Y	F	N	Y	L	I	A	D	R	Y	P	D	P	K	R	T	W						
ATC	GGT	711	GCA	GTA	AAC	720	CCA	AAT	TTT	729	AAA	GAG	GAG	738	AGA	CTA	TGG	747	AAT	AGA	TAC	756	GTG
I	G	A	V	N	P	N	F	K	E	E	R	L	W	N	R	Y	V						
ACT	GCA	765	ATG	TAC	TGG	774	TCT	ACT	ACC	783	ACA	TTA	ACC	792	ACA	ACA	GGG	801	TAT	GGG	GAC	810	CTG
T	A	M	Y	W	S	T	T	T	L	T	T	T	G	Y	G	D	L						
CAT	GCT	819	GAG	AAC	CCC	828	AGG	GAG	ATG	837	CTT	TTT	GAC	846	ATT	TTT	TAC	855	ATG	CTG	TTC	864	AAC
H	A	E	N	P	R	E	M	L	F	D	I	F	Y	M	L	F	N						
TTG	GGT	873	TTG	ACC	TCA	882	TAC	CTC	ATT	891	GGA	AAC	ATG	900	ACA	AAC	CTT	909	GTA	GTT	CAC	918	TGG
L	G	L	T	S	Y	L	I	G	N	M	T	N	L	V	V	H	W						
ATC	AGC	927	CGC	ACA	AGG	936	AAC	TTT	AGA	945	GAG	ACA	GTC	954	AGA	GCT	GCT	963	TCA	GAA	TTC	972	GCT
I	S	R	T	R	N	F	R	E	T	V	R	A	A	S	E	F	A						
GCA	CGA	981	AAT	CAG	TTG	990	CCT	CGC	ACA	999	CAG	GAA	CAA	1008	ATG	TTG	TCA	1017	CAC	ATA	TGC	1026	
A	R	N	Q	L	P	P	R	T	Q	E	Q	M	L	S	H	I	C						
CTC	AAG	1035	TTC	AAA	ACA	1044	GAA	GGA	TTG	1053	AAG	CAG	CAA	1062	GAG	ACC	TTA	1071	AAT	GGT	CTG	1080	CCA
L	K	F	K	T	E	G	L	K	Q	Q	E	T	L	N	G	L	P						
AAA	GCC	1089	ATT	CGT	TCA	1098	AGC	ATT	GCA	1107	GAC	TAT	CTC	1116	TTC	CAT	CCT	1125	ATT	GCT	CAA	1134	AGA
K	A	I	R	S	S	I	A	D	Y	L	F	H	P	I	A	Q	R						
GCT	TAT	1143	CTC	TTC	CGA	1152	GGG	GTT	TCT	1161	CAG	GAC	TTC	1170	CTT	TTC	CAA	1179	CTG	GTT	TCA	1188	GAA
A	Y	L	F	R	G	V	S	Q	D	F	L	F	Q	L	V	S	E						
ATG	GAG	1197	GCC	GAA	TAT	1206	TTT	CCA	CCC	1215	AAG	GAG	GAT	1224	GTA	ATA	CTG	1233	CAG	AAC	GAA	1242	GCT
M	E	A	E	Y	F	P	P	K	E	D	V	I	L	Q	N	E	A						

CCT	ACA	GAT	CTC	TAC	ATA	CTC	GTC	TCG	GGA	ACA	GTG	GAT	TTG	ATT	TCG	TGT	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	T	D	L	Y	I	L	V	S	G	T	V	D	L	I	S	C	V
GAT	GGA	CGT	GAA	AAG	GTT	ATT	GGG	AAA	GCA	ATG	GCA	GGA	GAC	ACG	TTT	GGC	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	G	R	E	K	V	I	G	K	A	M	A	G	D	T	F	G	E
TTT	GGA	GTT	TTA	TGT	TCC	AGG	CCG	CAA	CCT	TAC	ACA	GTT	AGA	ACC	ACC	GAG	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	G	V	L	C	S	R	P	Q	P	Y	T	V	R	T	T	E	L
TCT	CAA	ATA	CTA	CGA	CTG	AAC	GGA	ACT	GCT	CTC	ATG	AGC	ACC	ATA	AAA	GCG	AAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	Q	I	L	R	L	N	G	T	A	L	M	S	T	I	K	A	N
CCA	GAA	GAT	GGG	TGC	GTC	ATA	ATG	AAT	CAT	CTT	TCC	ATG	AAA	CTG	CGG	AGG	CCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	E	D	G	C	V	I	M	N	H	L	S	M	K	L	R	R	P
GAA	AGC	ATG	GAT	TCT	GAA	TCC	CAA	AAC	AGA	GAA	GAA	TGG	TGC	TCT	AAG	AGA	GGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	S	M	D	S	E	S	Q	N	R	E	E	W	C	S	K	R	G
TGT	AAA	GAT	CAT	ATG	GAC	GGA	GAT	CTA	TCA	GTG	AAC	AAA	GCA	AGA	GAG	ACA	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	K	D	H	M	D	G	D	L	S	V	N	K	A	R	E	T	D
TCC	CAG	GGA	TCA	AAG	GCT	ACA	AGA	AAG	AGT	GAA	TTA	GGC	AAA	GGT	TAT	GAT	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	Q	G	S	K	A	T	R	K	S	E	L	G	K	G	Y	D	C
ACC	AGA	CAT	GAA	GGG	TTA	GAA	ACA	GCA	GTT	GAG	GAT	AGC	GAA	ACG	GCT	CTT	CAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	R	H	E	G	L	E	T	A	V	E	D	S	E	T	A	L	H
GCT	GCT	GTT	TGC	GAG	GGG	CAT	GTT	GAA	ATG	GTT	AAG	ATT	TTG	CTT	GAA	GGA	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	A	V	C	E	G	H	V	E	M	V	K	I	L	L	E	G	G
GCA	AAC	ATA	AAC	AAA	CCA	GAT	GCC	AGA	GGA	TGG	ACC	CCA	AAA	GCT	CTA	GCC	GAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	N	I	N	K	P	D	A	R	G	W	T	P	K	A	L	A	E
CAG	CAA	GGA	AAT	AAA	AGC	ATA	CAT	GAT	CTC	TTA	CTA	AAT	TAC	GAA	AAT	AGG	AAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	Q	G	N	K	S	I	H	D	L	L	L	N	Y	E	N	R	N
ATA	TTA	AAT	GAA	CAT	AGA	ATA	GAT	TTT	ATC	GAG	TCA	GAA	ACT	GTA	GGT	GAC	ACC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	L	N	E	H	R	I	D	F	I	E	S	E	T	V	G	D	T
AAG	AAA	AGT	CAA	GAG	AAA	CAT	GAA	GGA	AAC	AAG	GCG	CTC	ACA	AAC	TAC	AGC	TCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	K	S	Q	E	K	H	E	G	N	K	A	L	T	N	Y	S	S
TGC	ATT	TCT	AGA	TGT	CCC	CAT	GAT	AGG	GAT	GCA	AAG	AAA	TCA	ACC	AAG	CGA	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	I	S	R	C	P	H	D	R	D	A	K	K	S	T	K	R	V
ACT	ATC	CAC	AGG	CAG	CTT	CAA	AAC	AGA	AGT	ACA	TTA	CAG	AGC	CGA	CTT	GGG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	I	H	R	Q	L	Q	N	R	S	T	L	Q	S	R	L	G	K

CAT	AAG	497	AAA	ATG	AAA	506	ACA	GCT	CTG	515	CTT	GTT	TTA	524	GTT	TTG	TTT	533	GGT	GCT	GCT	542	GTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	K	K	M	K	T	A	L	L	V	L	V	L	F	G	A	A	V							
TTT	ATT	551	ACC	ATC	GCC	560	ATC	TTC	ACG	569	CCT	GCA	ATT	578	TCC	ATT	CTT	587	TCA	TCC	GTT	596	GAA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	I	T	I	A	I	F	T	P	A	I	S	I	L	S	S	V	E							
GGG	CTG	605	CAG	GTT	CGA	614	GCC	AAG	AAT	623	TTG	CAT	CAT	632	GGT	ATG	TTG	641	GTC	ATC	ATT	650	GCC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	L	Q	V	R	A	K	N	L	H	H	G	M	L	V	I	I	A							
TTG	TTT	659	TTA	TTG	ATC	668	GGC	CTT	TTT	677	GTA	TTG	CAA	686	CAC	TAT	GGC	695	ATG	CAT	AGG	704	GTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	F	L	L	I	G	L	F	V	L	Q	H	Y	G	M	H	R	V							
GCC	TTC	713	ATA	TTT	TCT	722	CCC	ATA	GTG	731	ATT	CTA	TGG	740	TTA	TTG	TCG	749	ATT	GCC	TTT	758	GTT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	F	I	F	S	P	I	V	I	L	W	L	L	S	I	A	F	V							
GGT	ATC	767	TAC	AAT	ATC	776	ATT	AAT	TGG	785	AAT	CCA	AGA	794	GTA	TAC	CAG	803	GCT	CTT	TCT	812	CCA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	I	Y	N	I	I	N	W	N	P	R	V	Y	Q	A	L	S	P							
TAT	TAT	821	ATC	TAC	AAG	830	TTC	TTT	GGG	839	GAA	ACA	GGA	848	AAG	GAT	GGT	857	TGG	ATT	TCT	866	CTT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	Y	I	Y	K	F	F	G	E	T	G	K	D	G	W	I	S	L							
GGC	GGA	875	ATA	CTT	TTA	884	TGT	ATT	ACT	893	GGA	ACT	GAA	902	GTT	GTA	TTT	911	GCA	GGG	CTT	920	GGC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	G	I	L	L	C	I	T	G	T	E	V	V	F	A	G	L	G							
CAC	TTC	929	ACA	GCT	TCA	938	TCA	ATA	AGG	947	GTT	GCA	TTT	956	TCA	TTT	GTT	965	GTG	TAC	CCA	974	TGT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	F	T	A	S	S	I	R	V	A	F	S	F	V	V	Y	P	C							
TTG	GTG	983	CTT	CAA	TAC	992	ATG	GGG	CAG	1001	GCT	GCA	TTT	1010	CTT	TCA	CAA	1019	AAAC	TTT	TCT	1028	TCT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	V	L	Q	Y	M	G	Q	A	A	F	L	S	Q	N	F	S	S							
GTA	TCC	1037	ACG	AGC	TTC	1046	CAT	TCT	TCC	1055	ATT	CCT	GAC	1064	TCG	TTG	TTC	1073	TGG	CCT	GTC	1082	ACG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	S	T	S	F	H	S	S	I	P	D	S	L	F	W	P	V	T							
GTG	ATG	1091	GCA	ACT	TTG	1100	GCT	GCG	ATT	1109	GTT	GCC	AGT	1118	CAA	GCT	GTA	1127	GTC	TCT	GCC	1136	ACA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	M	A	T	L	A	A	I	V	A	S	Q	A	V	V	S	A	T							
TTT	TCA	1145	ATT	GCC	AAA	1154	CAA	TGC	CAC	1163	GCA	TTA	GGA	1172	TGT	TTC	CCT	1181	CGC	ATC	AAG	1190	ATT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	S	I	A	K	Q	C	H	A	L	G	C	F	P	R	I	K	I							
GTA	CAC	1199	AAA	TCA	AAA	1208	TGG	GTA	CAT	1217	CGC	CAG	ACA	1226	TAC	ATC	CCT	1235	GAG	ATA	AAT	1244	TGG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	H	K	S	K	W	V	H	R	Q	T	Y	I	P	E	I	N	W							
GCA	CTT	1253	ATG	ATT	CTC	1262	TGT	CTA	GCA	1271	GTT	ACA	GTT	1280	GGT	TCT	CAA	1289	GAC	ACC	ATT	1298	CAT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	L	M	I	L	C	L	A	V	T	V	G	S	Q	D	T	I	H							
TTA	GGA	1307	AAT	GCT	TAT	1316	GGG	ATT	GCA	1325	TGC	ATA	ACT	1334	GGG	ATA	TTT	1343	GTG	ACT	ACA	1352	TGT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	G	N	A	Y	G	I	A	C	I	T	G	I	F	V	T	T	C							

TTG	ACA	TCA	ATG	ATC	ATT	GAC	TTC	GTA	TGG	CAT	AAG	AAC	CTC	TTG	GTT	GCT	CTT
L	T	S	M	I	I	D	F	V	W	H	K	N	L	L	V	A	L
TTG	TAC	TTC	TCA	TTC	TTC	GGA	ATA	ATA	GAG	ATA	ATT	TTC	GTC	TCA	TCT	TCA	TGT
L	Y	F	S	F	F	G	I	I	E	I	I	F	V	S	S	S	C
ATG	AGA	ATT	CCC	AAA	GGT	GGA	TGG	GTT	CCT	CTT	GTG	CTC	ACT	GCA	GTC	TTT	ATG
M	R	I	P	K	G	G	W	V	P	L	V	L	T	A	V	F	M
TCT	GTC	ATG	TAT	GTG	TGG	CAT	TAT	GGT	AGC	AGG	AAG	AAG	TAT	CTA	TAT	GAT	CTG
S	V	M	Y	V	W	H	Y	G	S	R	K	K	Y	L	Y	D	L
CAT	AAC	AAA	GCT	TCC	ATG	AAA	TGG	ATC	CTC	ACT	TTA	GGT	CCT	GAT	CTC	GGG	ATT
H	N	K	A	S	M	K	W	I	L	T	L	G	P	D	L	G	I
GTA	AGG	ATT	CCT	GGG	ATT	GGT	CTT	GTC	TAC	ACT	GAG	TTA	GCA	AGT	GGA	GTC	CCA
V	R	I	P	G	I	G	L	V	Y	T	E	L	A	S	G	V	P
GCC	ATG	TTT	TCC	CAG	TTC	ATA	ACT	GAC	TTG	CCT	ACA	TTT	TAC	CAA	GTG	GTT	GTA
A	M	F	S	Q	F	I	T	D	L	P	T	F	Y	Q	V	V	V
TTT	ATC	TGT	GTT	AAG	ACT	GTT	CCC	ATT	CCT	TAT	GTT	TCC	CAG	AAA	GAA	CGG	TAT
F	I	C	V	K	T	V	P	I	P	Y	V	S	Q	K	E	R	Y
CTT	ATT	GGC	CGG	ATT	GGC	CCC	AAA	CCT	TAC	AGG	ATG	TAC	CGC	TGC	ATT	GTT	CGA
L	I	G	R	I	G	P	K	P	Y	R	M	Y	R	C	I	V	R
TAT	GGA	TAC	AAA	GAT	GTC	CAT	GAA	AAT	GAT	GAC	TAT	GAT	TTT	GAA	AAT	GCT	ATT
Y	G	Y	K	D	V	H	E	N	D	D	Y	D	F	E	N	A	I
GTG	ATG	AGT	GTA	GCA	GAG	TTC	ATC	CAA	TTG	GAA	GCA	GAG	GGT	GGT	GGA	ACT	CTT
V	M	S	V	A	E	F	I	Q	L	E	A	E	G	G	G	T	L
GAT	GGT	TCT	GTG	GAT	GGT	CGG	TTG	GCA	GTT	GTG	AGG	TCA	TCT	GAA	AAT	TTT	GGA
D	G	S	V	D	G	R	L	A	V	V	R	S	S	E	N	F	G
AAA	AGA	TTC	ATG	ATG	TCA	GAA	TCT	GAT	GGC	AAT	AAG	GAG	AGC	AGC	AGT	TGG	AGC
K	R	F	M	M	S	E	S	D	G	N	K	E	S	S	S	W	S
TAC	CCA	GCA	TCT	GGA	AGT	AGC	TCC	AGG	TCA	ACT	GCA	TTG	CAG	AAA	TTG	AAG	TCC
Y	P	A	S	G	S	S	S	R	S	T	A	L	Q	K	L	K	S
ATG	TAT	GAG	TTG	GAG	TCA	CCA	GAG	TTC	TGC	AAT	AGG	CGT	CGG	ATC	CAG	TTA	AAG
M	Y	E	L	E	S	P	E	F	C	N	R	R	R	I	Q	L	K
TTA	TTG	GAT	ACA	ACA	TAC	AAG	GAT	TCC	CGT	GTC	AAG	GAA	GAA	CTG	TTA	GAG	CTC
L	L	D	T	T	Y	K	D	S	R	V	K	E	E	L	L	E	L

```

      2225      2234      2243      2252      2261      2270
TTG GAA GCC AAA GAT GCC GGG GTA GCA TAT GTA ATA GGT CAC TCT CAT ATT AAG
---
L   E   A   K   D   A   G   V   A   Y   V   I   G   H   S   H   I   K

      2279      2288      2297      2306      2315      2324
GCG AAA TGG AAT GCA ACA TTC TGG AAG AGG CTT CTG ATC AAT GTT TTT CTC TCT
---
A   K   W   N   A   T   F   W   K   R   L   L   I   N   V   F   L   S

      2333      2342      2351      2360      2369      2378
TTT TTA CGC AAA AAC TGC CGG TCC CCT AGT GTT GGT TTG AAT ATT CCT CAT ATA
---
F   L   R   K   N   C   R   S   P   S   V   G   L   N   I   P   H   I

                                     ← Stopp

      2387      2396      2405      2414      2423      2432
TCT TTG ATT GAA GTG GGT ATG AAC TAC TAT CTG TAA GGC AAC CTT CTG TGG AAG
---
S   L   I   E   V   G   M   N   Y   Y   L   *   G   N   L   L   W   K

      2441      2450      2459      2468      2477      2486
TAT CTC CCT CGG ATG CAT TTT CTG GTG AAA TTT GCT ATG AAT TGC TTA GAG GGC
---
Y   L   P   R   M   H   F   L   V   K   F   A   M   N   C   L   E   G

CG 3'
--

```

8.4.2 Promotorsequenzen bidirektional und Promotor-Sequenzanalyse

8.4.2.1 PTORK-Promotor

```

1  ACTATAGGGC ACGCGTGGTC GACGGCCCGG GCTGGTGTGCG TTTTATTTTT
   TGATATCCCG TGCGCACCAG CTGCCGGGCC CGACCACAGC AAAAAATAAAA

51  TTAATAAAAA ATAATTAACC TGACGATTTG GTAATCTAGT CAAAAACCAG
   AATTTTTTTTT TATTAATTGG ACTGCTAAAC CATTAGATCA GTTTTTGGTC

101 AACCAGACC TTGGACCGAG TCGAGTCTCA AACTATGTT CTTAGGTCGT
   TTGGGTCTGG AACCTGGCTC AGCTCAGAGT TTTGATACAA GAATCCAGCA

151 GGAAATTTTC TCAACCTTTA ATTTTACAAT TATATATCAT AGTATTCGGT
   CCTTTAAAAG AGTTGGAAAT TAAAATGTTA ATATATAGTA TCATAAGCCA

201 TGCGATCGAA TCTAATCTAG TCTAAAATTC CGATTAAAAT TCCTTAAATC
   ACGCTAGCTT AGATTAGATC AGATTTTAAG GCTAATTTTA AGGAATTTAG

251 CCTTAAATTT TATTCTAAAA TAATATGTGTT TCAATTAAAA AAAGCTCAAA
   GGAATTTTAA ATAAGATTTT ATTATAACAA AGTTAATTTT TTTCGAGTTT

301 TAATTTTATT TTGGATACAA ATTAATAAGA AATTCTATAG AATTCACCAA
   ATTAATAATA AACCTATGTT TAATTTTCT TTAAGATATC TTAAGTGTTT

351 TCCCGATCAA AATGATTTAG AAAAGCTTG GTTTGAAAAT TGATTAACAA
   AGGGCTAGTT TACTAAAATC TTTTTCGAAC CAAACTTTTA ACTAATGTGT

401 CTGGATTAAC TTGCTAGATT AACTAAGTT TAATAATTAC ATATTTTTC
   GACCTAATTG AACGATCTAA TTTGATTCAA ATTATTAATG TATAAAAAGT

451 AGATTTTAT TTTTGTAAAG AGATCCCTTA CCCTTAATTA TTAAGTACC
   TCTAAAAATA AAAACAATTC TCTAGGGAAT GGAATTAAT AATTGACTGG

501 CGCTAAAATG TTTGATCTTG ACTGATGACT GCATTTTATT AATTTGGCTT
   GCGATTTTAC AAAC TAGAAC TGACTACTGA CGTAAAATAA TTAAACCGAA

551 AAGAAATAAT TAAAACCTTT TCTTAAATGA ATGTATACGA ATAAATCTTA
   TTCTTTATTA ATTTGAGAA AGAATTTACT TACATATGCT TATTTAAGAT

601 TTTAAACAAA CATATAATAT GCTACTTAGT TACAACCTTA GCATTATAAA
   AAATTTGTTT GTATATTATA CGATGAATCA ATGTTGAAAT CGTAATATTT

```

651	CAATAAATTC GTTATTTAAG	CATTTAAACA GTAAATTTGT	AACATATAAT TTGTATATTA	ATGCTACTTA TACGATGAAT	GTTACAACCT CAATGTTGAA
701	TAGCATTTTA ATCGTAAAAT	AATTTCTTCA TTAAAGAAGT	TTTTCTTTCA AAAAGAAAAGT	GTTTATCACT CAAATAGTGA	TTCATATAGA AAGTATATCT
751	ATAAATCATT TATTTAGTAA	TTTTTAGATG AAAAATCTAC	TCAGCTAATF AGTCGATTAA	TGTACAAAAC ACATGTTTGG	GAAATTTAAAT CTTTAATTTA
801	CAACCCTTAT GTTGGGAATA	GATATAATTA CTATATTAAT	AAAAACATTA TTTTTGTAAT	TATGATTTTT ATACTAAAAA	ATTTCTAACC TAAAGATTGG
851	GTCCAAACTA CAGGTTTGAT	AGATTTAAAT TCTAAATTTA	CTTGATATAT GAACTATATA	ATATTAGAAT TATAATCTTA	AACCCTTTAA TTGGGAAATF
901	TTAATTAGGG AATTAATCCC	GAATGATACA CTTACTATGT	TTCAACAAAT AAGTTGTTTA	TAATTAGATG ATTAATCTAC	AAAGTTATGT TTTCAATACA
951	TTTAAAATAC AAATTTTATG	TTCTAGTTGA AAGATCAACT	GAAGTTTATC CTTCAAATAG	AAAATAATAT TTTTATTATA	TTATATATCA AATATATAGT
1001	ATTATAATTT TAATATTTAA	CAAACATGTA GTTTGTACAT	TTTAAAACCT AAATTTTGAA	AGTTAATATT TCAATTATAA	ATGATAATAA TACTATTTAT
1051	TTATTTTTTA AATAAAAATT	AATATTTCTC TTATAAAGAG	ATTTGAAAAT TAAACTTTTA	AATTGAAAATA TTAACTTTAT	CTAATTTTTT GATTAAAAAA
1101	ATTTTTTTAA TAAAAAAATT	GATTCTTTCA CTAAGAAAAGT	AATAAGTACA TTATTCATGT	TTAAAACAAT AATTTTGTTA	TAAAAATAAT ATTTTTATTA
1151	TAATTTAAAA ATTAATTTTT	TAAAAAATAA ATTTTTTATF	AAAATTATTA TTTTAATAAT	ATTTTTTTTT TAAAAAAAAT	AAATACAAAA TTTATGTTTT
1201	AACAATTTTT TTGTTAAAAA	TTTTCAAGCA AAAAGTTCGT	CATAATTTAA GTATTAATTT	ATACTTTTTT TATGAAAAAA	ATTTAGGAGT TAAATCCTCA
1251	TCATAACAAA AGTATTGTTT	AAAGTATTTG TTTCATAAAC	TGTATCGCGG ACATAGCGCC	TAATTTCAAG ATTAAGTTC	CAATTATTTA GTTAATAAAT
1301	GAATCTATTT CTTAGATAAA	CGATTATTTT GCTAATAAAA	TAAAAATACT ATTTTTATGA	TATCATTTGA ATAGTAAACT	AAATAATTTA TTTATTTAAT
1351	AATAATAATT TTATTATTTA	TTTTATTTTT AAAATAAAAA	TAAAATCTTT ATTTTAGAAA	TAAATAAATA ATTTATTTAT	CATTAAAACA GTAATTTTGT
1401	ATTAAAAAGA TAATTTTTCT	ATTAATTTAA TAATTAAAAT	AGTAAATAAT TCATTTATTA	TTATTTAAAA AATAAATTTT	AAATTATCAA TTTAATAGTT
1451	TTTTTTTTAA AAAAAAATTT	TATTTTTTAA ATAAAAATTT	ATACAAAAAC TATGTTTTTTG	AATTTAATTT TTAAATTTAA	TTCAAGCACA AAGTTCGTGT
1501	TAATTAATGG ATTAATTACC	GGCTAATCTT CCGATTAGAA	GTGTTCTTAT CACAGAATA	CGTTCCTGCT GCAAGAGCGA	GCCAGTCATT CGGTCAGTAA
1551	GATTCCTACT CTAAGGATGA	GTTAGCTTCT CAATCGAAGA	TAATAGACAA ATTATCTGTT	AAACATCATG TTTGTAGTAC	ATTACTACTG TAATGATGAC
1601	CCAGTCATAA GGTCAGTATT	TTAACGAACG AATTGCTTGC	ATTCTCTCTG TAAGAGAGAC	TCACCACAAA AGTGGTGTTF	TGTCTCCCAT ACAGAGGGTA
1651	CATCATCTAC GTAGTAGATG	GCTAACAGAA CGATTGCTTT	AGCTCAAGGG TCGAGTTCCC	AATATTAAGC TTATAATTCG	ACAGGACAAA TGTCTGTTTT
1701	TCTCCCTCC AGAGGGGAGG	ATTGTCAGAA TAACAGTCTT	GTTACCGGTA CAATGGCCAT	ACAAATTCCT TGTTTAAGGA	TTGGCACCAA AACCCTGGTT
1751	ACACATTTAT TGTGTAAATA	ATAAAAAATTA TATTTTTTAA	TCTTTCACTT AGAAAGTGAA	TAATTTTCATC ATTAAAGTAG	ATGAAAGATA TACTTTCTAT
1801	ATTAGCTTTC TAATCGAAAG	TTTCTCTTTC AAAGAGAAAG	AAGACTGAAA TTCTGACTTT	GTTACTTGCA CAATGAACGT	CTCTGTTTGG GAGACCAACC
1851	TACTTACATT ATGAATGTAA	CATTCAGAGA GTAAGTCTCT	TCTCGTCTTC AGAGCAGAAG	TTTCATAATT AAAGTATTTA	ATCACATTCT TAGTGTAAAG
1901	ATGGCCAGCC TACCGGTCGG	CACGATTTTT GTGCTAAAAA	CTGTTGAAAT GACAACTTTA	TCTTGCAGAT AGAACGTCTA	Start ⇒ T ATG A TAC

Bindestellen und Motive

Faktor	Positionen	Signal-Sequenz	Referenzen	Funktion
-10PEHVPSBD	261 (+),748 (-),886 (-)	TATTCT	Thum K. et al., Plant Mol Biol 47: 353-366 (2001)	Licht, zirkadiane Expression
-300ELEMENT	171 (-),443 (-),1487 (-)	TGHAAARK	Kreis M. et al., Philos Trans R Soc Lond B314:355-365 (1986); Colot V. et al., EMBO J 6:3559-3564 (1987); Thomas M. et al., Plant Cell 2:1171-1180 (1990)	Endosperm
2SSEEDPROTBANAP	1748 (+)	CAAACAC	Stalberg K. et al., Planta 199:515-519 (1996)	Speicherung
AACACOREOSGLUBI	605 (+),667 (+)	AACAAAC	Wu C. et al., Plant J 23: 415-421 (2000)	Endosperm
AMYBOX1	1254 (+),1663 (+), 1729 (+), 462 (-)	TAACARA	Huang N. et al., Plant Mol Biol 14:655-668 (1990)	Amylase
ARFAT	1641 (+)	TGTCTC	Ulmasov T. et al., Plant J 19:309-319 (1999); Guilfoyle T., et al., Plant Physiol 118: 341-347 (1998); Ulmasov T. et al., Science 276: 1865-1868 (1997)	Auxin
ASF1MOTIFCAMV	71 (+)	TGACG	Lam E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:7890-7897 (1989); Terzaghi W. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Benfey P. et al., Science 250:959-966 (1990); Klinedinst S. et al., Plant Mol Biol 42: 679-688 (2000)	Vaskuläre Expression
BOXIINTPATPB	337 (+),746 (+),333 (-), 596 (-), 1897 (-)	ATAGAA	Kapoor S. et al., Plant Cell 11: 1799-1810 (1999)	Plastiden
BS1EGCCR	499 (-)	AGCGGG	Lacombe E. et al., Plant J 23: 663-676 (2000)	Vaskuläre Expression, Stamm
CAATBOX1	177 (+), 282 (+), 348 (+), 651 (+), 999 (+), 1137 (+), 1203 (+), 1291 (+), 1399 (+), 1448 (+), 1480 (+), 275 (-), 389 (-), 1082 (-), 1548 (-), 1711 (-)	CAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebespezifität
CANBNNAPA	1748 (+)	CNAACAC	Ellerstrom M. et al., Plant Mol Biol 32:1019-1027 (1996)	Speicherung
CCA1ATLHCB1	451 (-)	AAMAATCT	Wang Z. et al., Plant cell 9:491-507 (1997)	Licht
CCAATBOX1	347 (+)	CCAAT		
CGACGOSAMY3	20 (+)	CGACG	Hwang Y. et al., Plant Mol Biol 36:331-341 (1998)	Amylase
CIACADIANLELHC	1578 (+),404 (-)	CAANNNNATC	Piechulla B. et al., Plant Mol Biol 38:655-662 (1998)	Licht, zirkadiane Expression
DOFCOREZM	291 (+), 326 (+), 373 (+), 941 (+), 1261 (+), 1406 (+), 1419 (+), 1669 (+), 1794 (+), 1828 (+), 166 (-), 568 (-), 636 (-), 698 (-), 725 (-), 739 (-), 895 (-), 1115 (-), 1234 (-), 1377 (-), 1739 (-), 1772 (-), 1778 (-), 1806 (-), 1810 (-), 1816 (-), 1880 (-)	AAAG	Yanagisawa S. et al., Plant J 17:209-214 (1999); Yanagisawa S. Plant J 21:281-288 (2000)	C-Stoffwechsel
DPBFCOREDCDC3	32 (-),1518 (-)	ACACNNG	Kim S.Y. et al., Plant J 11:	ABA

EBOXBNNAPA	398 (+), 1070 (+), 1334 (+), 1637 (+), 398 (-), 1070 (-), 1334 (-), 1637 (-)	CANNTG	1237-1251 (1997); Finkelstein R.R. et al., <i>Plant Cell</i> 12: 599-609 (2000); Lopez-Molina L. et al., <i>Plant Cell Physiol</i> 41: 541-547 (2000) Stalberg K. et al., <i>Planta</i> 199:515-519 (1996)	Speicherung
ERELEE4	1007 (+)	AWTTCAAA	Izhaki H. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 91:8925-8929 (1994); Montgomery J. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 90:5939-5943 (1993)	Ethylen, Seneszenz
GATABOX	314 (+), 811 (+), 874 (+), 915 (+), 1043 (+), 1797 (+), 185 (-), 734 (-), 977 (-), 996 (-), 1273 (-), 1331 (-), 1445 (-), 1528 (-), 1769 (-), 1890 (-)	GATA	Lam E. et al., <i>Plant Cell</i> 1:1147-1156 (1989); Gilmar-tin P.M. et al., <i>Plant Cell</i> 2:369-378 (1990); Benfey P.N. et al., <i>Science</i> 250:959-966 (1990); Gidoni D. et al., <i>Mol Gen Genet</i> 215: 337-344 (1989)	Licht, vaskuläre Expression
GTICONSENSUS	80 (+), 151 (+), 370 (+), 385 (+), 1043 (+), 1075 (+), 1279 (+), 1339 (+), 1797 (+), 155 (-), 720 (-), 1443 (-), 1767 (-), 1888 (-), 444 (-), 732 (-), 975 (-), 1210 (-), 1488 (-), 1916 (-)	GRWAAW	Terzaghi W.B. et al., <i>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</i> 46:445-474 (1995); Villain P. et al., <i>J Biol Chem</i> 271:32593-32598 (1996); Buchel A.S. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 40:387-396 (1999); Zhou D.X. et al., <i>Trends in Plant Science</i> 4:210-214 (1999)	Licht
GTICORE	65 (-)	GGTTAA	Green P.J. et al., <i>EMBO J</i> 7:4035-4044 (1988); Gilmar-tin P.M. et al., <i>Plant Cell</i> 2:369-378 (1990); Terzaghi W.B. et al., <i>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</i> 46:445-474 (1995)	Licht
GT2OSPHYA	1277 (+)	GCGGTAATT	Dehesh K. et al., <i>Science</i> 250:1397-1399 (1990); Zhou D.X. <i>Trends in Plant Science</i> 4:210-214 (1999)	Licht
GTGANTG10	344 (-), 736 (-), 1631 (-), 1775 (-), 1892 (-)	GTGA	Rogers H.J. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 45: 577-585 (2001)	Pollen
HDZIP2ATATHB2	431 (+), 1045 (+), 485 (-)	TAATMATTA	Ohgishi M. et al., <i>Plant J</i> 25: 389-398 (2001)	Licht
HEXAMERATH4	20 (-)	CCGTCG	Chaubet N. et al., <i>Plant J</i> 10:425-435 (1996)	
IBOX	1329 (-), 1526 (-)	GATAAG	Giuliano G. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 85:7089-7093 (1988); Donald R.G.K. et al., <i>EMBO J</i> 9:1717-1726 (1990); Rose A. et al., <i>Plant J</i> 20: 641-652 (1999)	Licht
IBOXCORE	1043 (+), 1797 (+), 733 (-), 976 (-), 1330 (-), 1444 (-), 1527 (-), 1768 (-), 1889 (-)	GATAA	Terzaghi W.B. et al., <i>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</i> 46:445-474 (1995)	Licht
INRNTPSADB	717 (+), 727 (+), 1774 (+), 1822 (-)	YTCANTYY	Nakamura M. et al., <i>Plant J</i> 29: 1-10 (2002)	Licht
LTRE1HVBLT49	789 (+)	CCGAAA	Dunn M.A. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 38:551-564 (1998)	Temperatur
MARTBOX	42 (+), 455 (+), 1097 (+), 1099 (+), 1361 (+), 55 (-), 1163 (-)	TTWTWTTWT T	Gasser S.M. et al., <i>Intnatl Rev Cyto</i> 119:57-96 (1989)	Matrix-Anheftung
MYB2AT	492 (+)	TAACTG	Urao T. et al., <i>Plant Cell</i> 5:1529-1539 (1993)	Trocken-Stress
MYBCORE	197 (+), 1559 (+), 1921 (+), 398 (-), 492 (-), 846 (-), 1663	CNGTTR	Luscher B. et al., <i>Genes Dev.</i> 4:2235-2241 (1990);	Trocken-Stress

	(-)		Urao T. et al., Plant Cell 5:1529-1539 (1993); Solano R. et al., EMBO J 14:1773-1784 (1995)	
MYBGAHV	1254 (+), 1729 (+), 462 (-)	TAACAAA	Gubler F. et al., Plant Cell 7:1879-1891 (1995); Morita A. et al., FEBS Lett 423:81-85 (1998)	GA, Amylase, Zucker
MYBPLANT	1745 (+)	MACCWAMC	Sablowski R.W.M. et al., EMBO J 13:128-137 (1994); Tamagnone L. et al., Plant Cell 10: 135-154 (1998)	Phenylpropanoidsynthese
MYBPZM	1845 (-)	CCWACC	Grotewold E. et al., Cell 76:543-553 (1994)	
MYBST1	313 (+)	GGATA	Baranowskij N. et al., EMBO J 13:5383-5392 (1994)	
NTBBF1ARROL	635 (+), 697 (+), 1777 (+), 1418 (-)	ACTTTA	Baumann K. et al., Plant Cell 11:323-333 (1999)	Auxin, vaskuläre Expression
PALBOXAPC	849 (+)	CCGTCC	Box A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:5905-5909 (1995)	PAL
POLASIG1	590 (+), 652 (+), 750 (+), 1159 (+), 1166 (+), 1383 (+), 43 (-), 259 (-), 305 (-), 456 (-), 535 (-), 838 (-), 1098 (-), 1238 (-), 1362 (-), 1430 (-)	AATAAAA	Joshi C.P.; Nucleic Acids Res 15:9627-9640 (1987); O'Neill S.D. et al., Mol Gen Genet 221:235-244 (1990)	Poly-A-Signal, höhere Pflanzen
POLASIG2	283 (+), 320 (+), 558 (+), 793 (+), 816 (+), 1138 (+), 1224 (+), 1345 (+), 1400 (+), 167 (-), 896 (-), 1483 (-), 1779 (-)	AATTTAAA	O'Neill S.D. et al., Mol Gen Genet 221:235-244 (1990)	Poly-A-Signal, Amylase
POLASIG3	60 (+), 269 (+), 299 (+), 432 (+), 555 (+), 983 (+), 1046 (+), 1078 (+), 1145 (+), 1342 (+), 1351 (+), 1354 (+), 1425 (+), 487 (-), 1050 (-), 1174 (-), 1293 (-), 1313 (-)	AATAAT	Heidecker G. et al., Ann Rev Plant Physiol 37:439-466 (1986); Joshi C.P., Nucleic Acids Res 15:9627-9640 (1987)	Poly-A-Signal, höhere Pflanzen
POLLENILELAT52	328 (+), 369 (+), 552 (+), 1667 (+), 157 (-), 569 (-), 713 (-), 722 (-), 842 (-), 1065 (-), 1807 (-), 1811 (-), 1918 (-)	AGAAA	Bate N. et al., Plant Mol Biol 37:859-869 (1998)	Pollen
RAVIAAT	923 (+), 1922 (-)	CAACA	Kagaya Y. et al., Nucleic Acids Res 27: 470-478 (1999)	
REALPHALGLHCB21	378 (-)	AACCAA	Degenhardt J. et al., Plant Cell 8: 31-41 (1996)	Licht
ROOTMOTIFTAPOX1	273 (+), 441 (+), 881 (+), 987 (+), 1036 (+), 1062 (+), 1460 (+), 1682 (+), 272 (-), 616 (-), 678 (-), 986 (-), 1035 (-), 1061 (-), 1459 (-), 1681 (-)	ATATT	Elmayan T. et al., Transgenic Res 4:388-396 (1995)	Wurzel
SEBFCONSSTPR10A	1628 (+)	YTGTCWC	Boyle B. et al., Plant Cell 13: 2525-2537 (2001)	Pathogen
SEF1MOTIF	987 (+), 1455 (-)	ATATTTAWW	Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Speicherung
SEF3MOTIFGM	101 (+)	AACCCA	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989)	Embryo
SEF4MOTIFGM7S	453 (+), 459 (+), 835 (+), 1053 (+), 1316 (+), 1462 (+), 40 (+), 91 (-), 1474 (-), 1578 (-), 1141 (-), 1321 (-), 1762 (-)	RTTTTTR	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989); Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Embryo
SURE2STPAT21	1087 (+)	AATACTAAT	Grierson C. et al., Plant J 5:815-826 (1994)	Saccharose
TAAAGSTKST1	1418 (+), 166 (-), 636 (-), 698 (-), 895 (-), 1778 (-)	TAAAG	Plesch G. et al., Plant J 28: 455-464 (2001)	Schließzelle
TATABOX2	989 (-), 1755 (-)	TATAAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebespezifität

TATABOX3	537 (+), 1176 (+)	TATTAAT		TATA
TATABOX4	1758 (+), 180 (-), 991 (-), 1757 (-)	TATATAA		TATA
TATABOX5	4 (+), 306 (+), 457 (+), 839 (+), 1051 (+), 1099 (+), 1239 (+), 1294 (+), 1314 (+), 1363 (+), 1431 (+), 59 (-), 268 (-), 298 (-), 554 (-), 982 (-), 1077 (-), 1120 (-), 1144 (-), 1158 (-), 1165 (-), 1341 (-), 1350 (-), 1382 (-), 1424 (-)	TTATTT	Tjaden G. et al., Plant Physiol 108:1109-1117 (1995)	TATA
TATAPVTRNALEU	990 (+), 1756 (+), 1758 (-)	TTTATATA	Yukawa Y. et al., Plant J 22: 439-447 (2000)	TATA
WBBOXPCWRKY1	88 (-)	TTTGACT	Eulgem T. et al., EMBO J 18: 4689-4699	Schnelle Gene
WBOXATNPR1	518 (+), 89 (-)	TTGAC	Yu D. et al., Plant Cell 13: 1527-1540 (2001)	SA

8.4.2.2 PTK2-Promotor

1	ACTATAGGGC	ACGCGTGGTC	GACGGCCCGG	GCTGGTATCA	TGAATAATTT
	TGATATCCCG	TGCGCACCAG	CTGCCGGGCC	CGACCATAGT	ACTTATTTAA
51	TTGTTTTATT	TTTATACGGT	AGTTGATTTG	AAATTCGATA	CAAAC TGCAA
	AACAAAATAA	AAATATGCCA	TCAACTAAAC	TTTAAGCTAT	GTTTGACGTT
101	TCTCTCAAAA	CTTGATGACA	CGTGCAAGTT	TAGCTGGTAA	TTTTCCACATG
	AGAGAGTTTT	GAAC TACTGT	GCACGTTCAA	ATCGACCATT	AAAAGTGTAC
151	GATTTATTAC	TGTTACAGAC	AGGTCATAAG	ATTTATTTTT	ACTCCTTGAT
	CTAAATAATG	ACAATGTCTG	TCCAGTATTC	TAAATAAAAA	TGAGGAAC TA
201	ATTTCAAATT	ACAATTTTCT	TGGTTTTATT	TTGATTATGT	GACGTGGGAA
	TAAAGTTTAA	TGTTAAAAGA	ACCAAATAA	AACTAATACA	CTGCACCCTT
251	ATGTTTTTTT	AAATTTTTTG	AAATGGACTG	AAATGAAATT	AGTGAAACTA
	TACAAAAAAA	TTTAAAAAAC	TTTACCTGAC	TTTACTTTAA	TCACTTTGAT
301	AAACTACTGA	GTTAAGCTAT	ATTGAAACTA	TAAGGACCGG	AACATAACTT
	TTTGATGACT	CAATTCGATA	TAAC TTTGAT	ATTCCTGGCC	TTGTATTGAA
351	TTGGCTCCCC	TCAATGGCTA	GCAAATCATC	AAACAATTAT	TCAAGCCTTC
	AACCGAGGGG	AGTTACCGAT	CGTTTAGTAG	TTTGTTAATA	AGTTCGGAAG
401	GAACATCTAA	AATCCATCCA	TGTTTCGGTC	TAAATTTAAC	ATTAATGAAA
	CTTG TAGATT	TTAGGTAGGT	ACAAAGCCAG	ATTTAAATG	TAATTACTTT
451	TCTCGACAGC	AAAATCTTTC	ATTTAATAAT	AATTTTCTCA	ACATTGCTGA
	AGAGCTGTCTG	TTTTAGAAAG	TAAATTATTA	TTAAAAGAGT	TGTAACGACT
501	TCAGAAATTA	AAGAAATGGG	AGTTTCTCTC	TTCTTTTTCC	TTTTCATTTT
	AGTCTTTAAT	TTCTTTACCC	TCAAAGAGAG	AAGAAAAAGG	AAAAGTAAAA
551	AATTTCTATT	TTATATAAAG	AAGGGGAAAA	AAAAGAAGAA	AAACTGAAGC
	TTAAAGATAA	AATATATTTT	TTCCCTTTT	TTTTCTTCTT	TTTGACTTCG
601	CCACAAATCA	AATCCTCCAT	AAAAATTTAT	TAAAGCAGTA	TGGTTAAAAT
	GGTGTTTAGT	TTAGGAGGTA	TTTTTAAATA	ATTTTCGTCAT	ACCAATTTTA
651	TATATTTTAC	TCTAGTTATA	ATTTTAAAAA	TATTCAATTA	ATCAACATAA
	ATATAAAAATG	AGATCAATAT	TAAAATTTTT	ATAAGTTAAT	TAGTTGTATT
701	ATTATATTTT	TATAAAAATA	TTGTAAAAAC	ACTCTTTTAT	AAAAATATAT
	TAATATAAAA	ATATTTTTTAT	AACATTTTTG	TGAGAAAAATA	TTTTTATATA
751	AATTTTATAA	TTTATTTTAA	AAAACAAAAT	CATGACCGCA	AGGATAGTAA
	TTAAAATATT	AAATAAAATT	TTTTGTTTTA	GTACTGGCGT	TCCTATCATT
801	TTGGGGAATG	GAATCCGGTA	TTTGTATTGA	TGAAGAAGAA	GAATCCAGAT
	AACCCCTTAC	CTTAGGCCAT	AAACATAACT	ACTTCTTCTT	CTTAGGTCTA
851	GAGGTGGGCC	ATTACTGTGG	GCCATCGGAG	CAGACAGCAC	AATAATAGCC
	CTCCACCCCG	TAATGACACC	CGGTAGCCTC	GTCTGTCTGTG	TTATTATCGG

901 TATGTGTCCT TGCGGGGTTG GTGAAAGGAG TTTGTTTCCTT GACTGGTTTC
ATACACAGGA ACGCCCAAC CACTTTCCTC AAACAAGGAA CTGACCAAAG

951 CACACGTCAT TCACACGGCT TTGTATGATA ATTAACAAAT TAATTAGTGT
GTGTGCAGTA AGTGTGCCGA AACATACTAT TAATTGTTTA ATTAATCACA

1001 TTTTTTTTTTAAAAATACAT TAAAAGAATA ATCTAGAAAT TAAACCATAT
AAAAAAAAAT TTTTATATGTA ATTTTCTTAT TAAGATCTTA ATTTGGTATA

1051 ATTCGATAAAA GCAAGATAAAA TACTTCCAAA AGTAAGGGTT TGGATGCGCA
TAAGCTATTT CGTTCATTTT ATGAAGGTTT TCATTCCCAA ACCTACGCGT

1101 TGGATGATAA CCACAACATT CAGTGTAACT CAATTGATCA TAATTGTTAA
ACCTACTATT GGTGTTGTAA GTCACATTGA GTTAACTAGT ATTAACAATT

1151 TTGTGTTTAA AAAATTATTA ATTTAAATCT TATAAATTTT AGAATTATTA
AACACAAAAT TTTTAATAAT TAAATTTAGA ATATTTAAAA TCTTAATAAT

1201 AAGGCTTATA TAATTATAAA TATCAGGGTC CATAAGATTA ATCGATGTAT
TTCCGAATAT ATTAATATTT ATAGTCCCAG GTATTCTAAT TAGCTACATA

1251 GTATAATTTA ACACGAGCAC CCACATTAAT CTAAAAATA AAGTTATCTT
CATATTAAT TGTGCTCGTG GGTGTAATTA GATTTTTTAT TTCAATAGAA

1301 CATGTAGTAA AAAGTATTA TATAAAAAA TGTATAAATT ATTTAGGGTT
GTACATCATT TTTCATAATT AATATTTTGT ACATATTTAA TAAATCCCAA

1351 TTTTAGAGTT TGAAACCAAT AAATTTATTT AAATAATGTT GTTTTTTTAT
AAAATCTCAA ACTTTGGTTA TTTAAATAAA TTTATTACAA CAAAAAATA

1401 GTTTGTTTTT ATTTTTAATT TCATCCCCTC AATAAAATAA AAAGATTAGA
CAAACAAAAA TAAAAATTAA AGTAGGGGAG TTATTTTATT TTTCTAATCT

1451 TAACAAAATA GTGACTCAGA TTAATTTAGA GGGTTTAATT TTCCTGTATA
ATTGTTTTAT CACTGAGTCT AATTAATCT CCCAAATTAA AAGGACATAT

1501 TTATACCTGG GAATTAATAA AACCACAAGA AATTCCAATT CGAATAATTA
AATATGGACC CTTAATTTTA TTGGTGTCT TTAAGGTTAA GCTTATTAAT

1551 AAATAATTAT TAATGCTGGA CGGACGTCAA TGGGAAGTCT TTGTGGCCAC
TTTATTAATA ATTACGACCT GCCTGCAGTT ACCCTTCAGA AACACCGGTG

1601 AGATGAGCAG CAGAAGATGG GCCATATCTT TTTTGGACAC ACATATTTGC
TCTACTCGTC GTCTTCTACC CCGTATAGAA AAAACCTGTG TGTATAAACG

1651 ATTAATTTCA TGTCACCTGC AAATTACCAG ACAAATTGAT GTTGGCGTGC
TAATTAAGGT ACAGTGAACG TTTAATGGTC TGTTTAACTA CAACCGCACG

1701 ATGATCGAGT TATTTTATTA GTGGAATTAA ATTCAGGGA AAGGCCATAA
TACTAGCTCA ATAAAAATAA CACCTTAATT TAACGTCCCT TTCCGGTATT

1751 TCATCCTTGC CCACACCCGA GGCCATGTAT TTTCCACAAT ATCTACCCAT
AGTAGGAACG GGTGTGGGCT CCGGTACATA AAAGGTGTTA TAGATGGGTA

1801 GATCTTATCT CAAATGTCAG GGAAAGCCA TAATCAATCA ATCAATCGAT
CTAGAATAGA GTTTAACGTC CCTTCCGGT ATTAGTTAGT TAGTTAGCTA

1851 GCAGGTGATT CCATTAGGTC TAATTGCCAT CCTACACACC TCACGTTTTT
CGTCCACTAA GGTAATCCAG ATTAACGGTA GGATGTGTGG AGTGCAAAAA

1901 TTAGTTGTTT AAGTATTTGA GTGATTATAG TTTAAAATAA TTATTTTATT
AATCAACAAA TTCATAAACT CACTAATATC AAATTTTATT AATAAAATAA

1951 TTTAAAATAT ATTAATAATAG TATTTTTTTA TTTTTTTTAA ATATACTTTG
AAATTTTATA TAATTTTATC ATAAAAAAT AAAAAAATT TATATGAAAC

2001 AATTTCAACG TATTAATAATG ATTTAAATAT ATAAAAAATT TAAATTTAAA
TTAAAGTTGC ATAAATTTAC TAAATTTATA TATTTTTTAA ATTTAAATTT

2051 CCGCGTTTCC AGACACCGCC GAGTATTTCT AGAGACAATA CCATACGTAT
GGCGCAAAGG TCTGTGGCGG CTCATAAAGA TCTCTGTTAT GGTATGCATA

2101 GACAATTACA TACCATTGTA CACTACAAT GAGGCAACTC TCATCTCCTT
CTGTTAATGT ATGGTAACAT GTGATTGTTA CTCCGTTGAG AGTAGAGGAA

2151 TTCGGCCTAC CTTTGCCCTA CCTTGTCTTC AAGCCAACAA TGCTTGATCT
AAGCCGGATG GAAACGGGAT GGAACAGAAG TTCGGTTGTT ACGAACTAGA

```

2201 CTAATTAATA GTCTCTCTAT TCTCTTCTAC CTAGACACCA TCTCTTTACA
      GATTAATTAT CAGAGAGATA AGAGAAGATG GATCTGTGGT AGAGAAATGT

2251 TTTATAAGTT AGAGAGGGCT TCATTTGTGG ATAGAGAATG GAGGAAACGA
      AAATATTCAA TCTCTCCCGA AGTAAACACC TATCTCTTAC CTCCTTTGCT

2301 AGTTCACTCC ATACAATCTT CACCTGACCT CTAGC ATG
      TCAAGTGAGG TATGTTAGAA GTGGACTGGA GATCG TAC

```

Start ⇒

Bindestellen und Motive

Faktor	Positionen	Signal- Sequenz	Referenzen	Funktion
-10PEHVPSBD	2218 (+), 1025 (-)	TATTCT	Thum K. et al., Plant Mol Biol 47: 353-366 (2001)	Licht, zirkadiane Expression
-300CORE	2244 (-)	TGTAAAG	Forde B.G. et al., Nucleic Acids Res 13:7327-7339 (1985)	Endosperm
-300ELEMENT	539 (-)	TGHAAARK	Kreis M. et al., Philos Trans R Soc Lond B314:355-365 (1986); Colot V. et al., EMBO J 6:3559-3564 (1987); Thomas M. et al., Plant Cell 2:1171-1180 (1990)	Endosperm
AACACOREOSGLU B1	930 (-), 1401 (-)	AACAAAC	Wu C. et al., Plant J 23: 415-421 (2000)	Endosperm
ACGTABOX	2094 (+), 2094 (-)	TACGTA	Foster R. et al., FASEB J 8:192-200 (1994); Izawa T. et al., Plant Cell 6:1277-1287 (1994)	Zucker
ACGTABREMOTIF A2	117 (-)	ACGTGKC	Hattori T. et al., Plant Cell Physiol 43: 136-140 (2002)	ABA
ACGTCBOX	1573 (+), 1573 (-)	GACGTC	Stalberg K. et al., Planta 199:515-519 (1996)	Speicherung
AMYBOX1	983 (+), 1451 (+)	TAACARA	Huang N. et al., Plant Mol Biol 14:655-668 (1990)	Amylase
ARFAT	2082 (-)	TGTCTC	Ulmasov T. et al., Plant J 19:309-319 (1999); Guilfoyle T., et al., Plant Physiol 118: 341-347 (1998); Ulmasov T. et al., Science 276: 1865-1868 (1997)	Auxin
ASF1MOTIFCAMV	240 (+), 955 (-), 1575 (-)	TGACG	Lam E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:7890-7897 (1989); Terzaghi W. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Benfey P. et al., Science 250:959-966 (1990); Klinedinst S. et al., Plant Mol Biol 42: 679-688 (2000)	Vaskuläre Expression
BOXIINTPATPB	554 (-)	ATAGAA	Kapoor S. et al., Plant Cell 11: 1799-1810 (1999)	Plastiden
CAATBOX1	98 (+), 212 (+), 362 (+), 384 (+), 685 (+), 890 (+), 1131 (+), 1367 (+), 1430 (+), 1536 (+), 1578 (+), 1787 (+), 1835 (+), 1839 (+), 1843 (+), 2086 (+), 2103 (+), 2127 (+), 2188 (+), 2314 (+), 321 (-), 493 (-), 720 (-), 800 (-), 826 (-),	CAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebespezifität

CACGTGMOTIF	1133 (-), 1143 (-), 1150 (-), 1685 (-), 1731 (-), 1814 (-), 1873 (-), 2115 (-) 119 (+), 119 (-)	CACGTG	Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Busk P.K. et al., Plant Mol Biol 37:425-435 (1998)	Licht, ABA
CCAATBOX1 CGACGOSAMY3	1366 (+), 1535 (+), 800 (-) 20 (+)	CCAAT CGACG	Hwang Y. et al., Plant Mol Biol 36:331-341 (1998)	Amylase
CONSERVED11NTZ M DOFCOREZM	2008 (+)	ACGTATTAAAA	Rapp W.D. et al., EMBO J 11: 1065-1073 (1992)	Mitochondrien
	510 (+), 567 (+), 582 (+), 632 (+), 924 (+), 1023 (+), 1058 (+), 1079 (+), 1200 (+), 1290 (+), 1311 (+), 1441 (+), 1740 (+), 1823 (+), 348 (-), 466 (-) , 533 (-), 540 (-), 734 (-), 969 (-), 1589 (-), 1628 (-), 1996 (-), 2148 (-), 2161 (-), 2244 (-)	AAAG	Yanagisawa S. et al., Plant J 17:209-214 (1999); Yanagi- sawa S. Plant J 21:281-288 (2000)	C- Stoffwechsel
DPBFCOREDCDC3	118 (+), 1261 (+), 1763 (+)	ACACNNG	Kim S.Y. et al., Plant J 11: 1237-1251 (1997); Finkel- stein R.R. et al., Plant Cell 12: 599-609 (2000); Lopez- Molina L. et al., Plant Cell Physiol 41: 541-547 (2000)	ABA
EBOXBNNAPA	119 (+), 145 (+), 846 (+), 1131 (+), 1600 (+), 1664 (+), 1852 (+), 2272 (+), 2321 (+), 119 (-), 145 (-), 846 (-), 1131 (-), 1600 (-), 1664 (-), 1852 (-) , 2272 (-), 2321 (-)	CANNTG	Stalberg K. et al., Planta 199:515-519 (1996)	Speicherung
ERELEE4	201 (+), 77 (-), 267 (-), 1997 (-)	AWTTCAAA	Itzhaki H. et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:8925- 8929 (1994); Montgomery J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:5939-5943 (1993)	Ethylen, Se- neszens
GATABOX	87 (+), 198 (+), 793 (+), 977 (+), 1055 (+), 1065 (+), 1106 (+), 1449 (+), 2280 (+), 36 (-) , 1221 (-), 1295 (-), 1625 (-), 1790 (-), 1806 (-)	GATA	Lam E. et al., Plant Cell 1:1147-1156 (1989); Gil- martin P.M. et al., Plant Cell 2:369-378 (1990); Benfey P.N. et al., Science 250:959- 966 (1990); Gidoni D. et al., Mol Gen Genet 215: 337- 344 (1989)	Licht, vaskuläre Expression
GCN4OSGLUB1	1462 (-)	TGAGTCA	Washida H. et al., Plant Mol Biol 40:1-12 (1999)	Speicherung, Endosperm
GT1CONSENSUS	136 (+), 247 (+), 575 (+), 576 (+), 588 (+), 977 (+), 1055 (+), 1065 (+), 140 (-), 214 (-) , 482 (-), 1488 (-), 1673 (-), 1779 (-), 534 (-), 535 (-), 1489 (-), 1780 (-)	GRWAAW	Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Villain P. et al., J Biol Chem 271:32593-32598 (1996); Buchel A.S. et al., Plant Mol Biol 40:387-396 (1999); Zhou D.X. et al., Trends in Plant Science 4:210-214 (1999)	Licht
GT1CORE	642 (+)	GGTTAA	Green P.J. et al., EMBO J 7:4035-4044 (1988); Gil- martin P.M. et al., Plant Cell 2:369-378 (1990); Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995)	Licht
GTGANTG10	239 (+), 292 (+), 921 (+),	GTGA	Rogers H.J. et al., Plant Mol	Pollen

	1461 (+), 1855 (+), 1921 (+), 144 (-), 961 (-), 1663 (-), 1891 (-), 2304 (-), 2320 (-)		Biol 45: 577-585 (2001)	
HDZIP2ATATHB2	1554 (-)	TAATMATTA	Ohgishi M. et al., Plant J 25: 389-398 (2001)	Licht
HEXAMERATH4	20 (-)	CCGTCC	Chaubet N. et al., Plant J 10:425-435 (1996)	
HEXAT	240 (+)	TGACGTGG	Schindler U. et al., Plant Cell 4: 1309-1319 (1992)	
HEXMOTIFTAH3H4	954 (+), 1574 (+), 240 (-)	ACGTCA	Mikami K. et al., FEBS Lett 223: 273-278 (1987); Te- rada R. et al., Plant Mol Biol 27: 17-26 (1995)	Hexamer
IBOX	1804 (-)	GATAAG	Giuliano G. et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:7089- 7093 (1988); Donald R.G.K. et al., EMBO J 9:1717-1726 (1990); Rose A. et al., Plant J 20: 641-652 (1999)	Licht
IBOXCORE	977 (+), 1055 (+), 1065 (+), 1106 (+), 1449 (+), 1294 (-), 1805 (-)	GATAA	Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995)	Licht
INRNTPSADB	543 (+), 2303 (+), 591 (-), 275 (-), 280 (-)	YTCANTYY	Nakamura M. et al., Plant J 29: 1-10 (2002)	Licht
INTRONLOWER	1733 (+), 1816 (+), 1850 (+)	TGCAGG	Brown J.W.S., Nucleic Acids Res 14:9549-9559 (1986)	
L1BOXATPDF1	2247 (-)	TAAATGYA	Abe M. et al., Plant J 26: 487-494 (2001)	Apikales Spross- Meristem
LTRE1HVBLT49	423 (-), 2150 (-)	CCGAAA	Dunn M.A. et al., Plant Mol Biol 38:551-564 (1998)	Temperatur
MARTBOX	54 (+), 702 (+), 1000 (+), 1407 (+), 1710 (+), 1941 (+), 1944 (+), 1973 (+), 1976 (+), 1978 (+), 1431 (-)	TTWTWTTWTT	Gasser S.M. et al., Intnatl Rev Cyto 119:57-96 (1989)	Matrix- Anheftung
MYBCORE	160 (+)	CNGTTR	Luscher B. et al., Genes Dev. 4:2235-2241 (1990); Urao T. et al., Plant Cell 5:1529-1539 (1993); Solano R. et al., EMBO J 14:1773- 1784 (1995)	Trocken-Stress
MYBGAHV	983 (+), 1451 (+)	TAACAAA	Gubler F. et al., Plant Cell 7:1879-1891 (1995); Morita A. et al., FEBS Lett 423:81- 85 (1998)	GA, Amylase, Zucker
MYBPLANT	916 (-)	MACCWAMC	Sablowski R.W.M. et al., EMBO J 13:128-137 (1994); Tamagnone L. et al., Plant Cell 10: 135-154 (1998)	Phenylpro- panoidsyn- these
MYBPZM	2156 (+), 2167 (+), 916 (-)	CCWACC	Grotewold E. et al., Cell 76:543-553 (1994)	
MYBST1	792 (+), 2279 (+)	GGATA	Baranowskij N. et al., EMBO J 13:5383-5392 (1994)	
MYCATRD22	145 (+)	CACATG		
NTBBF1ARROLB	1289 (-)	ACTTTA	Baumann K. et al., Plant Cell 11:323-333 (1999)	Auxin, vasku- läre Expressi- on
PALBOXAPC	1568 (-)	CCGTCC	Box A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:5905- 5909 (1995)	PAL
PALBOXPPC	914 (-)	YTYMMCMAMC MMC	Logemann E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:5905-5909 (1995)	PAL
POLASIG1	1287 (+), 1368 (+), 1431 (+),	AATAAA	Joshi C.P.; Nucleic Acids	Poly-A-Signal,

	1436 (+), 55 (-), 153 (-), 182 (-), 225 (-), 626 (-), 761 (-), 1374 (-), 1408 (-), 1714 (-), 1945 (-), 1977 (-)		Res 15:9627-9640 (1987); O'Neill S.D. et al., Mol Gen Genet 221:235-244 (1990)	höhere Pflanzen
POLASIG2	506 (+), 1038 (+), 1512 (+), 1546 (+), 1725 (+), 548 (-), 1414 (-), 1484 (-)	AATTA	O'Neill S.D. et al., Mol Gen Genet 221:235-244 (1990)	Poly-A-Signal, Amylase
POLASIG3	43 (+), 475 (+), 478 (+), 891 (+), 1027 (+), 1382 (+), 1543 (+), 1552 (+), 1936 (+), 386 (-), 1164 (-), 1194 (-), 1338 (-), 1556 (-), 1940 (-)	AATAAT	Heidecker G. et al., Ann Rev Plant Physiol 37:439-466 (1986); Joshi C.P., Nucleic Acids Res 15:9627-9640 (1987)	Poly-A-Signal, höhere Pflanzen
POLLEN1LELAT52	503 (+), 512 (+), 587 (+), 1528 (+), 216 (-), 484 (-), 523 (-), 553 (-), 2076 (-)	AGAAA	Bate N. et al., Plant Mol Biol 37:859-869 (1998)	Pollen
PYRIMIDINEBOXH V	575 (-)	TTTTTCC	Cercos M. et al., Plant J 19: 107-118 (1999)	GA, ABA
QELEMENTZM3	171 (+), 2325 (-)	AGGTCA	Hamilton D.A. et al., Plant Mol Biol 38:663-669 (1998)	Enhancer
RAV1AAT	489 (+), 693 (+), 1114 (+), 2185 (+), 1387 (-), 1690 (-)	CAACA	Kagaya Y. et al., Nucleic Acids Res 27: 470-478 (1999)	
RAV1BAT	2321 (+), 1852 (-)	CACCTG		
REALPHALGLHCB2 1	1364 (+), 220 (-)	AACCAA	Degenhardt J. et al., Plant Cell 8: 31-41 (1996)	Licht
ROOTMOTIFTAPO X1	199 (+), 319 (+), 652 (+), 680 (+), 704 (+), 718 (+), 1049 (+), 1498 (+), 1643 (+), 1959 (+), 679 (-), 717 (-), 744 (-), 1219 (-), 1788 (-), 1956 (-), 1990 (-), 2026 (-)	ATATT	Elmayan T. et al., Transgenic Res 4:388-396 (1995)	Wurzel
RYREPEATBNNAPA	1698 (-)	CATGCA	Ezcurra I. et al., Plant Mol Biol 40:699-709 (1999); Ezcurra I. et al., Plant J 24:57-66 (2000)	ABA
RYREPEATLEGUMIN	1697 (-)	CATGCAY	Fujiwara T. et al., Plant Mol Biol 24:261-272 (1994)	Gewebespezifität
S1FBOXSORPS1L21	2089 (-), 2111 (-)	ATGGTA	Lagrange T. et al., Mol Cell Biol 13:2614-2622 (1993)	"House-keeping role", Gen-Inhibition
S1FSORPL21	2087 (-)	ATGGTATT	Zhou D.X. et al., J Biol Chem 267:23515-23519 (1992); Lagrange T. et al., Mol Cell Biol 13:2614-2622 (1993)	Gen-Inhibition
SEBFCONSSTPR10A	2082 (-)	YTGTCWC	Boyle B. et al., Plant Cell 13: 2525-2537 (2001)	Pathogen
SEF1MOTIF	1215 (-), 1986 (-), 2022 (-)	ATATTTAWW	Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Speicherung
SEF4MOTIFGM7S	47 (+), 58 (+), 185 (+), 706 (+), 1411 (+), 1948 (+), 1405 (+), 620 (-), 675 (-), 713 (-), 724 (-), 740 (-), 1159 (-)	RTTTTTR	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989); Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Embryo
SP8BFIBSP8BIB	1966 (-)	TACTATT	Ishiguro S. et al., Plant Mol Biol 18:97-108 (1992)	Amylase
SV40COREENHAN	2277 (+)	GTGGWWHG	Green P.J. et al., EMBO J 6:2543-2549 (1987); Donald R.G.K. et al., EMBO J 9:1717-1726 (1990)	Licht
TAAAGSTKST1	509 (+), 566 (+), 631 (+), 1057 (+), 1199 (+), 1289 (+), 2244 (-)	TAAAG	Plesch G. et al., Plant J 28: 455-464 (2001)	Schließzelle
TATABOX2	1181 (+), 1215 (+), 1333 (+), 2250 (-)	TATAAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebespezifität
TATABOX3	1166 (+), 1315 (+), 1558 (+), 2204 (-)	TATTAAT		TATA

TATABOX4	562 (+), 746 (+), 1207 (+), 2028 (+), 561 (-), 1206 (-)	TATATAA		TATA
TATABOX5	56 (+), 183 (+), 226 (+), 762 (+), 1339 (+), 1375 (+), 1409 (+), 1710 (+), 1941 (+), 1946 (+), 1978 (+), 1286 (-), 1381 (-) 1435 (-), 1517 (-), 1551 (- , 1935 (-)	TTATTT	Tjaden G. et al., <i>Plant Phy- siol</i> 108:1109-1117 (1995)	TATA
TATAPVTRNALEU	560 (+), 562 (-), 2028 (-)	TTTATATA	Yukawa Y. et al., <i>Plant J</i> 22: 439-447 (2000)	TATA
TATCCAYMOTIFOS	2277 (-)	TATCCAY	Toyofuku K. et al., <i>FEBS Lett</i> 428:275-280 (1998)	Zucker
TBOXATGAPB	1995 (+)	ACTTTG	Chan C.S. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 46: 131-141 (2001)	Licht
TELOBOXATEEF1A	1343 (-)	AAACCCTAA	Tremousayque D. et al., <i>Plant J</i> 20: 553-561 (1999)	Wurzel Pri- mordia
TGACGTVMAMY	240 (+), 954 (-), 1574 (-)	TGACGT	Yamauchi D., <i>Plant Cell Physiol</i> 42: 635-641 (2001)	Amylase
TRANSINITMONOC	1621 (-)	RMNAUGGC	Joshi C.P. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 35:993-1001 (1997)	
WBOXATNPR1	518 (+), 89 (-)	TTGAC	Yu D. et al., <i>Plant Cell</i> 13: 1527-1540 (2001)	SA

8.4.2.3 KPT1-Promotor

1	TACTATAGGG ATGATATCCC	CACGCGTGGT GTGCGCACCA	CGACGGCCCG GCTGCCGGGC	GGCTGGTATC CCGACCATAG	AAGCATCATT TTCGTAGTAA
51	GAAACTCATA CTTTGAGTAT	TAGTTAACT ATCAATTTGA	ACCTTTCTTA TGGAAAGAAT	AATTAGAAAA TTAATCTTTT	AGAAATCCAT TCTTTAGGTA
101	CCTACTTCAT GGATGAAGTA	TAATTTCTTA ATTAAAGAA	GTATATCGTA CATATAGCAT	TGGTGTAGAA ACCACATCTT	AAACCTCAGG TTTGGAGTCC
151	TTACGTACAN AATGCATGTN	TTNNNNNNNN AANNNNNNNN	NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNA NNNNNNNNNT	NTTANTTTTN NAATNAAAAN
201	GTTTGGCTGG CAAACCGACC	TTGGAGGGAT AACCTCCCTA	TCGAGGAAGG AGCTCCTTCC	AAAGAAAAAA TTTCTTTTTT	TGTTACTCCT ACAATGAGGA
251	CTAACCAAAG GATTGGTTTC	CCCCTATTGG GGGGATAACC	TCCACGTGGC AGGTGCACCG	AAGCACAAGT TTCGTGTTCA	AGTTTCCCCT TCAAAGGGGA
301	CCCCAAATCG GGGGTTTAGC	ACTACGGCTG TGATGCCGAC	CCTGTTCCAT GGACAAGGTA	CTCTGGATTT GAGACCTAAA	TGTATTGTTT ACATAACAAA
351	ACACCTACAT TGTGGATGTA	GTTTTCACTC CAAAAGTGAG	AAATCTGTCC TTTAGACAGG	TTTGCAAAGG AAACGTTTCC	CCTTGTCTAT GGAACAGATA
401	ATATGATTCA TATACTAAGT	CTCCTCCACA GAGGAGGTGT	TGTTTTTATG ACAAAAATAC	ATGGACCTTC TACCTGGAAG	CACCACCACC GTGGTGGTGG
451	ACCACCACAG TGGTGGTGTC	CCATCAAGAA GGTAGTTCTT	GCACGAGTAT CGTGCTCATA	ATTGCCATTA TAACGGTAAT	TCTTCTTTTG AGAAGAAAAC
501	CTCCCCTTTC GAGGGGAAAAG	CCTGTCTCTC GGACAGAGAG	AGACTATTTT TCTGATAAAA	TTCTCTGCCA AAGAGACGGT	CTGCATTACA GACGTAATGT
551	GGAAAACCTCA CCTTTTGGAGT	TGTCTGCCAC ACAGACGGTG	TTGGTACTGC AACCATGACG	CATATATCCT GTATATAGGA	AGACCCCGTT TCTGGGGCAA
601	TGTTCTTCAG ACAAGAAGTC	CTGATAGTCC GACTATCAGG	TTGTTTGCTT AACAAACGAA	TTTTTTTTTT AAAAAAAAAA	TCCTTCTTTG AGGAAGAAAC
651	TTCAAACAGG AAGTTTGTCC	AATGAAAAGG TTACTTTTCC	CCCCCTTCA GGGGGGAAGT	CCTTTTCTT GGAAAAGAA	GCTTCCATTT CGAAGGTAAA
701	CAATCCTTAA GTTAGGAATT	ATGACGCGCT TACTGC CGA	ACTTCGATTA TGAAGCTAAT	ACTTCTTGA TGAAAGAACT	AGAATCATTT TCTTAGTAAA

751	CCAGCATGTC GGTCGTACAG	GAGAGTCTTG CTCTCAGAAC	AGAGAAAGTT TCTCTTTCAA	AAAGAAAAGT TTTCTTTTCA	TGATTGAAAA ACTAACTTTT
801	AGAAGACAGA TCTTCTGTCT	GCCCGTGTCA CGGGCACAGT	CCACTCAAAA GGTGAGTTTT	GCTTCAGTAT CGAAGTCATA	ATATAAACAC TATATTTGTG
851	ACACAAACAG TGTGTTTGTG	AGCCAGCCAT TCGGTCGGTA	TCACAACATA AGTGTGTGAT	CTCTTCCCCA GAGAAGGGGT	CAAAATCTTG GTTTTAGAAC
					Start ⇒
901	AGAGAGAGTA TCTCTCTCAT	CCCTTGAGAA GGGAACTCTT	TTCAAGCAAC AAGTTCGTTG	CAGTGATTAA GTCACTAATT	TTAAT ATG AATTA TAC

Bindestellen und Motive

Faktor	Positionen	Signal- Sequenz	Referenzen	Funktion
-300ELEMENT	383 (+), 663 (+), 795 (+), 379 (-)	TGHAAARK	Kreis M. et al., Philos Trans R Soc Lond B314:355-365 (1986); Colot V. et al., EMBO J 6:3559-3564 (1987); Thomas M. et al., Plant Cell 2:1171-1180 (1990)	Endosperm
AACACOREOSGLUB1	598 (-)	AACAAAC	Wu C. et al., Plant J 23: 415-421 (2000)	Endosperm
ABREZMRAB28	272 (+), 272 (-)	CCACGTGG	Pla M. et al., Plant Mol Biol 21:259-266 (1993); Busk P.K. et al., Plant Mol Biol 37:425-435 (1998); Guan L.M. et al., Plant J 22: 87-95 (2000)	ABA
ACGTABOX	152 (+), 152 (-)	TACGTA	Toyofuku K. et al., FEBS Lett 428:275-280 (1998); Izawa T. et al., Plant Cell 6:1277-1287 (1994)	Zucker, Samen- entwicklung
ACGTABREMOTIFA2	274 (+)	ACGTGKC	Hattori T. et al., Plant Cell Physiol 43: 136-140 (2002)	ABA
ARFAT	513 (+)	TGTCTC	Ulmasov T. et al., Plant J 19:309-319 (1999); Guilfoyle T., et al., Plant Physiol 118: 341-347 (1998); Ulmasov T. et al., Science 276: 1865-1868 (1997)	Auxin
ASFIMOTIFCAMV	712 (+)	TGACG	Lam E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:7890-7897 (1989); Terzaghi W. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Benfey P. et al., Science 250:959-966 (1990); Klinedinst S. et al., Plant Mol Biol 42: 679-688 (2000)	Vaskuläre Expression
BOXIIPCCHS	274 (+)	ACGTGGC	Block A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:5387-5391(1990) Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995)	Licht
CAATBOX1	701 (+), 48 (-), 266 (-), 344 (-), 481 (-), 793 (-)	CAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebe- spezifität
CACGTGMOTIF	273 (+), 273 (-)	CACGTG	Siberil Y. et al., Plant Mol Biol 45: 477-488 (2001); Busk P.K. et al., Plant Mol Biol 37:425-435 (1998); Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995)	Elicitor, ABA, Licht
CCAATBOX1 CGACGOSAMY3	266 (-) 21 (+)	CCAAT CGACG	Hwang Y. et al., Plant Mol Biol 36:331-341 (1998)	Eukaryoten Amylase
DOFCOREZM	89 (+), 231 (+), 257 (+), 386 (+), 666 (+),	AAAG	Yanagisawa S. et al., Plant J 17:209-214 (1999); Yanagisawa S.	C- Stoffwechsel

	775 (+), 781 (+), 786 (+), 799 (+), 828 (+), 73 (-), 380 (-), 495 (-), 506 (-), 628 (-), 646 (-), 682 (-), 732 (-)		Plant J 21:281-288 (2000)	
DPBFCOREDCDC3	812 (-)	ACACNNG	Kim S.Y. et al., Plant J 11: 1237-1251 (1997); Finkelstein R.R. et al., Plant Cell 12: 599-609 (2000); Lopez-Molina L. et al., Plant Cell Physiol 41: 541-547 (2000)	ABA
EBOXBNNAPA	273 (+), 417 (+), 568 (+), 608 (+), 273 (-), 417 (-), 568 (-), 608 (-)	CANNTG	Stalberg K. et al., Planta 199:515-519 (1996)	Speicherung
EMBPITAEM	273 (+)	CACGTGGC	Guilinan M.J. et al., Science 250:267-270 (1990); Vasil V. et al., Plant Cell 7: 1511-1518 (1995); Choi H. et al., J Biol Chem 275: 1723-1730 (2000)	ABA
GATABOX	613 (+), 37 (-), 124 (-), 489 (-), 585 (-)	GATA	Lam E. et al., Plant Cell 1:1147-1156 (1989); Gilmartin P.M. et al., Plant Cell 2:369-378 (1990); Benfey P.N. et al., Science 250:959-966 (1990); Gidoni D. et al., Mol Gen Genet 215: 337-344 (1989)	Licht, vaskuläre Expression
GBOXLERBCS	272 (+)	MCACGTGGC	Gilmartin P.M. et al., Plant Cell 2:369-378 (1990); Benfey P.N. et al., Science 250:959-966 (1990); Gidoni D. et al., Mol Gen Genet 215: 337-344 (1989)	Licht
GT1CONSENSUS	86 (+), 138 (+), 234 (+), 551 (+), 796 (+), 487 (-), 747 (-), 528 (-), 637 (-), 638 (-), 683 (-)	GRWAAW	Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Villain P. et al., J Biol Chem 271:32593-32598 (1996); Buchel A.S. et al., Plant Mol Biol 40:387-396 (1999); Zhou D.X. et al., Trends in Plant Science 4:210-214 (1999)	Licht
GTGANTG10	933 (+), 365 (-), 408 (-), 678 (-), 818 (-), 871 (-)	GTGA	Rogers H.J. et al., Plant Mol Biol 45: 577-585 (2001)	Pollen
HEXAMERATH4	21 (-)	CCGTCCG	Chaubet N. et al., Plant J 10:425-435 (1996)	
IBOXCORE	488 (-)	GATAA	Terzaghi W.B. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995)	Licht
INRNTPSADB	407 (+), 699 (+), 659 (-)	YTCANTYY	Nakamura M. et al., Plant J 29: 1-10 (2002)	Licht
LREBOXIIPCCHS1	271 (+)	TCCACGTGGC		Licht
LRENPCABE	274 (+)	ACGTGGCA	Castresana C. et al., EMBO J 7:1929-1936 (1988); Schulze-Lefert P. et al., EMBO J 8: 651-656 (1989)	Licht
MARTBOX	629 (+), 630 (+), 631 (+), 632 (+)	TTWTWTTWT	Gasser S.M. et al., Intnatl Rev Cyto 119:57-96 (1989)	Matrix-Anheftung
MYBATRD22	251 (+)	CTAACCA	Abe H. et al., Plant Cell 9:1859-1868 (1997); Busk P.K. et al., Plant Mol Biol 37:425-435 (1998)	ABA
MYBPZM	209 (-)	CCWACC	Grotewold E. et al., Cell 76:543-553 (1994)	
MYBST1	585 (-)	GGATA	Baranowskij N. et al., EMBO J 13:5383-5392 (1994)	
MYCATRD22	417 (+)	CACATG	Abe H. et al., Plant Cell 9:1859-1868 (1997); Busk P.K. et al., Plant Mol Biol 37:425-435 (1998)	ABA
PALBOXPPC	437 (+)	YTYMMCMMA MCMCMC	Logemann E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 92:5905-5909 (1995)	PAL

POLLENILELAT52	85 (+), 91 (+), 137 (+), 233 (+), 773 (+), 783 (+), 74 (-), 114 (-), 530 (-), 685 (-), 733 (-)	AGAAA	Bate N. et al., Plant Mol Biol 37:859-869 (1998)	Pollen
PROLAMINBOXOSGL	383 (+), 380 (-)	TGCAAAAG	Wu C. et al., Plant J 23: 415-421 (2000)	Endosperm
PYRIMIDINEBOXHV	636 (+)	TTTTTTCC	Cercos M. et al., Plant J 19: 107-118 (1999)	GA, ABA
RAVIAAT	874 (+)	CAACA	Kagaya Y. et al., Nucleic Acids Res 27: 470-478 (1999)	
REALPHALGLHCB21	253 (+)	AACCAA	Degenhardt J. et al., Plant Cell 8: 31-41 (1996)	Licht
ROOTMOTIFTAPOX1	479 (+), 943 (-)	ATATT	Elmayan T. et al., Transgenic Res 4:388-396 (1995)	Wurzel
SEBFCONSSTPR10A	512 (+)	YTGTCWC	Boyle B. et al., Plant Cell 13: 2525-2537 (2001)	Pathogen
SEF1MOTIF	987 (+), 1455 (-)	ATATTTAWW	Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Speicherung
SEF3MOTIFGM	101 (+)	AACCCA	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989)	Embryo
SEF4MOTIFGM7S	422 (+)	RTTTTTR	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989); Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Embryo
TAAAGSTKST1	780 (+)	TAAAG	Plesch G. et al., Plant J 28: 455-464 (2001)	Schließzelle
TATABOX3	940 (-)	TATTAAT		TATA
TATABOX4	840 (+)	TATATAA		TATA
TATAPVTRNALEU	840 (-)	TTTATATA	Yukawa Y. et al., Plant J 22: 439-447 (2000)	TATA

8.4.2.4 PtKUP1-Promotor

1	TACTATAGGG ATGATATCCC	CACGCGTGGT GTGCGCACCA	CGACGGCCCG GCTGCCGGGC	GGCGGTCTGT CCGCCAGACA	ATATTAGAAA TATAATCTTT
51	ATAGACACAA TATCTGTGTT	ATTGATTGAT TAACATAACTA	TGTGGAATTT ACACCTTAAA	TAACATAAAA ATTGTATTTT	ACAATGTTTA TGTTACAAAT
101	AGAATTGCAA TCTTAACGTT	GTGTATTTTA CACATAAAAT	AAGAAGAAAA TTCTTCTTTT	TAAATTTTAC ATTTAAAAATG	GACTCGAATC CTGAGCTTAG
151	ATATAT'TCTA TATATAAGAT	TTGGGTCTAA AACCAGATT	TAAAATAAAT ATTTTATTAA	TTATTTAATT AATAAATTAA	ATATAATAAA TATAT'TATTT
201	AAATTACTAA TTTAATGATT	TAATAATGGA ATTATTACCT	ATAAATCTAA TATTTAGATT	AAAGAAAAGG TTTCTTTTCC	AAATGATAAT TTTACTATTA
251	GATGACATGC CTACTGTACG	ATAAAAAAAT TATTTT'TTA	ACTTTTCTGA TGAAAAGACT	AAAATAAATA TTTTATTTAT	AATAAAGCTT TTATTT'CGAA
301	GATCCAAAGA CTAGGTTTCT	CAATAAAATA GTTATTTTAT	TTAAAGTGCA AATTCACGT	AAATTATAAA TTTAATATTT	AAAAGAAGAA TTTTCTTCTT
351	GATAGAAAGA CTATCTTTCT	TAATGAGTGA ATTACTCACT	ACTCAAGTTA TGAGTTCAAT	ATTTGGTTAA TAAACCAATT	CCTTATAGAA GGAATATCTT
401	TACAAATAAA ATGTTTATTT	ATACAATAAT TATGTTATTA	GATACCCAAT CTATGGGTTA	CCCTAATAAT GGGATTATTA	CTAAAAGTAG GATTTTCATC
451	AAGGATGAAA TTCTACTTTT	TAATTCAAAA ATTAAGTT'TT	TCAGTTAACA AGTCAATTGT	AAAAAACTT TTTTTT'TGAA	TTTTAAAAAT AAAA'TTTTA
501	AAAATACCAA TTTTATGGTT	CAAACCCGAG GTTTGGGCTC	CAAGGCCGTC GTTCCGGCAG	AAACCTTGCT TTTGGAACGA	AGTTGGATCA TCAACCTAGT
551	TGCGAACGAG ACGCTTGCTC	ATAACCTAAT TATTGGATTA	AGAAAANTAA TCTTTTNATT	CTACAAAANA GATGTT'TTNT	TATAAAGCTT ATATTT'CGAA

601	GGTTCTTAAA CCAAGAATTT	AAAAAATGTT TTTTTTTACAA	AATGGGAGAA TTACCCCTCTT	CCTGAAAAAN GGACTTTTTN	ATATACAATG TATATGTTAC
651	TTAAAAAAT AATTTTTTTA	GATTCGAAAA CTAAGCTTTT	AAGATTTGAA TTCTAAACTT	TTAACTTTGA AATTGAAACT	CAAACCCGTT GTTTGGGCAA
701	GGACATGCGA CCTGTACGCT	CCTAGGTCAT GGATCCAGTA	GAGATTGAGA CTCTAACTCT	TGATCTCATA ACTAGAGTAT	TGAGACACGA ACTCTGTGCT
751	GTTGTGAGAC CAACACTCTG	CCATATCACC GGTATAGTGG	ACATCAAAAA TGTAGTTTTT	AAATAACAAA TTTATTGTTT	ACACAACCTC TGTGTTGAGG
801	TAACAAACCT ATTGTTTGGA	GATATTGAAT CTATAACTTA	GATGAAATTA CTACTTTAAT	AAAAAAAAAA TTTTTTTTTT	AATCAATTCT TTAGTTAAGA
851	GAAGAGGATC CTTCTCCTAG	TAGAGCAAAA ATCTCGTTTT	AAAAAATAAC TTTTTTTATTG	AATTAaaaaa TTAATTTTTT	ATAAGAACCA TATTCTTGGT
901	ACTTTAATAT TGAAATTATA	AAAAATAAAA TTTTTATTTT	TGAAGCAAAA ACTTCGTTTT	TAATAAATGA ATTATTTACT	TAAAGTTAAA ATTTCAATTT
951	AAATAAATTC TTTATTTAAG	AATTGAGAAG TTAACTCTTC	AAAGATAAAA TTTCTATTTT	AAATATAGCA TTTATATCGT	ATGAAAAATA TACTTTTTAT
1001	TAAAGATCGA ATTTCTAGCT	CTTTGATATA GAAACTATAT	AAAATCAAAT TTTTAGTTTA	GCTAATAGAT CGATTATCTA	AAAATTAaaa TTTTAATTTT
1051	TAAAAAATAA ATTTTTTAT	AAAAAATAGC TTTTTTTATCG	AATCAAACAA TTAGTTTGTT	AATAAAAAATC TTATTTTTTAG	AAATATGATT TTTATACTAA
1101	TACTTGGCGA ATGAACCGCT	TTAGAGGACG AATCTCCTGC	TCTTTCAAAG AGAAAGTTTC	GTTAAAGATC CAATTTCTAG	AGTGCAATTC TCACGTTAAG
1151	TCGATAAAAA AGCTATTTTT	AAAAAAGAG TTTTTTTCTC	AAAAGAGAAA TTTTCTCTTT	AAATATATAT TTTATATATA	ATATATACTA TATATATGAT
1201	GAGCCCAACT CTCGGTTTGA	ATCACGTTGC TAGTGCAACG	CACCAACACA GTGGTTGTGT	TGCTGCACCA ACGACGTGGT	TTAAAAAAA AATTTTTTTT
1251	TGTGGTGCGA ACACCACGCT	CTCTTCCAAC GAGAAGGTTG	ACCACATAAG TGGTGTATT	ACATTGTTTG TGTAACAAAC	GCCACCATGG CGGTGGTACC
1301	TGTTTTCATGC ACAAAGTACG	ATCGCCTGAT TAGCGGACTA	GTTTCGTGAAA CAAGCACTTT	CCCTTTTACT GGGAAAATGA	AGCTAGTGCG TCGATCACGC
1351	TGCGTTTACC ACGCAAATGG	CAGTGTACCA GTCACATGGT	TACCTTTTTG ATGGAAAAAC	TTTATCCAGT AAATAGGTCA	CCTTGTACAT GGAACATGTA
1401	GTTTTAATTT CAAAATTAaa	TAATTTTAAT ATTAAAAATTA	CCCTTAATAT GGGAATTATA	TTTAATTTTT AAATTAaaaa	TAAAATTAGC ATTTTAATCG
1451	TAAATTCAT ATTTAAGATA	TTTATCTTGC AAATAGAACG	AAACCCTAGT TTTGGGATCA	ATTGACTGAG TAACTGACTC	CATGAAGAAT GTACTTCTTA
1501	TTCCCTCAGT AAGGGAGTCA	ATTGCATTTT TAACGTAAAA	CCCCGTATCA GGGCATAGT	AGACTACCAA TCTGATGGTT	AACAACCTAA TTGTTGGATT
1551	CAAGTCAAAT GTTCAAGTTTA	TTCAAATAAA AAGTTTATTT	GCCAATATAA CGGTTATATT	AGGGATTAAA TCCCTAATTT	TTGAGAAAA AACTCTTTTT
1601	AGAGTTGAGG TCTCAACTCC	GATCAAAATA CTAGTTTTAT	AAAAAATGT TTTTTTTACA	ACGTGAACTT TGCACTTGAA	GTCCCTTGAT CAGGGAACCTA
1651	TGCGCAAATC ACGCGTTTAG	AGTCCCTGAT TCAGGGACTA	TTTGGTAAAA AAACCATTTT	AAACAGAAAA TTTGTCTTTT	GAAAATGAAC CTTTTACTTG
1701	ATTTCTTGAT TAAAGAACCTA	GTTACTGGTT CAATGACCAA	TATGTTAATG ATACAATTAC	GAGCTTTAAT CTCGAAATTA	TATTGTAAAT ATAACATTTA
1751	CAATTAaAAT GTTAATTTAA	AAACTTCAT TTTGAAGTAA	CAAACAACAA GTTTGTGTT	CACACCTTCT GTGTGGAAGA	TCTTCTTTTT AGAAGAAAA
1801	TAGTCCCCAG ATCAGGGGTC	GATTTCTTAG CTAAAGAATC	ACTTTGGTCC TGAAACCAGG	CTCAATTTCT GAGTTAAAGA	TTGTTTTACA AACAAAATGT
1851	ATTTAGTTCT TAAATCAAGA	TTAAAATTA AATTTTAAT	ATTGCATCAT TAACGTAGTA	GCCACCGTGT CGGTGGCACA	TTAACTGAAG AATTGACTTC

1901	CCTCTGTGTT GGAGACACAA	TTGTTTAGAA AACAAATCTT	TATAATTAAG ATATTAATTC	AAAGATTAGC TTTCTAATCG	ATGTAGTTTA TACATCAAAT
1951	AAGAAAGTCA TTCTTTCAGT	TGTATTGAAG ACATAACTTC	TGGAACATGT ACCTTGTAACA	TGGAGCACAT ACCTCGTGTA	CTATCGACAG GATAGCTGTC
2001	CCCGTTTAAT GGGCAAATTA	ATTTTAATAA TAAATATATT	TATTTATTTA ATAAATAAAT	TTTATTTATT AAATAAATAA	TTAAAAAATT AATTTTTTAA
2051	ATTTGTAATA TAAACATTAT	TTAATAAAAA AATTATTTTT	AAATCTAAAA TTTAGATTTT	ATACTAAAAA TATGATTTTT	AAAAAAGGTT TTTTTTCCAA
2101	TTTTTTTTTT AAAAAAAAAA	CACCGCAAAA GTGGCGTTTT	ACATAAAAAGC TGTATTTTTCG	TATATTACAG ATATAATGTC	AGCCCAAAAAC TCGGGTTTTG
2151	ACAAGTATGG TGTTCAATACC	TCGGGAAAAA AGCCCTTTTT	AGAAGAAGAA TCTTCTTCTT	AAAGAAACCC TTTCTTTGGG	GCGACAGACA CGCTGTCTGT
2201	TGAATCAGTT ACTTAGTCAA	TGTTAGATCA ACAATCTAGT	ACAGAGTCAA TGTCTCAGTT	TTTACAGTTA AAATGTCAAT	CAAACAAACT GTTTGTTTGA
2251	TAAATCCCGA ATTTAGGGCT	CAAACACTC GGTTTGTGAG	CTCATTTCTT GAGTAAAGAA	TCCTTTCCTC AGGAAAGGAG	TATTAACGA ATAATTTGCT
2301	CCGCAAAACA GGCGTTTTGT	CTCTAAAAAC GAGATTTTTG	GACGAGCCGG CTGCTCGGCC	TGAAGCCGCA ACTTCGGCGT	GAACCAGCTT CTTGGTCGAA
2351	CTCCTCTCCT GAGGAGAGGA	CTCCTTTTTT GAGGAGAAAA	CTCCAATAAA GAGGTATTTT	TCATGGTACG AGTACCATGC	CATTAATCAC GTAATTAGTG
2401	TCTCTTTTCA AGAGAAAAGT	TGAAATCCTA ACTTTAGGAT	ACAAATCAAG TGTTTAGTTC	CTTTTCTGTA GAAAAGACAT	ATTAATTACA TAATTAATGT
2451	TTTGTTTGAT AAACAAACTA	CTGTCTTCAA GACAGAAGTT	TTTCAATCAT AAAGTTAGTA	TGGCAATTAA ACCGTTAATT	AGAAGATGTC TCTTCTACAG
2501	TTGATCGTTG AACTAGCAAC	CTCTTGTTTG GAGAACAAAC	AGTTGATTCA TCAACTAAGT	GTTAGGCTTA CAATCCGAAT	TGTTAATTTT ACAATTAATA
2551	ATTGAATTGT TAACTTAACA	GTCGTTTTGA CAGCAAAACT	TTTCTGTTTC AAAGACAAAG	GAGC ATG CTCG TAC	

Start ⇒

Bindestellen und Motive

Faktor	Positionen	Signal- Sequenz	Referenzen	Funktion
-10PEHVPSBD	154 (+), 397 (-), 1917 (-)	TATTCT	Thum K. et al., Plant Mol Biol 47: 353-366 (2001)	Licht, zirkadiane Expression
-300ELEMENT	278 (+), 327 (+), 992 (+)	TGHAAARK	Kreis M. et al., Philos Trans R Soc Lond B314:355-365 (1986); Colot V. et al., EMBO J 6:3559-3564 (1987); Thomas M. et al., Plant Cell 2:1171-1180 (1990)	Endosperm
2SSEEDPROTBANAP	2262 (+)	CAAACAC	Stalberg K. et al., Planta 199:515-519 (1996)	Speicherung
AACACOREOSGLUB1	509 (+), 802 (+), 2243 (+), 2208 (-)	AACAAAC	Wu C. et al., Plant J 23: 415-421 (2000)	Endosperm
ACGTABOX	1117 (+), 1117 (-)	TACGTA	Foster R. et al., FASEB J 8:192-200 (1994); Izawa T. et al., Plant Cell 6:1277-1287 (1994)	Zucker
ACGTOSGLUB1 AMYBOX1	1629 (+) 476 (+), 784 (+), 801 (+), 2419 (+), 2209 (-)	GTACGTG TAACARA	Huang N. et al., Plant Mol Biol 14:655-668 (1990)	Amylase
ARFAT	742 (-)	TGTCTC	Ulmasov T. et al., Plant J 19:309-319 (1999); Guilfoyle	Auxin

ASF1MOTIFCAMV	527 (-)	TGACG	T., et al., Plant Physiol 118: 341-347 (1998); Ulmasov T. et al., Science 276: 1865-1868 (1997)	Vaskuläre Expression
ATHB2ATCONSENSU	2474 (+), 2474 (-)	CAATSATTG	Lam E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:7890-7897 (1989); Terzaghi W. et al., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474 (1995); Benfey P. et al., Science 250:959-966 (1990); Klinedinst S. et al., Plant Mol Biol 42: 679-688 (2000)	Zip-Motiv
ATHB5ATCORE	2474 (+), 2474 (-)	CAATNATTG	Sessa G. et al., EMBO J 12:3507-3517 (1993)	Zip-Motiv
BOXIINTPATPB	352 (+), 395 (+), 569 (+), 156 (-), 1455 (-)	ATAGAA	Kapoor S. et al., Plant Cell 11: 1799-1810 (1999)	Plastiden
CAATBOX1	92 (+), 311 (+), 414 (+), 427 (+), 646 (+), 844 (+), 880 (+), 960 (+), 989 (+), 1070 (+), 1145 (+), 1573 (+), 1751 (+), 1833 (+), 1849 (+), 2228 (+), 2374 (+), 2468 (+), 2474 (+), 2484 (+), 61 (-), 65 (-), 69 (-), 104 (-), 160 (-), 724 (-), 814 (-), 962 (-), 1283 (-), 1481 (-), 1511 (-), 1590 (-), 1649 (-), 1742 (-), 1871 (-), 1964 (-), 2479 (-), 2551 (-), 2556 (-)	CAAT	Shirsat A. et al., Mol Gen Genet 215:326-331 (1989)	Gewebe-spezifität
CANBNNAPA	1223 (+), 1266 (+), 2262 (+)	CNAACAC	Ellerstrom M. et al., Plant Mol Biol 32:1019-1027 (1996)	Endosperm
CATATGGMSAUR	737 (+), 737 (-)	CATATG	Xu N. et al., Plant Sci 126: 193-201 (1997)	Auxin
CCA1ATLHCBI	2069 (+)	AAMAATCT	Wang Z.-Y. et al., Plant cell 9:491-507 (1997)	Licht
CCAATBOX1	426 (+), 1572 (+), 2373 (+), 160 (-), 2479 (-)	CCAAT		
CGACGOSAMY3	21 (+), 2320 (+)	CGACG	Hwang Y. et al., Plant Mol Biol 36:331-341 (1998)	Amylase
CIACADIANLELHC	1097 (-), 1584 (-)	CAANNNNAT C	Piechulla B. et al., Plant Mol Biol 38:655-662 (1998)	Licht, zirka-diane Regu-lierung
DOFCOREZM	120 (+), 231 (+), 236 (+), 294 (+), 306 (+), 323 (+), 342 (+), 356 (+), 444 (+), 594 (+), 670 (+), 942 (+), 971 (+), 1002 (+), 1127 (+), 1134 (+), 1165 (+), 1172 (+), 1568 (+), 1579 (+), 1599 (+), 1688 (+), 1931 (+), 1950 (+), 1954 (+), 2094 (+), 2126 (+), 2169 (+), 2181 (+), 2489 (+), 272 (-), 488 (-), 685 (-), 902 (-), 1011 (-), 1122 (-), 1333 (-), 1374 (-), 1734 (-), 1795 (-), 1822 (-), 1839 (-), 1859 (-), 2278 (-), 2283 (-), 2366 (-), 2404 (-), 2431 (-)	AAAG	Yanagisawa S. et al., Plant J 17:209-214 (1999); Yanagi-sawa S. Plant J 21:281-288 (2000)	C- Stoffwechsel
DPBFCOREDCDC3	745 (+), 1226 (+), 2149 (+), 108 (-), 1360 (-)	ACACNNG	Kim S.Y. et al., Plant J 11: 1237-1251 (1997); Finkelstein R.R. et al., Plant Cell 12: 599-609 (2000); Lopez-Molina L. et al., Plant Cell Physiol 41:	ABA

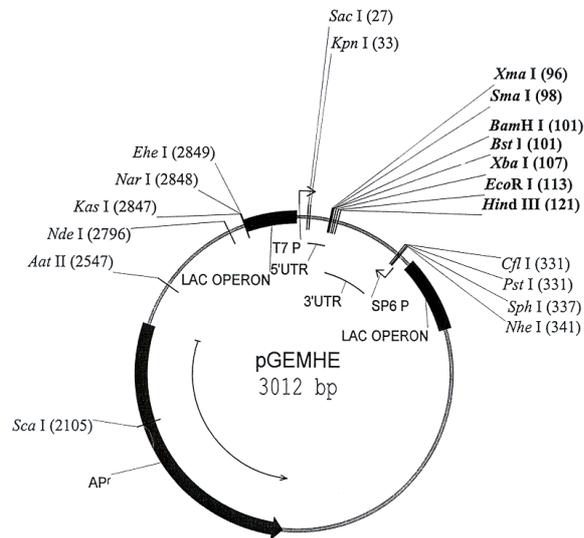
EBOXBNNAPA	108 (+), 737 (+), 960 (+), 1026 (+), 1227 (+), 2449 (+), 108 (-), 737 (-), 960 (-), 1026 (-), 1227 (-), 2449 (-)	CANNTG	541-547 (2000) Stalberg K. et al., <i>Planta</i> 199:515-519 (1996)	Speicherung
ERELEE4	462 (+), 1559 (+), 675 (-)	AWTTCAAA	Itzhaki H. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 91:8925-8929 (1994); Montgomery J. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 90:5939-5943 (1993)	Ethylen, Seneszens
GATABOX	245 (+), 351 (+), 359 (+), 421 (+), 560 (+), 811 (+), 939 (+), 974 (+), 1015 (+), 1038 (+), 1153 (+), 764 (-), 1210 (-), 1383 (-), 1463 (-), 1526 (-), 1992 (-)	GATA	Lam E. et al., <i>Plant Cell</i> 1:1147-1156 (1989); Gilmar- tin P.M. et al., <i>Plant Cell</i> 2:369-378 (1990); Benfey P.N. et al., <i>Science</i> 250:959- 966 (1990); Gidoni D. et al., <i>Mol Gen Genet</i> 215: 337-344 (1989)	Licht, vaskuläre Expression
GT1CONSENSUS	47 (+), 126 (+), 239 (+), 245 (+), 279 (+), 359 (+), 634 (+), 666 (+), 939 (+), 974 (+), 993 (+), 1038 (+), 1153 (+), 1177 (+), 1595 (+), 1674 (+), 1691 (+), 2164 (+), 2165 (+), 2178 (+), 1499 (-), 1516 (-), 1355 (-), 1381 (-), 1461 (-), 1517 (-), 2106 (-)	GRWAAW	Terzaghi W.B. et al., <i>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</i> 46:445-474 (1995); Villain P. et al., <i>J Biol Chem</i> 271:32593-32598 (1996); Buchel A.S. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 40:387-396 (1999); Zhou D.X. et al., <i>Trends in Plant Science</i> 4:210-214 (1999)	Licht
GT1CORE	385 (+), 1130 (+), 387 (-)	GGTTAA	Green P.J. et al, <i>EMBO J</i> 7:4035-4044 (1988); Gilmar- tin P.M. et al., <i>Plant Cell</i> 2:369-378 (1990); Terzaghi W.B. et al., <i>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</i> 46:445-474 (1995)	Licht
GTGANTG10	367 (+), 754 (+), 1325 (+), 1633 (+), 2330 (+), 766 (-), 1212 (-), 2110 (-), 2397 (-)	GTGA	Rogers H.J. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 45: 577-585 (2001)	Pollen
HEXAMERATH4	21 (-)	CCGTCCG	Chaubet N. et al., <i>Plant J</i> 10:425-435 (1996)	
IBOX	245 (+), 359 (+), 560 (+), 939 (+), 974 (+), 1038 (+), 1153 (+), 1382 (-), 1462 (-)	GATAAG	Giuliano G. et al., <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 85:7089-7093 (1988); Donald R.G.K. et al., <i>EMBO J</i> 9:1717-1726 (1990); Rose A. et al., <i>Plant J</i> 20: 641- 652 (1999)	Licht
INRNTPSADB	1831 (+), 2271 (+), 2466 (+), 722 (-), 917 (-), 1588 (-), 1692 (-)	YTCANTYY	Nakamura M. et al., <i>Plant J</i> 29: 1-10 (2002)	Licht
LTRECOREATCOR15	2257 (+), 2160 (-)	CCGAC	Baker S.S. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 24:701-713 (1994); Busk P.K. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 37:425-435 (1998); Kim H.J. et al., <i>The Plant J</i> 29: 693-704 (2002)	ABA, Trocken- stress, Licht
MARABOX1	283 (+), 287 (+), 2023 (-), 2027 (-), 2031 (-)	AATAAAYAA A	Gasser S.M. et al., <i>Intnatl Rev Cyto</i> 119:57-96 (1989)	Matrix- Anheftung
MARARS	2118 (-)	WTTTATRIT TW	Gasser S.M. et al., <i>Intnatl Rev Cyto</i> 119:57-96 (1989)	Matrix- Anheftung
MARTBOX	2099 (+), 2100 (+), 2101 (+), 169 (-), 495 (-), 777 (-), 830 (-), 831 (-), 832 (-), 833 (-), 867 (-), 870 (-), 885 (-), 911 (-), 994 (-), 1053 (-), 1056 (- (-), 1156 (-), 1157 (-), 1158 (- (-), 1617 (-), 2063 (-), 2086 (- (-), 2087 (-)	TTWTWTTW TT	Gasser S.M. et al., <i>Intnatl Rev Cyto</i> 119:57-96 (1989)	Matrix- Anheftung
MYB26PS	1544 (-)	GTTAGGTT	Uimari A. et al., <i>Plant J</i>	Phenylpro-

			12:1273-1284 (1997)	panoid-synthese
MYB2AT	1892 (+), 472 (-), 2235 (-), 2529 (-)	TAACTG	Urao T. et al., <i>Plant Cell</i> 5:1529-1539 (1993)	Trocken-Stress
MYBCORE	472 (+), 696 (+), 2235 (+), 2529 (+), 2219 (-), 1892 (-)	CNGTTR	Luscher B. et al., <i>Genes Dev.</i> 4:2235-2241 (1990); Urao T. et al., <i>Plant Cell</i> 5:1529-1539 (1993); Solano R. et al., <i>EMBO J</i> 14:1773-1784 (1995)	Trocken-Stress
MYBGAHV	476 (+), 784 (+), 801 (+), 2419 (+), 2209 (-)	TAACAAA	Gubler F. et al., <i>Plant Cell</i> 7:1879-1891 (1995); Morita A. et al., <i>FEBS Lett</i> 423:81-85 (1998)	GA, Amylase, Zucker
MYBPLANT	1544 (+)	MACCWAMC	Sablowski R.W.M. et al., <i>EMBO J</i> 13:128-137 (1994); Tamagnone L. et al., <i>Plant Cell</i> 10: 135-154 (1998)	Phenylpropanoid-synthese
MYBST1	1383 (-)	GGATA	Baranowskij N. et al., <i>EMBO J</i> 13:5383-5392 (1994)	
MYCATRD22	1227 (+)	CACATG	Abe H. et al., <i>Plant Cell</i> 9:1859-1868 (1997); Busk P.K. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 37:425-435 (1998)	Trocken-Stress, ABA
NTBBF1ARROLB	901 (+), 322 (-), 941 (-)	ACTTTA	Baumann K. et al., <i>Plant Cell</i> 11:323-333 (1999)	Auxin, Gewebespezifität
POLASIG1	129 (+), 169 (+), 195 (+), 220 (+), 283 (+), 287 (+), 291 (+), 312 (+), 405 (+), 498 (+), 914 (+), 932 (+), 952 (+), 1049 (+), 1056 (+), 1081 (+), 1565 (+), 1617 (+), 2063 (+), 2375 (+), 180 (-), 2023 (-), 2027 (-), 2031 (-), 2035 (-), 2548 (-)	AATAAA	Joshi C.P.; <i>Nucleic Acids Res</i> 15:9627-9640 (1987); O'Neill S.D. et al., <i>Mol Gen Genet</i> 221:235-244 (1990)	Poly-A-Signal, höhere Pflanzen
POLASIG2	826 (+), 881 (+), 1043 (+), 1752 (+), 1757 (+), 1865 (+), 2485 (+), 184 (-), 1403 (-), 1409 (-), 1431 (-), 1735 (-)	AATTAAT	O'Neill S.D. et al., <i>Mol Gen Genet</i> 221:235-244 (1990)	Poly-A-Signal, Amylase
POLASIG3	174 (+), 209 (+), 212 (+), 415 (+), 435 (+), 459 (+), 929 (+), 2016 (+), 1739 (-), 2048 (-)	AATAAT	Heidecker G. et al., <i>Ann Rev Plant Physiol</i> 37:439-466 (1986); Joshi C.P., <i>Nucleic Acids Res</i> 15:9627-9640 (1987)	Poly-A-Signal, höhere Pflanzen
POLLENILELAT52	46 (+), 125 (+), 233 (+), 354 (+), 571 (+), 969 (+), 1169 (+), 1176 (+), 1594 (+), 1685 (+), 1690 (+), 1929 (+), 1952 (+), 2177 (+), 2183 (+), 274 (-), 1702 (-), 1813 (-), 1836 (-), 2275 (-), 2368 (-), 2433 (-), 2571 (-)	AGAAA	Bate N. et al., <i>Plant Mol Biol</i> 37:859-869 (1998)	Pollen
PYRIMIDINEBOXHV	2164 (-)	TTTTTTCC	Cercos M. et al., <i>Plant J</i> 19: 107-118 (1999)	GA, ABA
RAV1AAT	508 (+), 1224 (+), 1267 (+), 1775 (+), 1778 (+), 2219 (+), 1978 (-)	CAACA	Kagaya Y. et al., <i>Nucleic Acids Res</i> 27: 470-478 (1999)	
REALPHALGLHCB21	896 (+), 383 (-), 599 (-)	AACCAA	Degenhardt J. et al., <i>Plant Cell</i> 8: 31-41 (1996)	Licht
ROOTMOTIFTAPOX1	41 (+), 153 (+), 318 (+), 812 (+), 1427 (+), 2009 (+), 2020 (+), 2058 (+), 2132 (+), 317 (-), 906 (-), 982 (-), 997 (-), 1092 (-), 1182 (-), 1426 (-), 1574 (-), 1919 (-), 2008 (-), 2019 (-), 2057 (-)	ATATT	Elmayan T. et al., <i>Transgenic Res</i> 4:388-396 (1995)	Wurzel

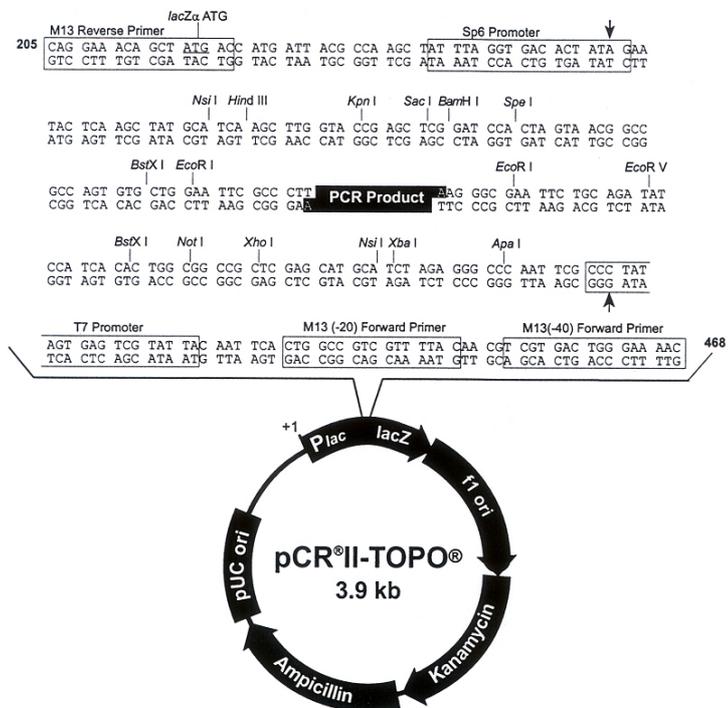
RYREPEATBNNAPA	256 (+), 1306 (+)	CATGCA	Ezcurra I. et al., Plant Mol Biol 40:699-709 (1999); Ezcurra I. et al., Plant J 24:57-66 (2000)	ABA
RYREPEATGMGY2	256 (+), 1306 (+)	CATGCAT	Lelievre J.-M. et al., Plant Physiol 98:387-391 (1992)	Samen
RYREPEATLEGUMIN	256 (+), 1306 (+)	CATGCAY	Fujiwara T. et al., Plant Mol Biol 24:261-272 (1994)	Gewebe-spezifität
S1FBOXSORPS1L21	2383 (+), 1366 (-)	ATGGTA	Lagrange T. et al., Mol Cell Biol 13:2614-2622 (1993)	“House-keeping role”
SEF1MOTIF	2020 (+)	ATATTTAW W	Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Speicherung
SEF4MOTIFGM7S	2116 (-), 86 (-), 494 (-), 910 (-), 1019 (-), 1083 (-), 2076 (-), 2314 (-)	RTTTTTR	Allen R.D. et al., Plant Cell 1:623-631 (1989); Lessard P.A. et al., Plant Mol Biol 16:397-413 (1991)	Embryo
SURE1STPAT21	568 (+)	AATAGAAAA	Grierson C. et al., Plant J 5:815-826 (1994)	Zucker
TAAAGSTKST1	119 (+), 293 (+), 322 (+), 593 (+), 941 (+), 1001 (+), 1133 (+), 1567 (+), 1578 (+), 1949 (+), 2488 (+), 902 (-), 1734 (-), 1859 (-)	TAAAG	Plesch G. et al., Plant J 28:455-464 (2001)	Schließzelle
TATABOX3	2059 (+), 2060 (-)	TATTAAT		TATA
TATABOX4	190 (+), 189 (-)	TATATAA		TATA
TATABOX5	181 (+), 2024 (+), 2028 (+), 2032 (+), 2036 (+), 2049 (+), 128 (-), 173 (-), 282 (-), 286 (-), 290 (-), 404 (-), 458 (-), 497 (-), 781 (-), 874 (-), 889 (-), 913 (-), 928 (-), 951 (-), 1048 (-), 1055 (-), 1080 (-), 1564 (-), 1616 (-)	TTATTT	Tjaden G. et al., Plant Physiol 108:1109-1117 (1995)	TATA
TBOXATGAPB	684 (+), 1010 (+), 1821 (+)	ACTTTG	Chan C.S. et al., Plant Mol Biol 46: 131-141 (2001)	Licht
WBBOXPCWRKY1	1553 (-)	TTTGACT	Eulgem T. et al., EMBO J 18:4689-4699; Eulgem T. et al., Trends Plant Sci (2000) 5:199-206	Schnelle Gene
WBOXATNPR1	687 (+), 1482 (+), 528 (-), 1554 (-), 2226 (-)	TTGAC	Yu D. et al., Plant Cell 13:1527-1540 (2001)	SA

8.5 Vektoren

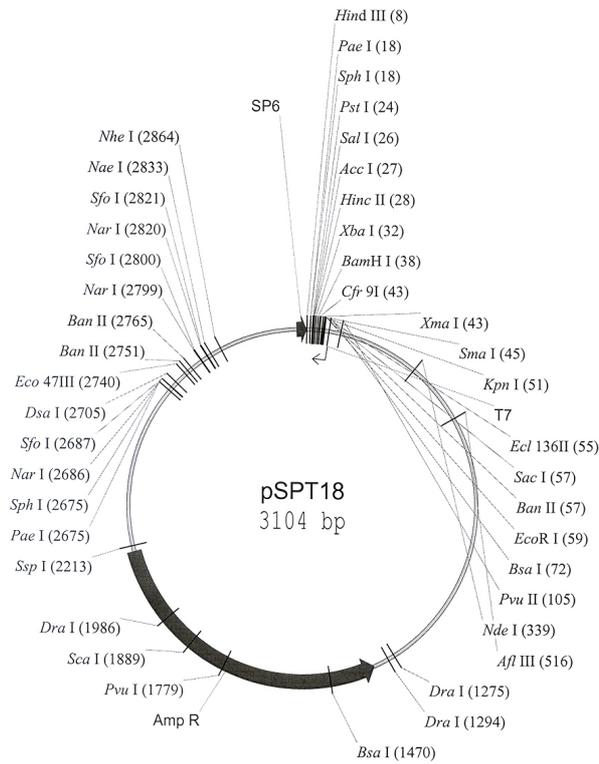
8.5.1 pGEM HE



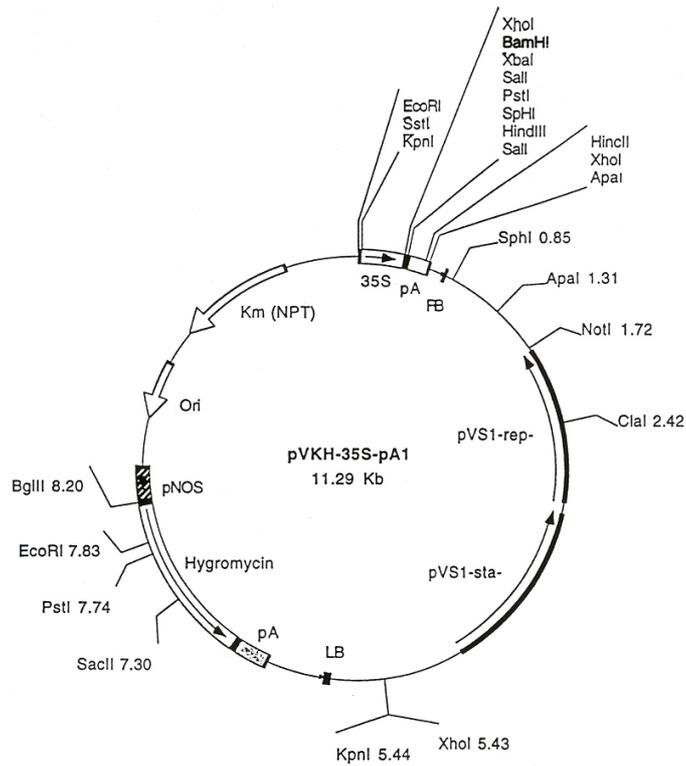
8.5.2 pCRII TOPO



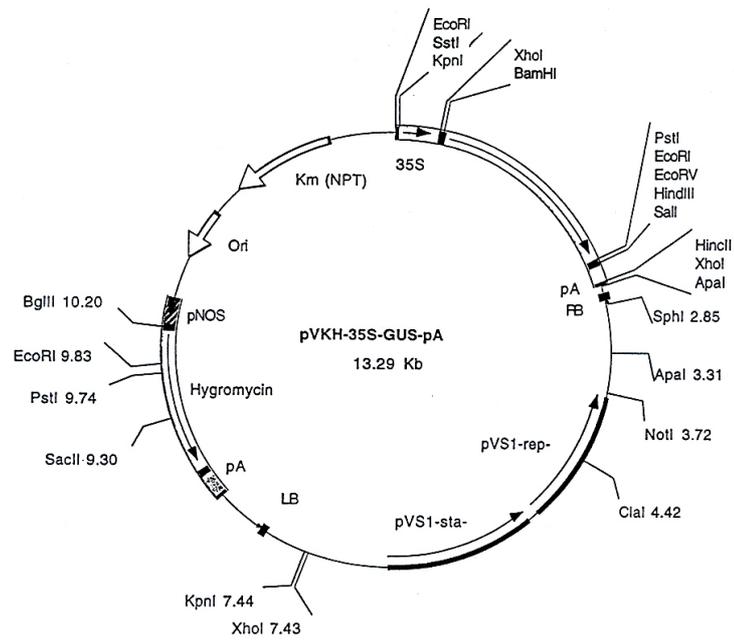
8.5.3 pSPT 18



8.5.4 pVKH-35S-pA1



8.5.5 pVKH-35S-GUS-pA



PUBLIKATIONSLISTE

Langer K., Ache P., Geiger D., Stinzinger A., Arend M., Wind C., Regan S., Fromm J. and Hedrich R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant J.*, 32, 997-1009.

Langer K., Levchenko V., Fromm J., Geiger D., Steinmeyer R., Ache P. and Hedrich R. (2003) The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud development. *Plant J., eingereicht.*

Wind C., Stinzinger A., Arend M., Langer K., Becker D., Ache P., Fromm J. and Hedrich R. (2003) Cellular and subcellular localisation of ion channels and electrical properties of poplar cells involved in wood production. *in Vorbereitung.*

VORTRÄGE

International Graduate Program, Plant Responses to Physical, Chemical And Biological Constraints, Retzbach 1999, "The role of K⁺ channels involved in wood formation".

Rhein-Main-Kolloquium der Botanischen Institute, Darmstadt 2000, „Kaliumabhängiges Holzwachstum“.

3. Schwerpunktkolloquium „Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum“ SPP 717, Berlin 2001, „Kaliumabhängiges Holzwachstum der Pappel *Populus tremula x Populus tremuloides*“.

3. Schwerpunktkolloquium „Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen“ SPP 1084, Bad Honnef 2002, „Stimulation der Mykorrhiza-abhängigen Kaliumaufnahme bei *Populus* und *Medicago*“.

Biowissenschaftliches Seminar des Julius-von-Sachs-Instituts, Würzburg 2003, „Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis“.

POSTERPRÄSENTATIONEN

Deutsche Botanikertagung, Jena 2000, „The role of ion channels in wood production“.

3. Schwerpunktkolloquium „Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum“ SPP 717, Berlin 2001, „Low and High Affinity Potassium Transporters in the Poplar Tree“.

Forschergruppe „Poplar - a model to address tree-specific questions“, Göttingen 2002, „Potassium dependent wood formation“.

Deutsche Botanikertagung, Freiburg 2002, „Potassium dependent wood formation – Regulation of potassium transporters in the poplar tree“.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katharina Langer
Geburtsdatum: 22.04.1975
Geburtsort: Nordhausen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1981 - 1989 Adolf Diesterweg Schule, Nordhausen
1989 - 1995 Maristenkolleg Mindelheim, Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium
06/ 1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/ 1995 – 10/ 1997 Studium der Biologie an der Universität Ulm
10/ 1997 Erwerb des Vordiploms
10/ 1997 – 03/ 2000 Studium der Biologie an der Julius- Maximilians- Universität Würzburg mit den Wahlfächern Pflanzenphysiologie, Pharmabiologie und Biochemie
06/ 1999 – 02/ 2000 Diplomarbeit am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik zum Thema: „Kaliumabhängiges Holzwachstum der Pappel: Klonierung und Charakterisierung von Kaliumtransportern aus *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.“, unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Hedrich
04/ 2000 Erwerb des Diploms in Biologie

Praktika:

03/ 1998 Bayer AG, Pharma Technik Elberfeld, Abt. Biotechnikum Mikrobiologie
08/ 1998 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abt. Strukturforschung, bei Prof. Dr. R. Hubert
11/ 1998 Salus-Haus, Bruckmühl, Wiss. Abteilung

Berufstätigkeit:

04/ 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg
04/ 2000 Beginn der Dissertation am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. R. Hedrich

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre weiterhin, dass ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Mai 2003

(Katharina Langer)

MEIN DANK GILT

An erster Stelle Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Vergabe des sehr interessanten und spannenden Themas und seine zahlreichen, motivierenden Anregungen,
Prof. Dr. Heinz Rennenberg und Prof. Dr. Andrea Polle für ihr Interesse an dieser Arbeit und ihre Bereitschaft, die Zweit- und Drittkorrektur zu übernehmen,
Dr. Peter Ache für die gute Betreuung und sorgfältige Korrekturlesung,
Dietmar Geiger und Andrea Stinzing für die elektrophysiologischen Messungen,
Christa Wind, Dr. Matthias Arend und Prof. Dr. Jörg Fromm für die Holzstudien und Immunolokalisationen,
Dr. Dirk Becker, der sich bereitwillig als Korrekturleser zur Verfügung gestellt hat,
Jeanette Arnold für die aufmerksame Korrekturlesung und ihre stets hilfsbereite Einstellung,
Oliver Meyerhoff für seine hilfreichen Tipps im Laboralltag und am Computer,
Eva Wirth und Elfriede Reisberg für die Bereitstellung der Kulturmedien in den letzten zwei Jahren,
der gesamten Arbeitsgruppe Hedrich für die angenehme Atmosphäre,
der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die dieses Projekt finanzierte,
Roland, der mich die ganze Zeit über begleitet hat und
meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und für mich da sind.