

Aufklärung der molekularen Struktur und Funktion des R-Typ Anionenkanals QUAC1 in Schließzellen



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

vorgelegt von

Dennis Imes

Würzburg 2016

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

“...when you have eliminated all which is impossible, then whatever remains, however improbable, must be the truth.”

Sherlock Holmes

„Siebenmal hinfallen, achtmal aufstehen.“

Japanisches Sprichwort

Glossar

ABA	Abscisinsäure, <i>engl.</i> abscisic acid
ABI1/2	<i>engl.</i> ABA-insensitive 1/2
AHG	<i>engl.</i> ABA-hypersensitive germination
ALMT	Aluminium aktivierter Malat Transporter
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ABC-Transporter	<i>engl.</i> ATP-binding cassette Transporter
AtQUAC1/etc.	<i>Arabidopsis thaliana</i> QUAC1/etc.
BiFC	<i>engl.</i> Bimolecular Fluorescence Complementation
bp	Basenpaare
CaCCs	<i>engl.</i> Calcium activated Chloride Channels
Cam	Chloramphenicol
CBL	<i>engl.</i> Calcineurin B like Protein
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CDPK	<i>engl.</i> Calcium-Dependent Protein Kinases
CFTR	<i>engl.</i> Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CIPK	<i>engl.</i> CBL Interacting Protein Kinase
CLC	<i>engl.</i> Chloride Channel
cRNA	copy Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIDS	<i>engl.</i> 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic acid
GCAC1	<i>engl.</i> Gurad Cell Anion Channel 1
GFP	Grün fluoreszierendes Protein, <i>engl.</i> Green Fluorescent Protein

GORK	<i>engl.</i> Guard Cell Outward Rectifying K-channel
HAB	<i>engl.</i> Homologue ABA insensitive
I_{Inst}	Instantane Ströme, <i>engl.</i> Instantaneous Currents
I_{ss}	Gleichgewichtsströme, <i>engl.</i> Steady State Currents
IVT	<i>In vitro</i> Transcription
Kan	Kanamycin
KAT1	<i>engl.</i> Potassium Channel <i>Arabidopsis thaliana</i> 1
k.o.	<i>engl.</i> knock out
LSM	<i>engl.</i> Laser Scanning Microscope
MDR	<i>engl.</i> Multi Drug Resistent
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
min	Minute
M	Molar
NFL	<i>engl.</i> niflumic acid
nt	Nukleotide
OST1	<i>engl.</i> Open Stomata 1
P_0	relative Offenwahrscheinlichkeit
$P_{1/2}$	halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
QUAC1	schneller Anionen Kanal, <i>engl.</i> Quick Anion Channel
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
R-Typ	<i>engl.</i> Rapid Anion Channel
s	Sekunde
SD	Standardabweichung, <i>engl.</i> Standard Deviation

SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standardfehler, <i>engl.</i> Standard Error of Mean
SLAC1	langsamer Anionen Kanal, <i>engl.</i> Slow Anion Channel
SNF	<i>engl.</i> Sucrose Non-Fermenting
SNP	<i>engl.</i> Single Nucleotide Polymorphism
SnRK	<i>engl.</i> SNF1 Related Kinasen
S-Typ	<i>engl.</i> Slow Anion Channel
TE	TRIS-EDTA Puffer
TEVC	Zwei Elektroden Spannungsklemme, <i>engl.</i> Two Electrode Voltage Clamp
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSAC	<i>engl.</i> Tobacco Suspension Anion Channel
μ	Micro (10^{-6})
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> (Afrikanischer Krallenfrosch)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein, <i>engl.</i> Yellow Fluorecent Protein

Glossar 7

1 Einleitung 14

1.1 Stomata regulieren den Gasaustausch in Landpflanzen 14

1.2 Stomatypen und -aufbau 14

1.3 Stomabewegung 17

1.4. Kationentransporter der Schließzellmembran..... 18

1.4.1 Funktion von Kationentransportern bei der Stomaöffnung..... 18

1.4.2 Funktion von Kationenkanäle beim Stomaschluss..... 20

1.5 Anionentransport in der Schließzellmembran: Die S-Typ und R-Typ Kanäle..... 21

1.5.1 Die molekulare Basis für S-Typ Ströme blieb lange ungewiss..... 24

1.5.2 Der genetische Ursprung für R-Typ Ströme war noch ungeklärt 25

1.6 Die ALMT-Familie 27

1.6.1 Ursprünglich beschriebene Funktion von ALMTs bei der Al^{3+} -Detoxifizierung 27

1.6.2 ALMT Phylogenie offenbart weitere funktionell andersartige Vertreter..... 28

1.6.3 Organische Säuren des Citratzyklus sind bevorzugte Transportionen der ALMTs..... 31

1.6.4 Mutagenesestudien liefern erste Hinweise auf die Porenregion der ALMTs 32

1.6.5 Die Topologie der ALMTs wird kontrovers diskutiert 33

1.6.6 Bestehen funktionelle ALMTs aus einer oder mehreren Untereinheiten? 34

1.6.7 ALMTs werden auf posttranslationaler Ebene reguliert 35

1.7 Regulation des Stomaschlusses 37

1.7.1 Das Stresshormon ABA lässt Stomata bei Trockenheit schließen..... 38

1.7.2 Zytoplasmatische ABA-Rezeptoren perzeptieren das Phytohormon..... 39

1.7.3 Die Rolle von PP2C-Phosphatasen (ABI1/ABI2) in der ABA-Signalkaskade..... 40

1.7.4 Kinasen sind positive Regulatoren innerhalb der ABA-Signalkaskade 41

1.8 Übersicht über die Regulation der Stomaöffnung und des Stomaschlusses 48

1.9 Zielsetzung 50

2 Material und Methoden 52

2.1 Arbeiten mit Bakterien 52

2.1.1 Kultivierung und Lagerung von E. coli..... 52

2.1.2 Transformation 52

2.2 Molekularbiologische Methoden.....	52
2.2.0 Überblick der RNA Expression in Oozyten und Elektrophysiologischer Messungen....	52
2.2.1 USER™ System.....	53
2.2.1.1 Herstellung der USER Vektoren.....	54
2.2.1.2 Einbringen von USER Fragmenten in Vektoren.....	57
2.2.2 Plasmidisolierung und Reinigung.....	57
2.2.3 PCR.....	58
2.2.3.1 IVT PCR.....	58
2.2.4 Mutagenese mit Hilfe des USER Systems.....	59
2.2.5 In Vitro Transkription (IVT).....	60
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	61
2.2.7 RNA-Gelelektrophorese.....	61
2.2.8 cRNA Injektion.....	63
2.3 Präparation von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>.....	64
2.4 Fluoreszenzmikroskopie und Kollokalisation.....	65
2.4.1 BIFC und YFP/GFP Detektion.....	65
2.4.2 Lokalisation des N- und C-Terminus von QUAC1.....	65
2.5 Two Electrode Voltage Clamp (TEVC).....	66
2.5.1 Definition von Stromrichtung, Einwärts- und Auswärtsstrom.....	66
2.5.2 Methodischer Aufbau und Ablauf.....	68
2.5.3 Datenanalyse.....	70
2.5.4 Medienzusammensetzung.....	73
<u>3 Ergebnisse.....</u>	<u>74</u>
3.1 Fluoreszenzmikroskopie bestätigt transiente QUAC1 Expression in Oozyten.....	75
3.2 QUAC1 Ströme korrelieren mit externer Chloridkonzentration.....	76
3.3 Externes Malat aktiviert QUAC1.....	80
3.4 Einwärtsströme werden durch intrazelluläres Malat erhöht.....	84
3.5.1 Synergistische Effekte von intra- und extrazellulärem Malat auf QUAC1.....	87
3.5.2 Verschiebung des Umkehrpotentials korrespondiert mit experimentellen Werten	90
3.6 Sulfat ist ebenfalls ein permeierendes Ion.....	91
3.7 Externes Aluminium zeigt auf QUAC1 keine Wirkung.....	93
3.8 Komponenten des schnellen ABA-Signalweges regulieren die Aktivität von QUAC1	95
.....	

3.9 Kalziumabhängige Komponenten des ABA-Signalweges beeinflussen die Aktivität von QUAC1	101
3.10 Orientierung des N- und C- Terminus von QUAC1	105
3.11 Einfluss des C- und N- Terminus auf das Verhalten von QUAC1	108
3.12 Veränderungen des QUAC1 C-Terminus führen zum Verlust der Kanalfunktion	112
3.12.1 Phosphorylierungsmutanten ändern nicht die Aktivität von QUAC1.....	116
<u>4 Diskussion</u>	<u>118</u>
4.1 Intra- und extrazelluläres Malat offenbart R-Typ Charakteristiken von QUAC1 .	119
4.2 QUAC1 ist ein Chlorid leitender Kanal	123
4.3 Weitere Anionen können QUAC1 ebenfalls permeieren und modulieren.....	124
4.4 QUAC1 repräsentiert nur die Malat-sensitive Komponente der R-Typ Ströme in Schließzellen.....	126
4.5 QUAC1 zeigt keine Aktivierung durch Aluminium.....	127
4.6 Topologie wirft weiterhin Rätsel auf	129
4.7 pH-sensitive YFP Fluoreszenz gibt Hinweise auf die Orientierung des C- und N-Terminus	130
4.8 C-terminale Veränderungen beeinträchtigen die Funktionalität des Kanals.....	133
4.9 QUAC1 wird über Kinasen und Phosphatasen der schnellen ABA-Signalkaskade reguliert	137
4.9.1 Koexpression von OST1 und QUAC1 steigert Ein- und Auswärtsströme von QUAC1	138
4.9.2 ABI1 unterbindet den aktivierenden Effekt von OST1 auf QUAC1	139
4.9.3 Phosphorylierungsposition in QUAC1 weiterhin ungewiss.....	139
4.9.4 Kinasen des Kalziumunabhängigen ABA-Signalweges (CDPKs) interagieren und aktivieren QUAC1.....	140
4.9.5 QUAC1 Homologe in anderen Pflanzen werden vermutlich auch durch die ABA-Signalkaskade angesteuert.....	142
4.9.6 QUAC1/SLAC1/SLAH3 werden gleichzeitig durch die ABA-Signalkaskade reguliert und bewirken so den Stomaschluss	142
<u>5 Zusammenfassung.....</u>	<u>144</u>

6 Summary	147
7 Anhang	150
7.1 Eidesstattliche Erklärung	150
7.2 Danksagung.....	151
7.3 Primerliste.....	152
7.4 Lebenslauf.....	153
7.5 Publikationen	154
7.6 Literaturliste	155

1 Einleitung

1.1 Stomata regulieren den Gasaustausch in Landpflanzen

Wasser stellt für Pflanzen eine essentielle Ressource dar. Nach dem Übergang von einer aquatischen Lebensweise zur Landbesiedelung mussten die frühen Landpflanzen Strategien entwickeln, um die schwankende Wasserverfügbarkeit auszugleichen. Durch die Entwicklung von Wurzeln konnten Landpflanzen das Wasserreservoir im Boden erschließen. Zudem entwickelten sie weitere Anpassungen zur effektiven Wasseraufnahme und Wasserkonservierung. Primär schützen sich Landpflanzen gegen Austrocknung durch Bildung einer dichten Epidermis, die zusätzlich mit einer Wachsschicht (Kutikula) überzogen ist (Edwards 1993; Yeats and Rose 2013). Um dennoch einen Austausch von Gasen (CO_2 , O_2) und Wasser mit der Umwelt zu erlauben, sind Öffnungen in der Pflanzenepidermis eingelassen, die je nach Bedarf geöffnet und geschlossen werden können. Die Öffnungsweite der sogenannten Stomata wird durch biotische Faktoren wie z.B. Pathogenbefall (Melotto, Underwood et al. 2006), sowie durch abiotische Faktoren, wie z.B. Lichteinstrahlung, CO_2 -Partialdruck im Blatt als auch die Temperatur oder die Verfügbarkeit von Wasser beeinflusst (Willmer and Fricker 1996; MacRobbie 1998; Hedrich, Neimanis et al. 2001). Wenn Licht auf die Pflanze fällt, startet die Photosynthese, wodurch der CO_2 -Partialdruck im Blatt sinkt und sich die Stomata daraufhin öffnen, um aus der Umgebung CO_2 aufzunehmen. Hohe Temperaturen können ebenfalls dazu führen, dass sich die Stomata öffnen, um die Verdunstung zu erhöhen, was einen kühlenden Effekt auf die Pflanze hat. Damit einher geht jedoch immer ein erhöhter Wasserverlust, der bei Trockenheit im Boden oder in der Luft schnell zum Welken der Pflanze führen würde. In dieser Situation synthetisiert die Pflanze das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), das über einen kurzen Signalweg zum schnellen Stomaschluss führt (MacRobbie 1998; Kim, Bohmer et al. 2010; Hedrich 2012).

1.2 Stomatypen und -aufbau

Die meisten Stomata befinden sich in den Blättern der Pflanzen, sind aber auch an anderen der Luft zugänglichen Pflanzenteilen zu finden (Willmer and Fricker 1996). Je nachdem wie die Stomata in den Blättern angeordnet sind, unterscheidet man zwischen hypo-, hyper- und amphistomatischen Blättern.

Bei hypostomatischen Blättern befinden sich die Stomata auf der Blattunterseite. Die Stomata sind so vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt. Da sich die Blattunterseite nicht so schnell aufheizt wie die Blattoberseite, schützt diese morphologische Anpassung vor erhöhter Transpiration. Dieser Blattpertyp ist am weitesten verbreitet und kommt in vielen Pflanzenfamilien vor.

Hyperstomatistische Blätter haben ihre Stomata auf der Blattoberseite angeordnet. Dieser Blattpertyp ist häufig bei Schwimmblättern von Wasserpflanzen anzutreffen, wie z.B. bei Seerosen (*Nymphaeaceae*). Der Transpirationsschutz kann hier vernachlässigt werden und ein optimaler Gasaustausch wird durch diesen Aufbau erreicht, da der Wind über die Blattoberseite streifen kann. Bei auf dem Wasser liegenden Blättern wäre eine Lokalisation der Stomata auf der Unterseite von Blättern eher hinderlich, da dort ein direkter Kontakt zum Wasser entstehen würde, was einen Gasaustausch behindert.

Amphistomatistische Blätter besitzen sowohl auf der Blattoberseite als auch der Blattunterseite Stomata. Beispiele hierfür sind Gräser oder die Nadeln von Koniferen.

Der Stomaapparat ist ein Komplex aus mehreren Zellen, wobei man zwischen Haupt- und Nebenzellen unterscheidet (Bergmann and Sack 2007). Direkt hinter den Stomata befindet sich der Interzellularraum, eine Art Atemhöhle, an dem die photosynthetisch aktiven Gewebe angrenzen. Durch diesen Aufbau wird ein effektiver Gasaustausch mit dem Palisaden- und Schwammparenchym des Blattes erreicht. Das eigentliche Stoma wird von den beiden Hauptzellen (Schließzellen) gebildet. In der Natur haben sich verschiedene Arten bzw. Bautypen von Stomata entwickelt. Man unterscheidet zwischen dem bohnenförmigen Helleborus-Typ, dem hantelförmigen Gramineen-Typ, dem reduzierten Mniun-Typ sowie dem Amaryllideen-Typ (Abbildung 1.2.1). Der Helleborus-Typ kommt vor allem bei zweikeimblättrigen Pflanzen (Dicotyledoneae) vor, der hantelförmige Gramineen-Typ hingegen existiert nur in Gräsern. Der reduzierten Mniuntyp ist nur in Farnen und Moosen anzutreffen. Stomata des Amaryllideen-Types sind unter anderem in der Gattung der Amaryllis anzutreffen.



Abbildung 1.2.1: Mikroskopische Aufnahmen der beiden häufigsten Stomatatypen. Links die bohnenförmigen Schließzellen des Helleborus-Typ anhand des Beispiels der Tagblume (*Commelina communis*). Rechts die hantelförmigen Schließzellen des Gramineen-Typ wie er in den Gräsern vorkommt, hier am Beispiel von Reis (*Oryza sativa*). Abbildung wurde aus (Hetherington and Woodward 2003) entnommen.

Neben ihrer äußeren Erscheinung unterscheiden sich die Typen auch in dem Grad und der Art wie ihre Zellwände verdickt sind. Diese Verdickungen sind essentiell für das Öffnen und Schließen der Stomata, und beeinflussen auch die Richtung in welche sich die Schließzellen bei Turgorabnahme (Wasserabgabe) oder Turgorerhöhung (Wasseraufnahme) zusammenziehen bzw. ausdehnen können. Der Mniun-Typ hat weitgehend unverdickte Zellwände, bei Turgorerhöhung runden sich die Zellen ab und geben den Atemspalt frei. Die Bewegung der Zellen erfolgt dabei eher senkrecht zur Epidermisoberfläche. Der Gramineen-Typ zeigt unverdickte Zellwände in den Keulenbereichen, wohingegen die „Griffe“ der Hanteln stark verdickt sind. Bei Turgorzunahme schwellen die blasenförmigen Zellenden an, und ziehen somit die formstabilen Mittelteile parallel zur Blattepidermis auseinander (Shoemaker and Srivastava 1973). Beim Amaryllideen-Typ ist die Bauchwand stark verdickt und die Rückenwand flexibel, so kann eine Ausdehnung und Bewegung der Zellen parallel zur Epidermisoberfläche stattfinden. Der Helleborus-Typ ähnelt dem Amaryllideen-Typ. Auch hier sind die Zellwände unterschiedlich stark verdickt, bei Turgorzunahme schwellen die Schließzellen zu den Nebenzellen hin an, jedoch erfolgt hier eine asymmetrische Bewegung senkrecht und parallel zur Epidermisoberfläche, ähnlich einem Gelenk (Demicheli and Sharpe 1973). Während des Ausdehnens oder Schrumpfens der Schließzellen kommt es zu großen Volumenänderungen, welche auch eine Anpassung der Zellmembran erfordern. Dies wird durch Internalisierung bzw. Remobilisierung der Zellmembran gewährleistet. Hierbei werden bei Volumenzunahme durch Exozytose-Vesikel mit der Zellmembran verschmolzen

bzw. werden Vesikel durch Endozytose bei der Volumenreduzierung aus der Zellmembran abgeschnürt (Shope, DeWald et al. 2003).

1.3 Stomabewegung

Die Öffnungsweite der Stomata kann durch die Pflanze reguliert werden, und sich somit den Umweltbedingungen anpassen. In Abschnitt 1.2 wurde bereits beschrieben, wie hierbei die unterschiedliche Ausprägung der Zellwanddicke in Schließzellen eine wichtige Rolle spielt. Diese morphologischen Eigenschaften der Schließzellen ermöglichen ein Öffnen und Schließen der Stomata durch Erhöhen bzw. Senken des Turgors (Franks, Cowan et al. 1998). Durch die Aufnahme bzw. Abgabe von Osmotika in bzw. aus den Schließzellen wird ein passiver Nachstrom von Wasser in bzw. aus den Schließzellen induziert. Das Wasser wird dabei aus dem Apoplasten aufgenommen und diffundiert über die Zellmembran in die Schließzellen. Des Weiteren wird die Diffusion des Wassers durch Aquaporine in der Zellmembran erleichtert. Diese wasserleitenden Proteine wurden für Schließzellen nachgewiesen und bestreiten den Großteil des passiven Wasserflusses über die Zellmembran (Kaldenhoff, Kolling et al. 1993; Kammerloher, Fischer et al. 1994; Sarda, Tusch et al. 1997; Fraysse, Wells et al. 2005; Kaldenhoff and Fischer 2006; Shope and Mott 2006). Der Wasserfluß bewirkt schließlich eine Turgoränderung in den Schließzellen. Bei Turgorzunahme (Wassereinstrom) schwellen die Schließzellen an und das Stoma öffnet sich. Bei Turgorabnahme schrumpfen die Zellen und das Stoma schließt sich (Franks, Buckley et al. 2001). Für eine detaillierte Übersicht siehe Abbildung 1.8.1. Eine Steuerung des Turgors ist nur möglich, weil Schließzellen nicht mit dem umgebenden Gewebe durch Plasmodesmata verbunden und somit vom Turgor umgebender Zellen isoliert sind (Wille and Lucas 1984). Als Osmotika dienen Ionen wie Chlorid, Kalium und Malat oder Stoffwechselprodukte wie Saccharose und andere Zucker, welche durch Transport über die Zellmembran in die Zellen eingebracht oder durch Synthese in den Schließzellen hergestellt werden. Mit dem Einstrom von großen Mengen an Osmotika bzw. Ionen kann es zu ungünstigen Änderungen der Zytosolzusammensetzung kommen. Um das Milieu im Zytosol konstant zu halten, werden die osmotisch aktiven Stoffe zum Großteil in die Vakuolen der Schließzellen befördert (MacRobbie 2006; Martinoia, Maeshima et al. 2007).

1.4. Kationentransporter der Schließzellmembran

1.4.1 Funktion von Kationentransportern bei der Stomaöffnung

Wie zuvor erwähnt, wird die Stomaöffnung durch die Aufnahme von Osmotika in die Schließzellen erreicht. Dieser Prozess wird durch H^+ -ATPasen energetisiert, die sich in der Plasmamembran der Schließzellen befinden (Becker, Zeilinger et al. 1993). Durch den aktiven Transport der H^+ -Ionen in den Apoplasten, wird die Plasmamembran hyperpolarisiert. Der erzeugte elektrochemische Protonengradient wird zum einen durch sekundär-aktive Protonengekoppelte Transporter genutzt und zum anderen wird der Ionentransport über Kanalproteine durch das generierte Membranpotential angetrieben (Abbildung 1.8.1) (Assmann, Simoncini et al. 1985; Shimazaki, Iino et al. 1986). Kinoshita und Shimazaki fanden heraus, dass Blaulicht die Protonenpumpen VHA1 und VHA2 in *Vicia faba* aktiviert (Kinoshita and Shimazaki 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Blaulicht die Phosphorylierung des C-Terminus dieser H^+ -ATPasen hervorruft. Kinoshita und Shimazaki nahmen an, dass dies durch eine Blaulicht aktivierte Kinase geschieht. Die Identität der Kinase war damals jedoch noch nicht bekannt (Kinoshita and Shimazaki 1999).

In *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass die H^+ -ATPase AtAHA1 maßgeblich am Aufbau der protonenmotorischen Kraft über der Plasmamembran der Schließzellen beteiligt ist. Eine Punktmutation in AtAHA1 führte zum Phänotyp OST2 (Open Stomata 2). Diese transgenen Pflanzen sind nicht in der Lage ihre Stomata zu schließen (Merlot, Leonhardt et al. 2007). Die Punktmutation in AtAHA1 aktivierte die Protonenpumpe konstitutiv wodurch eine Inhibition der ATPase-Aktivität durch ABA verhindert wurde. Unter normalen Bedingungen führt die Anwesenheit von ABA zu einer 60–65%igen Hemmung der ATPase-Aktivität in *V. faba* (Zhang, Wang et al. 2004) und in *A. thaliana*. (Roelfsema, Staal et al. 1998). Dies ist essentiell für den Stomaschluss. Es wurde angenommen, dass eine erhöhte Aktivität der ATPase und, die daraus resultierende ABA-Insensitivität der Protonenpumpe, zu einer starken konstitutiven Hyperpolarisierung der Plasmamembran führt. Neben der Inhibierung der ATPase-Aktivität führt die Applikation von ABA auch zu einer Aktivierung von S- und R-Typ Anionenkanälen (Abschnitt 1.5). Die Aktivität dieser Anionenkanäle depolarisiert das Membranpotential der Schließzellen, um einen K^+ -Ausstrom thermodynamisch zu erlauben. Jedoch scheint die Aktivität der Anionenkanäle nicht auszureichen, um die hyperpolarisierende Wirkung der AtAHA1 Mutante aufzuheben. Deshalb wird der Stomaschluss in der *ost2* Mutante inhibiert (Merlot, Leonhardt et al. 2007).

Die Suche nach den Blaulichtrezeptoren, die für die Aktivierung der H^+ -ATPase sorgen, gestaltete sich schwierig. Es war bekannt, dass die beiden Gene *Phot1* und *Phot2* maßgeblich die Reaktion von Chloroplasten auf Licht und die Phototropismusreaktion steuern (Kagawa, Sakai et al. 2001; Sakai, Kagawa et al. 2001). Da es sich bei *Phot1* und *Phot2* um Serin/Threonin Rezeptorkinasen handelt, waren sie vielversprechende Kandidaten. Single-Knock-Out Pflanzen öffneten jedoch bei Blaulichtgabe immer noch ihre Stomata (Lasceve, Leymarie et al. 1999). Erst durch gleichzeitiges Ausschalten der beiden Gene konnten Kinoshita *et al.* zeigen, dass die Double-Knock-Out Pflanzen eine erheblich geringere Blaulichtreaktion der Stomata zeigten als der WT und die Single-Knock-Out Mutanten (Kinoshita, Doi et al. 2001). Zudem konnte in *A. thaliana* Mesophyllzellen gezeigt werden, dass Blaulicht-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle in Doppel-Knock-Out Mutanten von *Phot1* / *Phot2* nicht mehr aktiviert werden können (Stoelzle, Kagawa et al. 2003). Dieser Umstand ließ vermuten, dass Kalzium als Second Messenger fungieren könnte, und das wiederum kalziumabhängige Kinasen (CDPKs, CIPKs; Abschnitt 1.7.4) “downstream“ Zielproteine wie z.B. die H^+ -ATPase *ATAHA1* regulieren könnten.

Geöffnete Schließzellen weisen im Vergleich zu geschlossenen Schließzellen eine erhöhte K^+ -Konzentration auf. Roelfsema und Hedrich (2005) zeigten, dass geöffnete Schließzellen 2,5 pmol K^+ pro Schließzelle enthielten, wohingegen geschlossene Schließzellen nur 0,3 pmol K^+ pro Schließzelle zeigten (Humble and Raschke 1971; Fischer 1972; Outlaw and Lowry 1977). Dies lässt vermuten, dass für das Öffnen der Schließzellen die Aufnahme von Kalium eine entscheidende Rolle spielt. MacRobbie (1987) zeigte, dass *V. faba* Schließzellen bis zu 2 pmol Kalium während des Öffnens aufnehmen. Unter Berücksichtigung der Aufnahme von Gegenionen (wie z.B. Malat und Chlorid) errechnete man eine Turgorerhöhung, die zur Öffnung der Stoma ausreicht, auch wenn diese nicht vollständig stattfinden kann (MacRobbie 1987; Roelfsema and Hedrich 2005). Der Kaliumtransport wird durch die H^+ -ATPase-vermittelte Hyperpolarisation der Plasmamembran erreicht. Das negative Membranpotential befähigt Kationenkanäle dazu Kalium in die Schließzellen aufzunehmen. Da die Intensität und die Richtung des Kaliumstroms durch einen Kationenkanal nur durch den elektrochemischen Kaliumgradienten bestimmt wird, muss das Membranpotential der Schließzelle zur Aufnahme von Kalium negativer als das Umkehrpotential für Kalium liegen. In sich öffnenden Schließzellen wurden Spannungen von -100 mV bis -120 mV ermittelt (Dietrich, Sanders et al. 2001; Roelfsema, Steinmeyer et al. 2001). Beim gegebenen Kaliumgradienten reicht dieses Membranpotential aus, um Kalium entgegen des chemischen K^+ -Gradienten in die Schließzellen aufzunehmen (Abbildung 1.8.1).

Der erste identifizierte und klonierte Kationenkanal in Schließzellen war KAT1 (Schachtman, Schroeder et al. 1992; Nakamura, McKendree et al. 1995). Bei KAT1 handelt es sich um einen sechs Transmembranen umfassenden Kanal der zur Familie der Shaker-Kanäle gehört, welcher stark in der Plasmamembran von Schließzellen exprimiert wird (Nakamura, McKendree et al. 1995; Dietrich, Sanders et al. 2001; Sharma, Dreyer et al. 2013). Die vierte Transmembran des Kanals dient als Spannungssensor, und nimmt die Hyperpolarisation in der Plasmamembran wahr und übersetzt das Spannungssignal in das Öffnen der Kanalpore. Durch Knock-Out Mutanten von KAT1 in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass der Verlust von KAT1 nicht zu einer Inhibition der Stomaöffnung führen muss (Szyroki, Ivashikina et al. 2001). Neben KAT1 wurden noch weitere einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle der Shakerfamilie in Schließzellen gefunden (AKT1, AKT2/3, KC1, KAT2). Als Homo- oder Heterotetramere vermitteln sie zusammen die hyperpolarisations-aktivierte Aufnahme von Kalium in Schließzellen (Dreyer, Antunes et al. 1997; Kwak, Murata et al. 2001; Sharma, Dreyer et al. 2013) und spielen deshalb eine entscheidende Rolle beim Transport des Hauptosmotikums bei der Stomaöffnung.

Zusätzlich zu der Aufnahme von Kalium ist die Bereitstellung von Zuckern (Glukose, Saccharose) und organischen Säuren eine Möglichkeit den Turgor zu erhöhen. So konnte gezeigt werden, dass der Malatgehalt in Schließzellen stark ansteigt wenn sich diese Öffnen (Allaway 1973). Auch konnten Raschke und Schnabl (1978) zeigen, dass Malat im großen Maß als Gegenion für den Kaliumstrom verwendet wird, wenn Chlorid nicht im Außenmedium vorhanden ist. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, ob Malat durch einen Abbau von Stärke in der Zelle selbst synthetisiert, aus anderen Synthesewegen (Citronensäurezyklus) rekrutiert oder ob es über einen Transporter aufgenommen wird (Abschnitt 1.5).

1.4.2 Funktion von Kationenkanäle beim Stomaschluss

Wie Felle (2000) beschreibt, kommt es beim Stomaschluss zu einer Zunahme der apoplastischen Chlorid- und Kaliumkonzentration. Diese Daten bestätigen die Theorie, dass es durch den Efflux von Anion aus der Schließzelle zu einer Depolarisation der Plasmamembran kommt (Abschnitt 1.5), wodurch wiederum spannungsabhängige einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle aktiviert werden (Roelfsema and Prins 1998; Roelfsema, Steinmeyer et al. 2001). Da durch die Depolarisation der Plasmamembran das Membranpotential positiv zum K^+ -Gleichgewichtspotential verschoben wird, kann ein Kaliumausstrom erfolgen. Als essentieller Kaliumkanal für den Stomaschluss hat sich GORK (Guard Cell Outward Rectifying K-channel) erwiesen. Dieser Kanal gehört zu der Familie Shaker-Kaliumkanäle (Dietrich, Sanders et al.

2001) und seine molekulare Identität, sowie die starke Homologie zwischen den Strömen von GORK und den K^+ -Auswärtsgleichrichtern, wurde von Ache (2000) bereits beschrieben. Im Gegensatz zu den multiplen K^+ -Importern (Dietrich, Sanders et al. 2001), scheint GORK eine besondere Stellung bei dem Efflux von Kalium einzunehmen. So zeigte die Arbeit von Hosy *et al.* (2003), dass Knock-Out Pflanzen in *A. thaliana* (*gork-1*) keine der typischen K^+ -Auswärtsströme aufwiesen, wohingegen die K^+ -Einwärtsströme immer noch präsent waren. *gork-1* Pflanzen zeigten einen verminderten Stomaschluss auf die Gabe von ABA und hatten höhere Transpirationsraten als Wildtyppflanzen. Im Gegensatz dazu hatte das Ausschalten von KAT1 keinen Einfluss auf das Verhalten der Stomabewegung (Szyroki, Ivashikina et al. 2001). Durch den von GORK erzeugten Efflux von Kationen wird wiederum ein Nachstrom von Wasser aus der Zelle induziert, welcher zum Schließen der Stoma führt.

1.5 Anionentransport in der Schließzelle: Die S-Typ und R-Typ Kanäle

Wie bereits in den anderen Abschnitten angemerkt wurde, spielen die S- und R-Typ Kanäle bei dem Schließen der Stomata eine essentielle Rolle. Es wurde beobachtet, dass mit dem Stomaschluss ein Ausstrom von Anionen wie Chlorid und Malat aus den Schließzellen einhergeht (Felle, Hanstein et al. 2000). Als Mediatoren dieses Stroms wurden die S- und R-Typ Anionenkanäle identifiziert. S- und R-Typ Kanäle wurden zuerst in *V. faba* beschrieben, wobei der S-Typ durch Schroeder und Hagiwara (1989) und der R-Typ durch Hedrich *et al.* (Keller, Hedrich et al. 1989; Hedrich, Busch et al. 1990) mit der Patch-Clamp Technik erfasst wurden. Später folgten dann auch Beschreibungen des S-Typs in *A. thaliana* durch Pei *et al.* (Pei, Kuchitsu et al. 1997). R-Typ Ströme wurden in Suspensionszellen von Tabak (Zimmermann, Thomine et al. 1994), als auch im Hypocotyl (Thomine, Zimmermann et al. 1995) und den Schließzellen (Pei, Murata et al. 2000; Roelfsema, Levchenko et al. 2004; Levchenko, Konrad et al. 2005) von *A. thaliana* nachgewiesen.

Unter S- und R-Typ Kanälen versteht man Anionenkanäle die sich in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden, aber jeweils einen Ausstrom von Anionen aus den Zellen vermitteln. S-Typ Kanäle besitzen eine langsame Deaktivierungskinetik mit einer Relaxationszeit die im Sekunden- bis Minutenbereich liegt. Des Weiteren zeigen sie nur eine geringe Spannungsabhängigkeit (Roelfsema and Hedrich 2005) und eine Aktivität über einen weiten Spannungsbereich von +60 mV bis -200 mV (MacRobbie 1998; Scherzer 2012). S-Typ Kanäle permeieren Chlorid und Nitrat, aber keine

Dicarboxylate wie z.B. Malat (Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Maierhofer et al. 2011). Durch diese Eigenschaften sind sie geeignet über lange Zeit einen Anionenausstrom zu gewährleisten, was sich wiederum in einer starken Depolarisation der Plasmamembran und der damit verbundenen Aktivierung von auswärtsgerichteten Kaliumkanälen niederschlägt. Der Efflux von Anionen und Kalium führt schließlich zum Stomaschluss. Bei der blaulichtabhängigen Stomaöffnung hingegen werden S-typ Anionenkanäle gehemmt (Marten, Hedrich et al. 2007) um eine Behinderung der Stomaöffnung zu umgehen.

Im Gegensatz zu S-typ Anionenkanälen besitzen R-Typ Kanäle eine schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik mit Relaxationszeiten die im Millisekunden- bis Sekundenbereich liegen (Zimmermann, Thomine et al. 1994; Kolb, Marten et al. 1995; Thomine, Zimmermann et al. 1995). Zudem zeigen Patch-Clamp Untersuchungen eine starke Spannungsabhängigkeit der R-Typ Anionenströme (Hedrich and Marten 1993; Kolb, Marten et al. 1995), was zur Ausbildung einer für diese Kanalart typischen Glockenkurve in Stromspannungsdiagrammen führt (Abbildung 3.1, Abbildung 3.3.3 a) Bei physiologischen Membranspannungen der Schließzellen (-150 mV - -200 mV) sind R-Typ Kanäle geschlossen. Erhöht sich die Membranspannung nimmt die Offenwahrscheinlichkeit zu und die R-Typ Kanäle öffnen sich (Kolb, Marten et al. 1995; Roelfsema and Hedrich 2005) (Ligaba, Dreyer et al. 2013). R-Typ Kanäle können Nitrat, Chlorid, Malat und Sulfat leiten (Hedrich, Marten et al. 1994; Frachisse, Thomine et al. 1999; Ligaba, Dreyer et al. 2013). Ein weiteres typisches Merkmal der R-Typ Kanäle ist ihre Malat-abhängige Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit. Patch-Clamp Arbeiten von Hedrich und Marten aus dem Jahr (1994) an GCAC1 (Guard Cell Anion Channel 1) – einem R-Typ Kanal – verdeutlichen dies sehr gut. In Anwesenheit von Malat im Außenmedium wurde eine Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Membranpotentialen beobachtet. Eine Erhöhung der Malatkonzentration auf 0,4 mM verschob die glockenförmigen Peakströme um 38 mV hin zu negativeren Membranspannungen. Ein weiteres Erhöhen der Malatkonzentration verschob die Peakströme weiter zu noch negativeren Spannungen. Gleichzeitig wurde mit der Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit eine Erhöhung der Peakströme beobachtet. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass durch die Verschiebung des „Gating“-Fensters zu negativeren Spannungen eine höhere elektromotorische Kraft auf den Kanal bzw. Ionen ausgeübt wurde. Dies hatte einen stärkeren Ionenfluss zur Folge. Durch die Malat-induzierte Verschiebung des spannungsabhängigen Öffnens zu negativeren Spannungen, aktivieren die R-Typ Kanäle im physiologischen Spannungsbereich und depolarisieren somit die Schließzellmembran. Gleichzeitig schlossen die Autoren aus ihren Experimenten, dass die Bindungsstelle für die Malatmodulation

extrazellulär vorliegen muss, da eine Erhöhung der intrazellulären Malatkonzentration zu keiner Verschiebung des Gating-Fensters führte. Durch diesen Effekt und durch die Malat-Leitfähigkeit von GCAC1 (R-Typ Kanälen) wird eine Feed-Forward Schleife gebildet, die das Schließen der Stomata unterstützt. Eine Verschiebung der relativen Offenwahrscheinlichkeit wurde auch bei der Applikation von Sulfat (Frachisse, Thomine et al. 1999) und H_2O_2 (Ligaba, Dreyer et al. 2013) beobachtet. So verschob die Applikation von 1 mM H_2O_2 auf Hypocotyl Protoplasten die R-Typ Peakströme um 20 mV zu negativeren Spannungen. Dieser Effekt scheint jedoch von den verwendeten Zelltypen abzuhängen. Experimente mit H_2O_2 in Schließzellprotoplasten hatten keinen Effekt auf die R-Typ Ströme (Pei, Murata et al. 2000). Deshalb wurde spekuliert, dass in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene R-Typ Kanäle exprimiert werden und dass diese unterschiedlich auf Stimuli reagieren. Ein weiteres Beispiel für die Modulation der R-Typ Kanalaktivität durch intrazelluläre bzw. extrazelluläre Effektoren beschrieben Babier-Brygoo und ihre Kollegen in mehreren Veröffentlichungen (Zimmermann, Thomine et al. 1994; Thomine, Zimmermann et al. 1995; Colcombet, Thomine et al. 2001). Patch-Clamp Experimente zeigten, dass in Anwesenheit von Nukleotiden (10 mM MgATP) R-Typ Ströme in *A. thaliana* Hypocotyl Protoplasten aufgezeichnet werden konnten. Das Entfernen der Nukleotide aus der Pipettenlösung (intrazellulär) sorgte für eine starke Veränderung der R-Typ Ströme (Zimmermann, Thomine et al. 1994). Die schnelle Deaktivierung der R-Typ Ströme wurde in Abwesenheit der Nukleotide zunehmend langsamer, von 2 ms hin zu 200 ms. Zudem verloren die Ströme unter diesen Bedingungen ihre Spannungsabhängigkeit und glichen dann eher den spannungsunabhängigen Strömen des S-Typs. Da die Verwendung des Phosphataseinhibitors Okadasäure (Okadaic Acid) für die Rückkehr der R-Typ Ströme sorgte, und der Kinaseinhibitor Staurosporine den gegenteiligen Effekt auf die Ströme hatte, wurde darüber spekuliert, dass der Phosphorylierungszustand für die Aktivität des Kanals verantwortlich ist. Spätere Arbeiten zeigten dann, dass durch die Nukleotidkonzentration im Medium die relativen Offenwahrscheinlichkeiten des Kanals beeinflusst wurden, nicht jedoch die Einzelkanalamplituden (Thomine, Zimmermann et al. 1995). Mit sinkender Nukleotidkonzentration verschob sich die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals hin zu hyperpolarisierten Membranspannungen. Zudem zeigte sich, dass unterschiedliche Nukleotide unterschiedlich starke Effekte besitzen. So verschob intrazelluläres AMP (10 mM) die gemessenen relativen Offenwahrscheinlichkeiten stärker zu negativen Spannungen als dies ATP (10 mM) vermochte (Colcombet, Thomine et al. 2001). In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres Chlorid einen entgegengesetzten Effekt auf die R-Typ Kanäle im Hypocotyl hatte. Mit steigender

Chloridkonzentration verschob sich die Offenwahrscheinlichkeit - und somit das Gating-Fenster - hin zu depolarisierten Spannungen, was dem Nukleotideffekt entgegen wirkte. Die Autoren schlossen aus diesen Arbeiten, dass die Regulation des R-Typ Kanals nicht durch den Phosphorylierungsstatus hervorgerufen wird, sondern durch direkte Interaktion der Nukleotide mit dem Kanal. Es wurde vermutet, dass Nukleotide spannungsabhängig in die Pore des Kanals eindringen und diese blockieren. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache bestätigt, dass sich die Deaktivierungskinetiken durch die Nukleotidkonzentration ändern, nicht jedoch die Aktivierungskinetiken. Zudem zeigten diese Daten, dass die Möglichkeit besteht, R-Typ Kanäle in Kanäle mit S-Typ-ähnlichen Eigenschaften zu überführen. Ähnliche Überlegungen stellten bereits Dietrich und Hedrich (1994) an, wobei sie davon ausgingen, dass S-Typ und R-Typ Ströme von einem einzigen Kanal mit zwei unterschiedlichen Gating-Zuständen hervorgerufen werden. Sehr viel später zeigte sich jedoch, dass S- und R-Typ Ströme nicht denselben genetischen Ursprung haben (Vahisalu, Kollist et al. 2008). Der Verlust des Gens, das für einen putativen S-Typ Kanal kodiert, hatte keine Auswirkung auf die R-Typ Ströme in *Arabidopsis* Schließzellen. Diese Entdeckung spricht stark dafür, dass beide Kanaltypen durch unterschiedliche Gene kodiert werden.

1.5.1 Die molekulare Basis für S-Typ Ströme blieb lange ungewiss

Obwohl S-Typ, wie auch R-Typ Anionenströme lange Zeit bekannt waren und mit der Patch-Clamp-Technik in Protoplasten von verschiedenen Zelltypen charakterisiert wurden, konnten die Gene, die für S-Typ und R-Typ Ströme verantwortlich sind, erst kürzlich aufgeklärt werden. Vahisalu *et al.* isolierten im Jahr (2008) ein Gen aus dem Genom von *A. thaliana*, das für den S-Typ Anionenkanal SLAC1 (Slow Anion Channel associated 1) kodiert. Ein Mutantenscreening zeigte, dass *slac1-1* und *slac1-3* Mutanten einen gestörten Stomaschluss auf äußere Reize wie erhöhte CO₂-Konzentration, verringerte Luftfeuchtigkeit, ABA- und Kalzium-Gabe hatten. GUS-Färbungen als auch GFP-Lokalisationsstudien zeigten, dass SLAC1 vor allem in den Plasmamembranen von Schließzellen lokalisiert ist. Elektrophysiologische Studien an *slac1-1* und *slac1-3* Schließzellprotoplasten ließen die charakteristischen S-Typ Ströme bei diesen Mutanten vermissen, wodurch die fehlende Regulation der Stomata erklärt wurde. Auch Negi *et al.* (2008) haben im gleichem Jahr ähnliche Beobachtungen für das SLAC1 Gen und dessen Fehlen in Verlustmutanten gemacht. Durch Komplementationsversuche mit SLAC1 Homologen wie z.B. SLAH1 und SLAH3 konnten sie die gestörte Stomafunktion der *slac*-Mutanten aufheben. Somit zeigte sich, dass die Expression von SLAH1 und SLAH3 unter dem SLAC1 Promoter, die Funktion von SLAC1 übernehmen können.

S- und R-Typ Kanäle werden durch ABA aktiviert und stellen deshalb wichtige Effektorproteine dar, die den ABA-abhängigen Stomaschluss initiieren (Pei, Kuchitsu et al. 1997; Raschke, Shabahang et al. 2003; Roelfsema, Levchenko et al. 2004). Levchenko *et al.* (2005) demonstrierten zusätzlich, dass die Aktivierung von S-Typ Kanälen auf einem kalziumabhängigen oder kalziumunabhängigen Weg geschehen kann (Abschnitt 1.7.4). Zusammen mit dem Wissen des genetischen Ursprungs von SLAC1 konnten Geiger und Scherzer *et al.* sowie Maierhofer *et al.* sehr schnell die Einbindung von SLAC1 in der ABA-Signalkaskade und die Aktivierung von SLAC1 durch die Kinasen OST1, CPK21 und CPK23 sowie CIPK23 zeigen (Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010; Maierhofer, Diekmann et al. 2014) (siehe auch Abschnitt 1.7.4). Ein ähnliches Verhalten wurde auch für den SLAC1 homologen Anionenkanal SLAH3 gezeigt, der ebenfalls in Schließzellen exprimiert wird. Hierbei erfolgt eine Aktivierung jedoch nicht durch OST1, sondern nur durch die CDPK-Kinasen wie z.B. CPK21. Neben der Aktivierung über Phosphorylierungsereignisse spielt Nitrat eine wichtige Rolle als Modulator für die Kanalaktivität (Geiger, Maierhofer et al. 2011). Auch die CDPKs CPK2 und CPK20 sind in der Lage SLAH3 zu regulieren, wie eine Arbeit aus dem Jahr 2013 in Pollenschläuchen zeigte (Gutermuth, Lassig et al. 2013) (Siehe Abschnitt 1.7.4).

1.5.2 Der genetische Ursprung für R-Typ Ströme war noch ungeklärt

Im Gegensatz zu den S-Typ Kanälen war der genetische Ursprung der R-Typ Kanäle bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht geklärt (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Des Weiteren war nicht bekannt, ob eine Regulation der R-Typ Kanäle durch Kinasen und Phosphatasen stattfindet bzw. in wie weit die Kanäle in den ABA-Signalweg eingebunden sind. Eine Regulation der R-Typ Ströme in Analogie zu den S-Typ Strömen scheint jedoch denkbar. Auf der Suche nach dem R-Typ Anionenkanal in Pflanzen orientierte man sich an Anionenkanälen die aus dem Tierreich bereits bekannt waren.

Als Kandidaten die die R-Typ Ströme in Pflanzen vermitteln könnten wurden die Mitglieder der CLC(Chloride Channel)-Familie vermutet. Die CLC-Familie beinhaltet sowohl H⁺-gekoppelte Anionentransporter als auch Anionenkanäle (Miller 2006; De Angeli, Monachello et al. 2009; Zifarelli and Pusch 2010). Der erste CLC-Kanal wurde im kalifornischen Zitterrochen (*Torpedo californica*) entdeckt (Miller and White 1980). 1990 konnte dieser als CLC-0 bezeichnete Kanal geklont werden (Jentsch, Steinmeyer et al. 1990). CLC-0 wurde als ein Cl⁻-leitender Anionenkanal beschrieben (Lisal and Maduke 2008). Von CLC-0 ausgehend wurden in vielen andern Eu- und Prokaryoten CLC Mitglieder gefunden. So existieren im

menschlichen Genom neun CLCs (Miller 2006). Im Tierreich spielen Anionenkanäle des CLC-Typs eine wichtige Rolle bei dem Ionentransport in der Niere (Bartter-Syndrom) (Jentsch, Neagoe et al. 2005; Jentsch, Poët et al. 2005). Auch Aufrechterhaltung des pH-Milieus in Zellorganellen ist eine Funktion der CLCs (De Angeli, Monachello et al. 2009), Ausfall von CLC-7 führt zu Osteoporose aufgrund eines gestörten pHs in Lysosomen (Jentsch, Neagoe et al. 2005; Jentsch, Poët et al. 2005). Die CLC-Familie ist in *A. thaliana* mit sieben Mitgliedern vertreten (De Angeli, Monachello et al. 2009). Neben einer Nitrat-Leitfähigkeit (Miller 2006; De Angeli, Monachello et al. 2009; Zifarelli and Pusch 2010) zeigen CLCs aus dem Tierreich eine Aktivierung bei Depolarisierung der Membran (Jentsch, Neagoe et al. 2005), welches dem Verhalten der R-Typ Kanäle entspricht. *Arabidopsis* CLC-Mitglieder sind in verschiedenen Endomembranen zu finden. So befindet sich AtClCa in der Vakuolenmembran. AtClCd und AtClCf befinden sich im Golgi-Apparat. AtClCe wiederum ist in der Chloroplastenmembran lokalisiert (Jentsch, Neagoe et al. 2005; De Angeli, Monachello et al. 2009). Da die CLCs nicht in der Zellmembran lokalisiert sind (Barbier-Brygoo, De Angeli et al. 2011; Ligaba, Dreyer et al. 2013), können sie jedoch nicht die R-Typ Ströme vermitteln.

Weitere Kandidaten für die R-Typ Ströme wurden in der Familie der ATP-binding-cassette-Transporter (ABC-Transporter) vermutet. In dieser Familie sind unter anderem die MDR (Multi Drug Resistent)-Transporter und der CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Anionenkanal vorhanden. CFTR spielt in Tieren eine entscheidende Rolle bei transepithelialen Sekretionsprozessen. Die Proteinfaltung, Rekrutierung an die Membran und die Kanalfunktion kann durch Mutationen gestört werden, wovon bisher 700 verschiedene bekannt sind (Foskett 1998). Ein Fehlen der Kanalfunktion führt beim Menschen zum Krankheitsbild zystische Fibrose (Mukoviszidose). Bei dieser Krankheit kann nicht genügend Wasser aus Geweben an die Umgebung abgegeben werden, wodurch z.B. Schleime oder Faeces sehr zäh bzw. fest werden. Zu den bekanntesten Symptomen zählen chronischer Husten, Lungeninfekte, schwere Lungenentzündungen, Lungeninsuffizienz und Sauerstoffmangel. Aber auch schwere Darmverschlüsse, Mangelernährung sowie CF-assoziierte Diabetes sind Symptome. CFTR ist ein durch cAMP regulierter und Membran-lokalisierter Chlorid-Kanal (Foskett 1998; Barbier-Brygoo, Vinauger et al. 2000). Die Kanalaktivität wird durch Kinasen und Phosphatasen gesteuert (Foskett 1998; Mehta 2005). Verwendung von CFTR-spezifischen Blockern auf Pflanzen und Protoplasten von *Vicia faba* zeigten eine Inhibition der S-Typ Ströme und störten die Stomabewegung (Leonhardt, Vavasseur et al. 1999; Barbier-Brygoo, Vinauger et al. 2000). Die Eigenschaften von CFTR ähneln denen der R-Typ Kanäle, zudem lassen die Daten von Leonhardt *et al.* über CFTR-Homologe in Pflanzen spekulieren. So

konnten in *A. thaliana* mehrerer Vertreter der ABC-Transporter gefunden werden, jedoch keine Homologen von CFTR (Sanchez-Fernandez, Davies et al. 2001), wodurch auch dieser Kanal nicht als R-Typ „Ursprung“ in Frage kommt.

Ein weiterer möglicher Kandidat scheint TMEM16A aus der Familie der CaCCs (Calcium activated Chloride Channels) zu sein. TMEM16A wurde ursprünglich aus Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* kloniert (Schroeder, Cheng et al. 2008). Die ersten Beschreibung des Kanals erfolgten bereits in den Achtzigern (Miledi 1982; Barish 1983). TMEM16A ist in *X. laevis* für den schnellen Polyspermieblock verantwortlich. Das Membranpotential in Oozyten liegt bei ca. -40 mV. Bei der Befruchtung durch das Spermium steigt der intrazelluläre Kalziumspiegel, TMEM16A wird aktiviert, wodurch Chloridionen ausströmen. Die so hervorgerufene Depolarisation der Membran verhindert eine Polyspermie (Hartzell, Putzier et al. 2005). TMEM16A aktiviert kalziumabhängig und ist charakterisiert durch transiente Spannungsabhängige (auswärtsgerichtet) Ströme bei Kalziumkonzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ und durch spannungs- und zeitunabhängige Ströme bei Kalziumkonzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ (Hartzell, Putzier et al. 2005; Schroeder, Cheng et al. 2008). Die Aktivierung durch Kalzium kann direkt oder über Ca^{2+} -abhängige Kinasen erfolgen (Hartzell, Putzier et al. 2005). Der Kanal kann durch die Anionenkanalblocker NFL und DIDS geblockt werden (Hartzell, Putzier et al. 2005; Schroeder, Cheng et al. 2008). Dies sind Eigenschaften, die denen der R-Typ Kanäle ähneln. In Pflanzen findet man auch einen TMEM16A homologen Anionenkanal (At1g73020). Eine funktionelle Expression und Charakterisierung der Kanaleigenschaften von TMEM16A ist aber bis heute nicht geglückt (Hedrich 2012) (Dietmar Geiger mündliche Kommunikation).

Neue Erkenntnisse und Überlegungen bringen inzwischen eine andere Proteinfamilie in den Fokus der Forschung, in welchem die Kandidaten für die R-Typ Ströme vermutet werden:

Die ALMTs (Aluminium activated Malate Transporter)

1.6 Die ALMT-Familie

1.6.1 Ursprünglich beschriebene Funktion von ALMTs bei der Al^{3+} -Detoxifizierung

Die ersten Aluminium activated Malate Transporter (ALMT) Proteine wurden in der Wurzelspitze von Pflanzen nachgewiesen und dort charakterisiert. Malat und andere organische Säuren, wie Oxalat und Citrat, werden durch die ALMTs an den Boden abgegeben, um dort

schädliche (Schwer-) Metalle zu binden, die sonst toxisch auf die Pflanze wirken würden (Kollmeier, Dietrich et al. 2001; Pineros and Kochian 2001). Dieser Prozess setzt meist bei einem sauren pH ($< \text{pH } 6$) im Boden ein. Dann werden Aluminiumionen (Al^{3+}) aus dem Boden freigesetzt, welche das Wurzelwachstum hemmen (Yamaguchi and Kasamo 2001). Al^{3+} spielt in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle, da beim Auftreten dieser Ionen im Boden ein Malatefflux aus der Wurzel induziert wird. So zeigen Al^{3+} hypersensitive Maispflanzen gegenüber Al^{3+} -adaptierten Maispflanzen eine geringere Abgabe von organischen Säuren (Kollmeier, Dietrich et al. 2001). Des Weiteren zeigten durch Knock-Out Experimente erstellte Al^{3+} -hypersensitive *A. thaliana* Pflanzen, ein verbessertes Wurzelwachstum in Gegenwart von Al^{3+} , nachdem ZmALMT2 in ihnen überexprimiert wurde (Ligaba, Maron et al. 2012). Aufgrund der elektrischen Eigenschaften dieser Proteine hat die Familie den Namen Aluminium activated Malate Transporter (ALMT) erhalten, obwohl längst nicht all Mitglieder dieser Familie in der Wurzel exprimiert sind und durch Al^{3+} aktiviert werden.

Je nach Zeitpunkt des Malateffluxes wird zwischen zwei verschiedenen Modellen der Malatabgabe unterschieden. In Modell 1 erfolgt ein sofortiger Malatefflux als Antwort auf den Schwermetallstress. Das bedeutet, dass die ALMT-Kanäle bereits in der Membran der Wurzel vorhanden sind und Aluminium entweder direkt als einen aktivierenden Liganden wahrnehmen (ligandengebunden) oder indirekt durch einen Aluminiumrezeptor aktiviert werden. In Modell 2 erfolgt erst nach einiger Verzögerung ein Malatefflux an den Boden. In diesem Modell geht man davon aus, dass die ALMT-Proteine zunächst noch exprimiert und an die Plasmamembran der Wurzel gebracht werden müssen (Yamaguchi and Kasamo 2001). Beispiele für Aluminium-aktivierte ALMTs sind, TaALMT1 aus Weizen (*Triticum aestivum*) (Sasaki, Yamamoto et al. 2004; Pineros, Cancado et al. 2008; Zhang, Ryan et al. 2008), AtALMT1 aus der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (Kobayashi, Hoekenga et al. 2007), HvALMT1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) (Gruber, Ryan et al. 2010), sowie BaALMT1 und BaALMT2 aus Raps (*Brassica napus*) (Ligaba, Katsuhara et al. 2006). Jedoch sind nicht alle ALMT-Transporter Al^{3+} aktiviert. So wird der in der Maiswurzel exprimierte Transporter ZmALMT1 nicht durch Al^{3+} aktiviert (Pineros, Cancado et al. 2008).

1.6.2 ALMT Phylogenie offenbart weitere funktionell andersartige Vertreter

Die ALMT-Familie in *A. thaliana* besteht aus 14 Mitgliedern. Diese werden aufgrund ihrer Homologie in vier verschiedene Kladen (1 - 4) unterteilt (Barbier-Brygoo, De Angeli et al. 2011). Klade 1 enthält die *Arabidopsis* ALMTs ALMT1 und ALMT2, sowie ALMT7 und ALMT8; in Klade 2 befinden sich ALMT3 - 6 sowie ALMT9; Klade 3 umfasst ALMT11 - 14

und in Klade 4 ist ALMT10 eingeordnet (Abbildung 1.6.2.1). Nur von einigen ALMTs sind bisher Funktion und/oder Lokalisation bekannt. AtALMT1 ist z.B. in der Plasmamembran der Wurzelspitze lokalisiert (Hoekenga, Maron et al. 2006; Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Neben AtALMT1 befinden sich auch TaALMT1 sowie BnALMT1 in Klade 1. Wie es scheint, bildet diese Subgruppe der ALMTs die Grundlage für die Detoxifizierung des Bodens (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012; Ligaba, Dreyer et al. 2013). Aber nicht alle ALMT-Kanäle sind in der Wurzel lokalisiert. So sind AtALMT6 und AtALMT9, beides Vertreter der Klade 2, im Tonoplasten lokalisiert (Kovermann, Meyer et al. 2007; Meyer, Scholz-Starke et al. 2011). Die zur Klade 3 gehörenden ALMTs (AtALMT12 – 14) wiederum sind unter anderem in der Plasmamembran der Schließzellen lokalisiert (Meyer, Mumm et al. 2010; Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Dort sind sie jedoch nicht ausschließlich anzutreffen. AtALMT12 z.B. ist auch in der Membran von Pollenschläuchen lokalisiert (Gutermuth, Lassig et al. 2013). Aus der Klade 4 konnte bisher noch kein einziger ALMT funktionell beschrieben werden. Dreyer und Kollegen (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012) wiesen durch Homologievergleiche, neben den bereits zuvor erwähnten ALMTs, auch in 32 anderen Pflanzenspezies ALMTs nach.

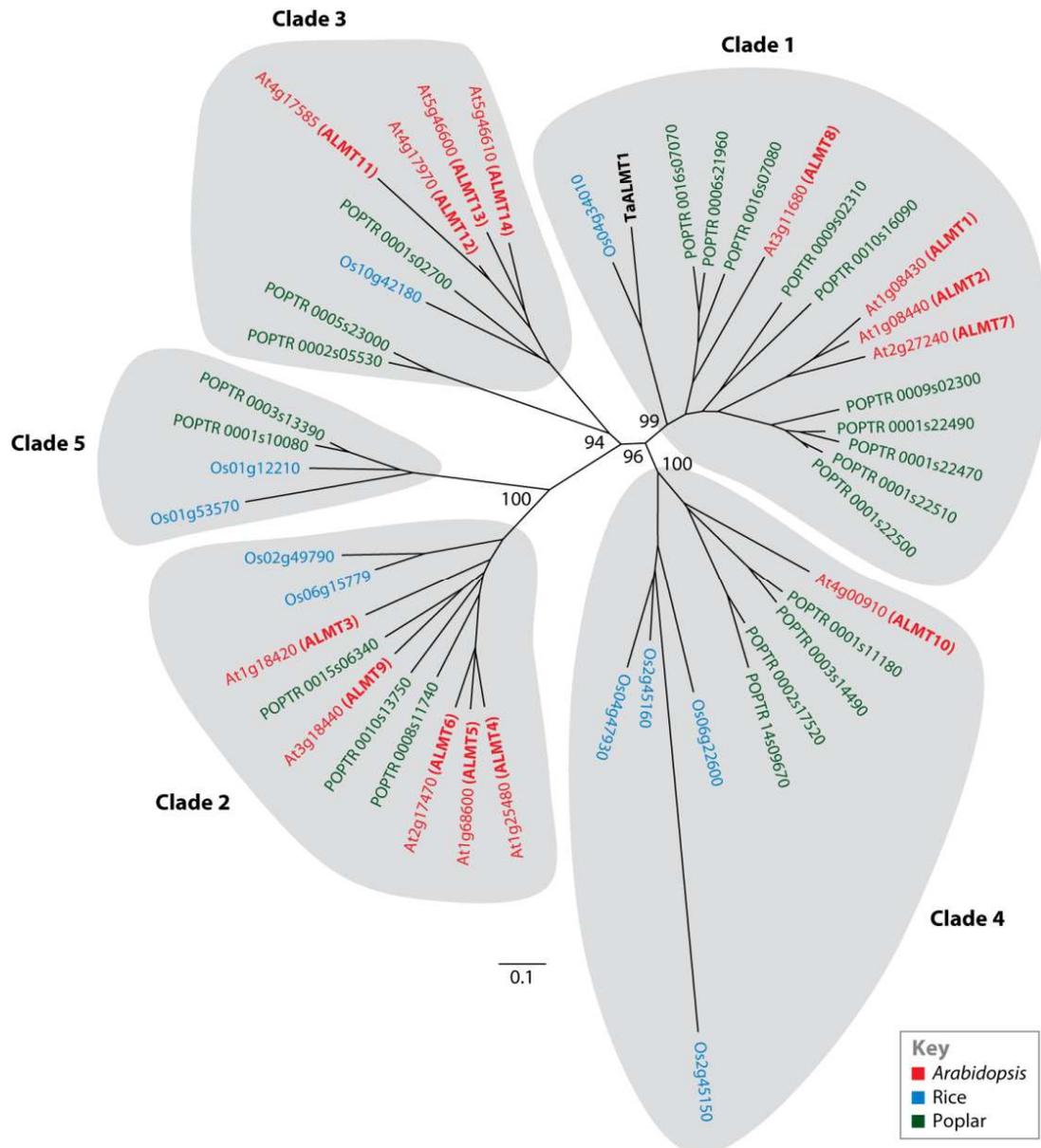


Abbildung 1.6.2.1: Dendrogramm der ALMT-Proteine aus verschiedenen Pflanzen. ALMTs aus *Arabidopsis* sind in rot, ALMTs aus Reis in blau und ALMTs aus der Pappel in grün dargestellt. TaALMT1 ist in schwarz abgebildet und stammt aus Weizen. Abbildung wurde aus (Barbier-Brygoo, De Angeli et al. 2011), Annual Reviews, entnommen.

Diese ließen sich nur zum Teil in die erwähnten Kladen einteilen, wodurch das Modell um einige Kladen erweitert wurde. Wie sich zeigte beruht die Diversität der ALMT-Familie auf der sukzessiven Genduplikationen eines einzigen Ursprungsgens. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der ALMTs in verschiedenen Pflanzengewebe und der Vielzahl von nicht charakterisierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie ist nicht auszuschließen, dass sich der R-Typ Kanal unter ihnen befindet. Eine ähnliche funktionelle Heterogenität wurde zuletzt auch in

der NRT/PTR/NPF-Transporterfamilie gefunden (Nour-Eldin, Andersen et al. 2012; Leran, Varala et al. 2014).

1.6.3 Organische Säuren des Citratzyklus sind bevorzugte Transportionen der ALMTs

Das vereinende Merkmal der ALMTs ist ihre Fähigkeit organisch Säuren (Abbildung 1.6.3.1), insbesondere Malat, zu transportieren. Dies ist eine Eigenschaft die auch R-Typ Kanäle zeigen. Sämtliche Arbeiten mit ALMTs berichten über dieses Verhalten und wurden unter anderem mit Patch-Clamp, TEVC sowie Aufnahme- und Abgabexperimenten nachgewiesen. Es ergab sich, dass Malat das bevorzugte permeierte Ion ist, dass aber auch weitere Anionen wie Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} transportiert werden (Meyer, Mumm et al. 2010; Ligaba, Maron et al. 2012; De Angeli, Zhang et al. 2013). Andere organische Säuren übersteigen zum Teil sogar die Leitfähigkeit für Malat. So zeigt die Verwendung der strukturell ähnliche Fumarsäure (Abbildung 1.6.3.1) um 50% erhöhte Ströme in AtALMT6 exprimierenden Mesophyll-Vakuolen (Meyer, Scholz-Starke et al. 2011). Citrat hingegen hatte in der selben Arbeit 80% kleinere Ströme als Malat, und besaß somit gleich große Ströme wie etwa Chlorid (Meyer, Scholz-Starke et al. 2011). Citrat besitzt ebenfalls eine strukturelle Ähnlichkeit mit Malat. Trotzdem zeigen Arbeiten, dass diese organische Säure nicht von allen Mitgliedern der ALMT-Familie transportiert wird. BnALMT1 und BnALMT2 z.B. sind nicht in der Lage Citrat zu transportieren (Ligaba, Katsuhara et al. 2006). Im Fall von AtALMT9 wird der der Kanal sogar durch Citrat blockiert, zeigt aber eine gute Leitfähigkeit für Chlorid (De Angeli, Zhang et al. 2013; Zhang, Baetz et al. 2013). ZmALMT1 wiederum besitzt für Malat und Citrat als auch für Chlorid eine gute Leitfähigkeit (Pineros, Cancado et al. 2008) wie TEVC-Experimente in Oozyten zeigen.

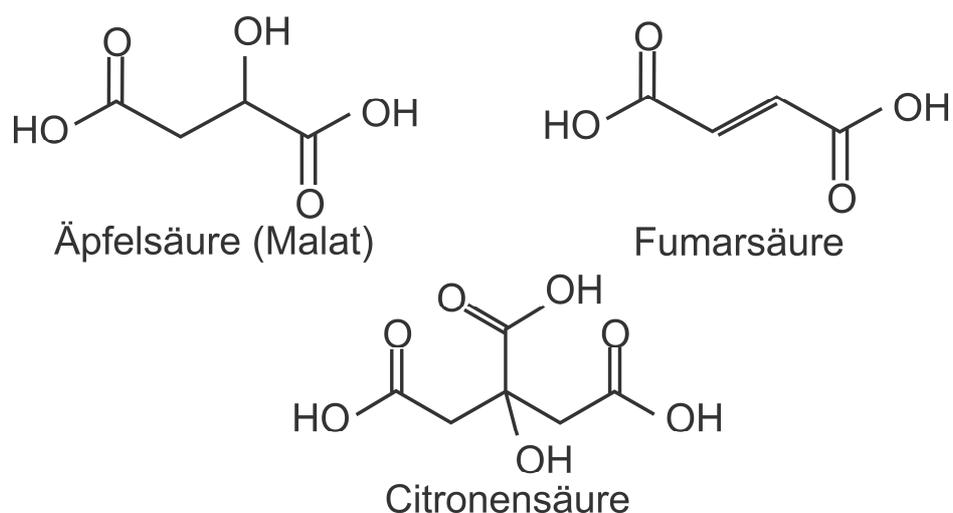


Abbildung 1.6.3.1: Struktur organischer Säuren die mit dem Transportverhalten der ALMT-Familie assoziiert sind.

1.6.4 Mutagenesestudien liefern erste Hinweise auf die Porenregion der ALMTs

Es existieren nur wenige Informationen dazu, wo die Porenregion der ALMTs im Protein lokalisiert ist. Zum Ende dieser Arbeit konnten Zhang *et al.* (2013) zur Aufklärung dieses Sachverhaltes beitragen. Zhang *et al.* fokussierten sich dabei auf den N-terminalen- und Transmembranbereich von ALMT9. Die Autoren konnten zeigen, dass Citrat die Kanalströme inhibiert. Dies wird durch einen Block von Citrat an der ALMT9 Porenregion erreicht, wie durch elektrophysiologische „Kick Out“ Experimente gezeigt wurde. Die Idee bei diesem Experiment wurde von Becker *et al.* (Becker, Dreyer et al. 1996) übernommen und soll kurz beschrieben werden. Citrat wird bei negativen Membranspannungen angezogen und verstopft so die Porenregion. Die Ströme sinken. Nun wird ein positiver Spannungspuls gegeben, mit sofortiger Rückkehr zu einer negativen Haltespannung. Dabei ist der Spannungspuls so kurz, dass die Offenwahrscheinlichkeit und Konfiguration des Kanals nicht beeinflusst wird. Hierdurch wird Citrat aus der Porenregion „rausgekickt“, und man kann eine instantane Zunahme der Ströme beobachten, bevor Citrat die Pore wieder blockiert. Dieses Bild zeigt sich auch in den Experimenten der Arbeit von Zhang. Mit diesem Porenblocker für ALMT9 untersuchten Zhang *et al.* verschiedenste Punktmutanten des N-terminalen- und Transmembranbereich, welche Mutationen für konservierte Bereiche innerhalb der ALMT-Familie aufwiesen. So konnte in den Punktmutationen K93E und E130K keine Ströme mehr beobachtet werden. Diese Mutationen liegen in der ersten und zweiten Transmembrane des Kanals. Beide Mutationen vertauschten die vorherige positive/negative Ladung gegen ihre entsprechende Gegenladung. Wenn nun jedoch beide Punktmutationen gleichzeitig eingeführt wurden, zeigten sich normale Ströme. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich bei den beiden Aminosäuren um ein korrespondierendes Aminosäurepaar handelt, die durch Ausbildung einer Salzbrücke zur Stabilisation von ALMT9 beitragen. Weitere erstellte Punktmutanten innerhalb der Transmembranen waren ebenfalls nicht funktionell. Punktmutanten die sich hingegen in den Transmembranlinkern befanden waren funktionell und zeigten Kinetiken die dem ALMT9-WT ähnelten. Untersuchungen dieser Punktmutanten mit Citrat im Medium, zeigten das die Mutante K193E keine Verminderung der Ströme durch den Citrat-Block zeigte. „Kick Out“ Experimente mit K193A und Citrat hatten zudem keine transiente Erhöhung der Ströme nach dem „Kick Out Puls“. Die Autoren zeigten somit das Citrat wegen der Mutation K193E nicht mehr an die Porenregion binden kann, und das die Aminosäure *Lys*-193 an der Bildung der Pore beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch die ein Jahr später erstellte Arbeit von Zhang, Martinoia *et al.* (2014) bestärkt. Wie dort gezeigt wurde, verhält sich ATP wie ein Spannungsabhängiger Porenblocker auf ALMT9. Dieser Effekt konnte aber ebenfalls nicht in

der K193E Mutante observiert werden. Zudem zeigt die Arbeit von Ligaba *et al.* (Ligaba, Dreyer et al. 2013), dass das Entfernen des C-Terminus nicht die Leitfähigkeit von TaALMT1 unterbindet. Dieses Ergebnis verdeutlicht weiterhin, dass sich die Porenregion im N-terminalen Bereich der ALMTs befinden muss.

1.6.5 Die Topologie der ALMTs wird kontrovers diskutiert

Ein kontrovers diskutierter Punkt stellt die Topologie der ALMTs dar. Auf Hydrophathie-beruhende Algorithmen sagten 6 - 7 potentielle Transmembranen für die Mitglieder der ALMT-Familie vorher (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>). Die ersten sechs Transmembranen (TM) befinden sich im ersten Drittel des Proteins, wohingegen die siebte Transmembrane weit abgeschlagen am C-Terminus vorhergesagt wird. Die siebte TM besitzt eine weit geringere Vorhersagewahrscheinlichkeit als die anderen sechs TMs. Daraus ergibt sich, dass die Lokalisation des N- und C-Terminus nicht eindeutig zu treffen ist. Die Termini werden je nach TM-Vorhersagetool entweder intra- oder extrazellulär vermutet. Die wenigen Studien, die sich mit der Topologie von ALMTs beschäftigten, gehen von diesen Vorhersagen aus, kommen jedoch auch nicht zu eindeutigen Ergebnissen.

Motoda *et al.* (2007) benutzten His-Antikörper sowie spezifische Peptid-Antikörper, um die Topologie von TaALMT1 aufzuklären. Hierzu führten sie jeweils mehrere Histidine kurz vor oder nach den vorhergesagten TMs sowie im C- und N-Terminus von TaALMT1 ein. Zugleich wurden Peptid-Antikörper für unveränderte Transmembranlinkerdomänen erstellt. Anschließend exprimierten Motoda *et al.* die unterschiedlich modifizierten TaALMT1-Proteine in den Zelllinien 293T und 10T1/2. Zu den unterschiedlichen modifizierten TaALMT1-Proteinen wurden dann anti-His-Antikörper extrazellulär hinzugegeben, welche an den eingeführten His-Positionen binden konnten. Die His-Antikörper wiederum wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Wenn die His-Antikörper banden und detektiert wurden, musste sich der veränderte Proteinbereich extrazellulär befinden. Wenn kein Signal vorhanden war, musste der Bereich intrazellulär sein und ein binden der His-Antikörper wurde durch die Zellmembran verhindert. Um dies zu überprüfen wurde TritonX zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenz beobachtet. TritonX ist ein Detergenz und macht die Zellmembran für die Antikörper permeabel. Wenn nun eine Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet wurde, konnte eine intrazelluläre Lokalisation der histidinreichen Region vermutet werden. Dieses Vorgehen wurde für C- und N-Terminus sowie alle Transmembranlinker durchgeführt und auch mit den Peptid-Antikörpern wiederholt. Aus den gewonnenen Daten schlossen Motoda *et al.*, dass

C- und N-Terminus extrazellulär lokalisiert sind, sowie das TM1 nicht in der Plasmamembran liegt (Abbildung 4.7.1 a).

Die Arbeitsgruppe von Dreyer hat weiterhin zur Aufklärung der Topologie der ALMTs beigetragen (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Die Gruppe wählte einen Bioinformatischen Ansatz und führte umfassende Sequenzvergleiche unter den ALMTs durch. Dabei wurden über 400 verschiedenen ALMT-Proteinsequenzen aus 32 Pflanzenarten verglichen. Hierdurch wurden unterschiedliche konservierte Domänen in den ALMTs entdeckt. Eine sehr stark konservierte Domäne in den ALMTs stellt das WEP-Motiv dar. Dieses aus den drei Aminosäuren Trp-Glu-Pro bestehende Triplet, scheint eine wichtige Rolle in der Aktivierung durch Aluminiumionen zu spielen (siehe Abschnitt 1.6.7). Weiterhin konnte die Gruppe um Dreyer zeigen, dass der N-Terminus der ALMTs die größte Variabilität aufweist (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Zudem wurden neben den sechs bereits bekannten Transmembranen der ALMTs noch zwei weitere hydrophobe Bereiche im C-Terminus von ALMTs gefunden die als potentielle TMs fungieren (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Die Autoren schlagen deswegen ein modifiziertes Modell von Motoda (2007) vor, mit acht Transmembranen und einem C-Terminus der intra- und extrazelluläre Bereiche besitzt und nicht komplett extrazellulär lokalisiert ist (Abbildung 4.7.1 c).

1.6.6 Bestehen funktionelle ALMTs aus einer oder mehreren Untereinheiten?

Für viele Kanäle zeigte sich, dass sie aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind. So ist für die Mitglieder der Shaker-Familie bekannt, dass vier Untereinheiten einen Kanal bilden. Diese Frage ist auch für die ALMT-Familie interessant um ihre Funktion besser zu verstehen. Zhang *et al.* (2013) zeigten, dass Citrat ein „open channel Blocker“ für ALMT9 ist. Die Autoren nutzten diese Eigenschaft um Informationen darüber zu erhalten ob ALMTs Monomere oder Multimere bilden. Für diesen Zweck exprimierten sie ALMT9-WT und die Citrat-insensitive Mutante K193E in Tabakvakuolen im Verhältnis 1:1 und 1:4 und untersuchten die auftretenden Ströme in Anwesenheit von Citrat. Wenn nun ALMT9 Monomere bildet, sollte sich die Dissoziationskonstante (KD) von Citrat unter diesen Bedingungen nicht ändern. Wenn das Protein jedoch Multimere aus ALMT9 WT und der Mutante K193A bilden sollten, sollte sich der KD-Wert verändern. Bei beiden Mischverhältnissen konnte eine Inhibierung der Ströme durch Citrat gezeigt werden, welche jedoch nicht so stark war wie die Inhibierung des reinen WT. Wie sich zudem zeigte, veränderte sich der aus den Strömen ermittelte KD-Wert bei beiden Verhältnissen. Im Vergleich zum WT-KD waren die KD-Werte der Verhältnisse 1:1 bzw. 1:4 um das 1,3-fache bzw. 2,1-fache höher. Dieser Hinweis auf Multimere wurde durch

reduzierende bzw. nicht reduzierende Poly-Acryl-Gelelektrophorese untermauert. Dazu wurden mikrosomale Proteinextrakte von ALMT9::GFP exprimierenden Tabakblättern verwendet, und ALMT9::GFP mit GFP-Antikörpern nachgewiesen. Unter reduzierenden Bedingungen konnten nur Fragmente nachgewiesen werden, die dem 1-fachen Molekulargewicht von ALMT9::GFP entsprachen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen hingegen konnte man Fragmente nachweisen, die dem 2- und 4-fachen Molekulargewicht von ALMT9::GFP entsprachen. Somit konnte gezeigt werden, dass ALMT9 Di- und Tetramere bildet.

1.6.7 ALMTs werden auf posttranslationaler Ebene reguliert

Welche Mechanismen für die Aktivierung und Deaktivierung der ALMT-Transportproteine verantwortlich sind war zu Beginn dieser Dissertation weitgehend unbekannt. Ein Punkt, der jedoch bei den ALMTs auffällt, ist, dass nicht sämtliche Mitglieder der Familie durch Al^{3+} -Ionen aktiviert werden. Einige Vertreter der Familie zeigen auch ohne die Anwesenheit von Al^{3+} bereits eine Grundaktivität, wie für TaALMT1 (Pineros, Cancado et al. 2008) oder AtALMT1 (Hoekenga, Maron et al. 2006) beschrieben wurde. Bei beiden Transportproteinen erhöht Aluminium die Aktivität stark, ist aber nicht für „An und Ausschalten“ der Proteinaktivität verantwortlich. ZmALMT1 wird zudem nicht durch die Gabe von Al^{3+} -Ionen beeinflusst, und zeigt eine hohe basale Leitfähigkeit (Pineros, Cancado et al. 2008). Es gibt wenige Hinweise darauf, ob diese Aktivierung direkt an den Transportern oder über Al^{3+} -Rezeptoren und darauf aufbauenden Signalketten erfolgt. Die Arbeit von Pineros und Kollegen (Pineros, Cancado et al. 2008) lässt jedoch ligandengebundene Aktivierung vermuten, wie durch eine direkte Aktivierung von TaALMT1 mit Aluminium in *Xenopus* Oozyten gezeigt wurde. Hierbei scheint das konservierte WEP-Motiv der ALMTs eine Rolle bei der Aluminiumaktivierung zu spielen (Furuichi, Sasaki et al. 2010). So zeigte die Arbeit von Furuichi *et al.* (Furuichi, Sasaki et al. 2010) als auch von Ligaba *et al.* (Ligaba, Dreyer et al. 2013), dass die E284Q Punktmutation in diesem Motiv zu keiner Erhöhung der Ströme durch Al^{3+} mehr führte. Ligaba *et al.* (Ligaba, Dreyer et al. 2013) zeigen in ihrer Arbeit jedoch, dass dieser Effekt durch eine Störung der strukturellen Integrität des Proteins an sich hervorgerufen wird. Auch Mutationen in anderen hoch konservierten Bereichen von TaALMT1 führten zu einer vergleichbar verminderten Al^{3+} -Aktivierung (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Die Autoren konnten zudem in ihrer Arbeit ein Motiv im N-Terminus von TaALMT1 bestimmen, welches nur bei den ALMTs der Klade 1 vorkommt. Die bekannten und charakterisierten Mitglieder dieser Klade zeigen alle ein Al^{3+} -sensitives Verhalten (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Somit scheint die Al^{3+} -Wahrnehmung im N-Terminus stattzufinden. Die Autoren weisen aber

ausdrücklich darauf hin, dass eine strukturelle Integrität der ALMTs von entscheidender Rolle für ihre Funktion und Regulation ist.

Des Weiteren kann auch Kalzium für die Aktivierung von ALMTs eine Rolle spielen, wie für ALMT6 gezeigt wurde (Meyer, Scholz-Starke et al. 2011). In Patch-Clamp Versuchen hatten isolierte Vakuolen aus ALMT6 überexprimierenden *A. thaliana* Pflanzen in Anwesenheit von $100 \mu\text{m Ca}^{2+}$ eine erhöhte Stromaktivität. Eine ligandengebundene Aktivierung durch Ca^{2+} -Ionen oder eine Second-Messenger Funktion von Kalzium konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden.

Auch die Regulation der ALMTs durch Kinasen liegt im Bereich des Möglichen. Im Jahr (2009) suchten Ligaba und Kollegen unter Berücksichtigung des Phosphorylierungsmotives der Protein Kinase C nach möglichen Phosphorylierungspositionen in TaALMT1. Bei Erstellen von Punktmutationen an den sechs möglichen Phosphorylierungspositionen zeigte die Punktmutation S384A einen besonders starken Effekt auf den Kanal. S384A führte in TaALMT1 zu einer starken Abnahme der beobachteten Ströme in TEVC Messungen. Die Autoren argumentierten, und zeigten mit Hilfe von Kinaseinhibitoren, wie Staurosporine, dass durch die Mutation eine Phosphorylierung am Kanal nicht mehr zustande kommen konnte, und somit keine Aktivierung des Kanals mehr stattfand. Zusammen mit den Daten von Meyer *et al.* (2011) könnte eine Regulation der ALMTs durch CDPKs und CIPKs denkbar sein.

Wie erst kürzlich für AtALMT9 demonstriert wurde haben auch organische Säuren wie Malat und Fumarat als auch Nukleotide einen regulierenden Effekt auf die ALMT- Familie. Dies ist ein den R-Typ Kanälen ähnliches Verhalten. AtALMT9 ist im Tonoplasten lokalisiert und vermittelt dort die Aufnahme von Malat als auch Chlorid in die Vakuole (Kovermann, Meyer et al. 2007; De Angeli, Zhang et al. 2013). Das Transportverhalten von AtALMT9 wird dabei von Malat und anderen organischen Dicarbonsäuren beeinflusst. AtALMT9 wurde in *Nicotiana benthamiana* Protoplasten überexprimiert. Patch-Clamp Einzelkanalmessungen an selbigen zeigten, dass unter anderem zytosolisches Malat die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals moduliert (De Angeli, Zhang et al. 2013).

Für Nukleotide konnte ein inhibierender Effekt auf AtALMT9 gezeigt werden (Zhang, Martinoia et al. 2014). AtALMT9 besitzt ein den Einwärtsgleichrichtern ähnliches Verhalten (De Angeli, Zhang et al. 2013; Zhang, Martinoia et al. 2014). Die Gegenwart von ATP im Zytosol verringerte die Einwärtsströme von ALMT9 bei negativen Spannungen. Die beobachtete Abnahme der Ströme war spannungsabhängig, und nahm mit negativen

Membranspannungen zu. Dies überführte die ALMT9-typischen einwärtsgerichteten Ströme zu einer dem R-Typ ähnlichen Glockenform. Zudem war der Effekt der Inhibition auch von der Art des verwendeten Nukleotids abhängig, wobei die Inhibition mit Abnahmen der Phosphatgruppen abnahm (Block I_{ALMT9} : ATP>ADP>AMP). Die Art des verwendeten Nukleotides scheint dabei zweitrangig zu sein, da GTP ähnliche Daten lieferte wie ATP. Mit steigender Malatkonzentration im Zytosol wurde die Inhibition der Ströme abgemildert und erfolgte nicht mehr vollständig. Beim Austausch von Malat zu Chlorid als Hauption war der inhibitorische Effekt von ATP vergleichbar. Jedoch kam es dabei nicht zur Ausbildung der Glockenform. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die ATP-Inhibition durch einen spannungsabhängigen Block der Kanalpore zustande kommt, und dass die Abschwächung des Blocks durch Malat auf einen konkurrierenden Effekt beruht, der beim Eintritt in die Kanalpore erfolgt.

Die genannten Beispiele machen deutlich, dass die ALMTs neben ihrer „ursprünglichen“ Funktion der Detoxifizierung des Bodens, weitere wichtige Rollen in Pflanzen übernehmen. So sind sie auch am Transport von anorganischen Anionen (Cl^- , NO_3^{2-} , SO_4^{2-}) und somit der Anionenhomöostase, Tugorregulation, sowie der Malatverteilung in der Pflanze beteiligt (Pineros, Cancado et al. 2008; De Angeli, Zhang et al. 2013).

1.7 Regulation des Stomaschlusses

Hohe CO_2 -Konzentrationen im Intrazellularraum des Blattes, der Wechsel von Licht zu Dunkelheit sowie Trockenstress führen bei höheren Pflanzen zum Stomaschluss (MacRobbie 1998; Kim, Bohmer et al. 2010). Schon früh wurde klar, dass mit dem Stomaschluss eine Depolarisierung des Membranpotentials einhergeht, welche durch die Aktivierung von Anionenkanälen (R- + S-Typ / Abschnitt 1.5) hervorgerufen wird. Durch die Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige K^+ -Kanäle, durch die Kalium aus dem Zytosol in den Apoplasten strömt. Durch die Abgabe von Anionen und Kalium, erfolgt ein passiver Nachstrom von Wasser und die Stomata schließen. Diese Vorgänge in der Schließzelle erfordern spezifische Rezeptoren und Signalkaskaden, die die entsprechenden Transportmodule aktivieren (z.B. Anionenkanäle) bzw. inhibieren (z.B. H^+ -ATPasen und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle). Mutantenscreens und k.o.-Pflanzen erbrachten die ersten zwingenden Hinweise, dass bei der Signaltransduktion ein Phosphorylierungsnetzwerk aus Phosphatasen (Abschnitt 1.7.3) und Kinasen (Abschnitt 1.7.4) eine entscheidende Rolle spielen. Für einen zusammenfassenden Überblick über den Stomaschluss siehe Abbildung 1.8.1.

1.7.1 Das Stresshormon ABA lässt Stomata bei Trockenheit schließen

Der ABA-vermittelte Stomaschluss ist bisher am besten untersucht (Abbildung 1.8.1). ABA (Abscisinsäure) ist ein aus 15 C-Atomen bestehendes Terpenoid (Finkelstein 2013). Bereits in den 90er Jahren war bei Gabe von ABA auf Blätter ein Schluss der Stomata zu beobachten (Willmer and Fricker 1996; MacRobbie 1998; Merlot, Mustilli et al. 2002). Ein Anstieg in der ABA-Konzentration in Blättern ist festzustellen, wenn eine Pflanze Kälte-, Salz- und vor allem Trockenstress ausgesetzt ist (Willmer and Fricker 1996). Aus diesem Grund wird ABA auch als Trockenstresshormon bezeichnet. Dieser Anstieg von ABA hat verschiedene Auswirkungen. So wurde in *V. faba* gezeigt, dass ABA die H⁺-ATPasen um 60–65% hemmt (Zhang, Wang et al. 2004). Zudem bewirkt ABA auch eine Hemmung der einwärtsgerichteten K⁺-Kanäle. Die ABA-gesteuerte Kinase OST1 phosphoryliert den Kanal KAT1, was zu einer Reduzierung der KAT1-Ströme führt (Sato, Sato et al. 2009). Ebenso ist in Anwesenheit von ABA die Endozytose von Kanalproteinen (KAT1) zu beobachten (Sutter, Sieben et al. 2007). Im Gegensatz zu den K⁺-Influxkanälen, werden auswärtsgerichteten K⁺-Kanäle durch ABA aktiviert (Blatt 1990; Blatt and Armstrong 1993; MacRobbie 1998). Die Gesamtheit dieser ABA-induzierten Mechanismen tragen dazu bei, die Depolarisierung der Membran einzuleiten (Abbildung 1.8.1). Bemerkenswerterweise sind die beschriebenen Mechanismen spezifisch für Schließzellen. Andere Zellen/Gewebe, wie z.B. Mesophyllzellen, die Wurzel oder der Samen reagieren auf ABA mit anderen physiologischen Reaktionen (vergleiche z.B. (Finkelstein, Reeves et al. 2008) (Sharp and LeNoble 2002)). Das gleiche Phytohormon ist also an unterschiedlichen Prozessen beteiligt, was komplexe und oft Zelltyp-spezifische Signalkaskaden erfordert (Cutler, Rodriguez et al. 2010).

Zur Perzeption des Trockenstresses und der Synthese von ABA existieren unterschiedliche Hypothesen. ABA kann in der Pflanzenwurzel nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass die Pflanze den Trockenstress zunächst über die Wurzel wahrnimmt, und dort ABA synthetisiert. Anschließend wird es dann über die Leitbündel (Xylem) an die Blätter und die dortigen Schließzellen weitergeleitet, in denen es dann die Reaktionen des ABA-Signalweges auslöst (Sauter, Davies et al. 2001). Besonders bei größeren Pflanzen scheint dieses Modell unwahrscheinlich zu sein, da aufgrund der relativ langsamen Transportgeschwindigkeit in den Xylemgefäßen das Phytohormon mit einer sehr starken Verzögerung die Blätter bzw. Schließzellen erreichen würde. Es wird deshalb spekuliert, dass das ABA-Signal in ein elektrisches oder hydraulisches Signal umgewandelt wird und so schnell die Schließzellen erreicht (Christmann, Weiler et al. 2007). In den Leitbündeln der Blätter wird wiederum das

Langstreckensignal in ein chemisches Signal (ABA) umgewandelt und entfaltet dort seine Wirkung (Endo, Sawada et al. 2008).

Zum Transport von ABA zwischen den Zellen existieren ebenfalls unterschiedliche Modelle. Das erste Modell geht davon aus, dass protoniertes ungeladenes ABA durch Diffusion aus dem Apoplasten über die Membran in die Zelle gelangt (Sauter, Davies et al. 2001). Da der pH-Wert im Apoplasten sauer und im Zytosol der Zellen neutral ist (Apoplast pH 5 - 6 / Zytosol pH 7,2; (Smith and Raven 1979; Savchenko, Wiese et al. 2000)), wird die deprotonierte Form des ABA im Zytosol gefangen (Ionenfallenmodell). Der Transport von ABA aus den Produktionsgeweben (Symplast) und somit die Abgabe an die Leitbündel bzw. den Apoplasten ist dabei nicht gewährleistet. Analog zum Transport von Auxin (Peer, Blakeslee et al. 2011; Viaene, Landberg et al. 2014) wurde deswegen über Transporter spekuliert, die aktiv ABA aus dem Symplasten in den Apoplasten transportieren. Schließlich konnte im Jahr 2010 an einer ABA-insensitiven *Arabidopsis* Mutante der ABC-Transporter AtABCG25 nachgewiesen werden. Durch GUS-Färbung wurde die Expression von AtABCG25 in den Leitbündeln der Blätter veranschaulicht. Des Weiteren wurde die Aufnahme von ABA in AtABCG25 exprimierenden Sf9-Zellen gezeigt (Kuromori and Shinozaki 2010). Weitere Daten aus dem Jahr 2010 legen nahe, dass in Schließzellen von *Arabidopsis* ebenfalls ein Importer (AtABCG40) für ABA existiert (Kang, Hwang et al. 2010; Umezawa, Nakashima et al. 2010).

1.7.2 Zytosolische ABA-Rezeptoren perzeptieren das Phytohormon

Wie das ABA-Signal durch die Schließzellen wahrgenommen wird war lange unklar. Mehrere putative ABA-Rezeptoren waren im Gespräch, die ABA in Schließzellen detektieren könnten (Shen, Wang et al. 2006; Liu, Yue et al. 2007). Leider zeigte sich, dass keiner der putativen ABA-Rezeptoren tatsächlich für die Wahrnehmung von ABA verantwortlich ist (Gao, Zeng et al. 2007; Muller and Hansson 2009; Risk, Day et al. 2009). Schließlich wurden im Jahr 2009 zytosolische Proteine der PYR/PYL/RCAR-Familie (Pyrabactin Resistance / PYR1 Like / Regulatory Component of ABA Receptor) (Abbildung 1.8.1) identifiziert, die tatsächlich in der Lage sind das Phytohormon im physiologischen Konzentrationsbereich zu perzeptieren (Ma, Szostkiewicz et al. 2009; Park, Fung et al. 2009). Interessanterweise förderte die Bindung von ABA an PYR/PYL/RCAR die Interaktion der Rezeptoren mit den PP2C Phosphatasen HAB (Homology to ABI1), ABI1 (ABA-insensitive 1) und ABI2 (ABA-insensitive 2) (Nishimura, Hitomi et al. 2009; Park, Fung et al. 2009). Diese physikalische Interaktion sorgte zudem für die Inhibierung der Phosphataseaktivität der PP2C Phosphatasen. Knock-Out Mutanten von PYR/PYL/RCAR zeigten jedoch keinen ABA-insensitiven Phänotyp (geänderte Keimung,

gestörter Stomaschluss). Da die RCAR-Familie in *Arabidopsis* aber 14 Mitglieder umfasst, spricht dies für eine starke Redundanz unter diesen Proteinen. Diese Annahme wurde durch die Charakterisierung der Quadrupelmutante *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* untermauert, da sich hier typische Reaktionen auf eine Störung des ABA-Signalkaskade zeigten (Park, Fung et al. 2009).

1.7.3 Die Rolle von PP2C-Phosphatasen (ABI1/ABI2) in der ABA-Signalkaskade

In der Regulation der ABA-Signalkaskade spielen Phosphatasen eine bedeutende Rolle. Die Phosphatasen werden nach der interagierenden Aminosäure in ihrem Zielmolekül in Serin/Threonin-Phosphatasen, Tyrosin-Phosphatasen oder Phosphatasen mit doppelter Substratspezifität eingeteilt. Die Serin/Threonin Phosphatasen werden aufgrund ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften nochmals in die Klassen der PP1, PP2A, PP2B, und PP2C (Protein Phosphatase 1, 2A, 2B, 2C) unterteilt (Luan 2003).

In Anwesenheit von ABA interagieren die RCAR/PYR/PYL ABA-Rezeptoren mit Mitgliedern der PP2C-Phosphatasen Familie, und bilden sogenannte Co-Rezeptoren (Santiago, Dupeux et al. 2009). Bereits im Jahr 1984 konnten in *A. thaliana* Mutanten isoliert werden, welche insensitive gegenüber ABA waren (*abi-1*, *abi-2*, *abi-3*; (ABA insensitive 1-3)) (Koorneef, Reuling et al. 1984). Wie sich später herausstellte, handelte es sich bei diesen Mutanten um die beiden hoch homologen PP2C ABI1 und ABI2. Eine Punktmutation von Glycin zu Aspartat in ABI1 (G180D) und in ABI2 (G168D) führte zu dem Phänotyp der Mutanten *abi1-1* und *abi2-1*. Dieser Phänotyp ist durch einen erhöhten Wasserverlust, verfrühte Keimung als auch durch ein verändertes Wurzelwachstum charakterisiert (Leung, Bouvierdurand et al. 1994; Meyer, Leube et al. 1994; Leung, Merlot et al. 1997; Rodriguez, Benning et al. 1998). Diese ABA-Insensitivität in verschiedensten physiologischen Prozessen und der Entwicklung zeigte die wichtige Rolle von ABI1/ABI2 als negative Regulatoren im ABA-Signalweg. Neben ABI1 und ABI2 sind auch die Phosphatasen HAB1 und HAB2 an der Regulation des ABA-Signalweges beteiligt (Saez, Apostolova et al. 2004; Rubio, Rodrigues et al. 2009), sowie AHG1 und AHG3 (ABA-hypersensitive germination) (Nishimura, Yoshida et al. 2007). Zudem zeigten sämtliche Verlustmutanten von Vertretern der PP2CA Untergruppe ein hypersensitives ABA-Verhalten, im Gegensatz zu dem ABA-insensitiven Verhalten der Punktmutanten *abi1-1* und *abi2-1* (Hirayama and Shinozaki 2007). Bei Doppel- oder Dreifachverlustmutanten war sogar noch eine Steigerung der ABA-Hypersensitivität zu verzeichnen (Saez, Robert et al. 2006; Nishimura, Yoshida et al. 2007; Rubio, Rodrigues et al. 2009). Die verschiedenen PP2C-Phosphatasen besitzen ein spezifisches Expressionsmuster, sowohl auf Gewebe- als auch auf zellulärer und subzellulärer Ebene, was auf spezifische Aufgaben der einzelnen PP2C-Phosphatasen

hindeutet. ABI1 ist zum Beispiel im Zytosol als auch im Nukleus von Schließzellen und Samen anzutreffen, wohingegen AHG1 und AHG3 ausschließlich in Samen gefunden wurden, wo sie im Nukleus exprimiert vorliegen (Nishimura, Yoshida et al. 2007; Umezawa, Sugiyama et al. 2009). Die bereits oben erwähnten PYR/PYL/RCAR-Proteine interagieren nach Bindung von ABA mit den PP2C-Phosphatasen, und hindern diese so daran ihre „Downstream“ Zielproteine, wie beispielsweise die Mitglieder der SnRK-Kinasefamilie, zu dephosphorylieren. So bleiben die Kinasen in Anwesenheit von ABA aktiv (Ma, Szostkiewicz et al. 2009; Park, Fung et al. 2009; Vlad, Rubio et al. 2009). Die ABA-insensitiven Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* tragen eine Mutation (G180D in ABI1 bzw. G168D in ABI2), die eine Bindung der PYR/PYL/RCAR-Rezeptoren sterisch verhindert (Park, Fung et al. 2009). Das Fehlen der Interaktion zwischen PP2Cs und den Rezeptoren hat eine konstitutive Aktivität der Phosphatasen ABI1 und ABI2 zur Folge, was die ABA-Insensitivität in den *abi1-1* und *abi2-1*- Mutanten erklärt.

1.7.4 Kinasen sind positive Regulatoren innerhalb der ABA-Signalkaskade

Bereits in den Jahren (1990) und (1992) zeigten Experimente von McAinsh *et al.* an der Tagesblume (*Commelina communis*), dass die Gabe von ABA eine Erhöhung von Kalzium in den Schließzellen bewirkte, woraufhin der Stomaschluss zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Marten *et al.* (2007) und Stange *et al.* (2010) vorlegen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von S-Typ Anionenkanälen einherging mit einer vorherigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse von Levchenko *et al.* (2005), dass auch ohne einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration R- und S-Typ Kanäle aktiviert werden können, wodurch schließlich der Stomaschluss ausgelöst wird. Auch in der Arbeit von Marten *et al.* (2007) wird von Schließzellen berichtet, die bei ABA-Applikation nicht mit einem Anstieg des internen Kalziumspiegels reagierten. So zeigten nur 7 von 19 Zellen eine direkte Korrelation zwischen dem intrazellulären Kalziumanstieg und den Auftreten von S-Typ Anionenströmen. Weitere 7 Zellen zeigten eine verzögerte Kalziumantwort mit vorheriger Erhöhung der S-Typ Ströme. Bei 5 Zellen wurde jedoch kein Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels festgestellt, aber sehr wohl eine Aktivierung der S-Typ Ströme. Aus diesen Datensätzen schloss man schließlich, dass zwei parallele ABA-Signalwege existieren müssen – ein Kalziumabhängiger und ein Kalziumunabhängiger.

Die Analyse zahlreicher Verlustmutanten und EMS-Mutagenese-Studien ließ erahnen, dass Kinasen aus der CDPK-SnRK-Superfamilie eine bedeutende Rolle bei der ABA-Antwort in Schließzellen spielen. Die CDPK-SnRK-Superfamilie besteht aus sieben unterschiedlichen

Gruppen von Kalziumabhängigen und Kalziumunabhängigen Serin/Threonin-Kinasen. Einzelnen Vertretern konnte bereits ein Funktion für die Regulierung von Stoffwechselwegen, Entwicklung, Immun- und Stressantworten zugeschrieben werden (Hrabak, Chan et al. 2003; Batistic and Kudla 2012). Die CDPK-SnRK-Superfamilie setzt sich aus folgenden sieben Kinase-Gruppen zusammen: calcium-dependent protein kinases (CDPKs), CDPK-related kinases (CRKs), phosphoenolpyruvate carboxylase kinases (PPCKs), PEP carboxylase kinase-related kinases (PEPRKs), calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs), calcium and calmodulin-dependent protein kinases (CCaMKs), sowie die SNF1 related kinases (SnRKs). Dabei wird die letztere Gruppe nochmals in die drei Subgruppen SnRK1, SnRK2 und SnRK3 aufgespalten (Hrabak, Chan et al. 2003). Im folgendem soll kurz auf die drei Gruppen der CDPKs, der SnRK2s und der SnRK3s eingegangen werden, da diese eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Stomabewegung spielen (Abbildung 1.7.4.1). Für einen Überblick über den Rest der Kinasefamilie sei das Review von Hrabak *et al.* (2003) empfohlen.

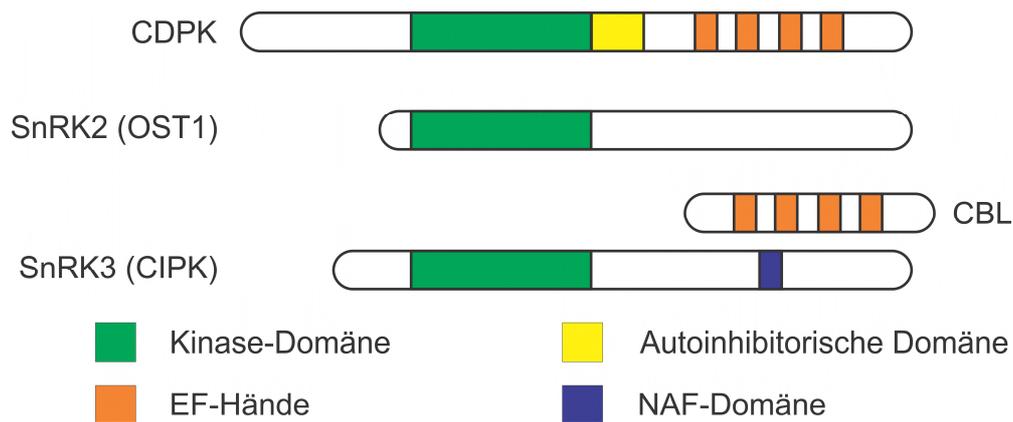


Abbildung 1.7.4.1: Schematischer Aufbau der Mitglieder der CDPKs, SnRK2s und SnRK3s/CIPKs sowie den CBLs. CDPKs besitzen einen variablen längeren N-Terminus als SnRK2s oder SnRK3s. Zudem folgt nach der Kinase-Domäne eine Autoinhibitorische-Domäne, die als Pseudosubstrat fungiert. Mitglieder der SnRKs besitzen keinen Kalziumsensor (EF-Hände). Kalziumabhängiges Verhalten der SnRK3s/CIPKs wird durch CBL-Proteine vermittelt die über die NAF-Domäne an die CIPKs binden. Weitere Details zu den Kinasen sind in den jeweiligen Abschnitten enthalten.

1.7.4.1 CDPKs

Die CDPKs sind kalziumabhängige Kinasen die nur in Pflanzen vorkommen. Ihr struktureller Aufbau zeigt einem variablen N-Terminus mit Myrestilierungsstellen, welche eine Verankerung in der Membran ermöglichen. Anschließend folgt eine Serin/Threonin-Kinasedomäne, die zur Klassifizierung der CDPK-SnRK-Superfamilie benutzt wurde (Hanks and Hunter 1995). An die Kinasedomäne schließt sich eine autoinhibitorische Domäne an, die als Pseudosubstrat zur Inhibierung der Kinasedomäne fungiert (Abbildung 1.7.4.1). Des Weiteren besitzen CDPKs vier EF-Hände die im C-Terminus des Proteins lokalisiert sind (Abbildung 1.7.4.1) (Hrabak, Chan et al. 2003). Diese EF-Hände bilden eine dem Calmodulin-ähnliche Kalziumbindestelle, und dienen als Kalziumsensor zur Wahrnehmung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration. Zusammen mit der autoinhibitorischen Domäne wird die Kinase reguliert. Bei geringen Kalziumkonzentrationen bindet die Kinasedomäne an die autoinhibitorische Domäne (Pseudosubstrat), und eine Substratphosphorylierung kann nicht erfolgen. Nach binden von Kalzium an die EF-Hände im C-Terminus des Proteins findet eine Konformationsänderung statt, wodurch die Kinasedomäne freigegeben wird, und mit ihrem Zielsubstrat interagieren kann (Cheng, Willmann et al. 2002; Chandran, Stollar et al. 2006). CDPK-Proteine mit abgetrennter Kalziumbindestelle und abgetrennter autoinhibitorischer Domäne sind konstitutiv aktiv und Kalzium insensitiv, eine Beobachtung, die das

Pseudosubstratmodell unterstützt (Harper, Huang et al. 1994; Sheen 1996). Im *A. thaliana* Genom konnten 34 CDPKs identifiziert werden. Dabei sind die CDPKs CPK3 und CPK6 unter anderem in Schließzellen exprimiert. Versuche mit den Single-Knock-Out Mutanten *cpk3* und *cpk6* zeigten, dass Schließzellprotoplasten geringere S-Typ Ströme aufzeigten als Wildtyp Protoplasten. In Doppel-Knock-Out Mutanten von CPK3 und CPK6 wurde dieser Effekt noch verstärkt. Zudem ergaben Messungen zur Stomaweite in der CPK3/6 Doppelmutante, dass der Stomaschluss nicht mehr vollständig erfolgen konnte (Mori, Murata et al. 2006). Außerdem zeichnete sich die CPK3/6 Verlustmutante im Vergleich zum WT durch geringere ABA-induzierte S-Typ Ströme aus. Die ebenfalls am Stomaschluss beteiligten R-Typ Ströme wiesen hingegen nur eine geringe Beeinflussung durch die CPK3/6 Doppelmutante auf, mit einer geringen Abnahme der ABA-induzierten Ströme verglichen mit denen des Wildtyps. Diese Daten ließen den Schluss zu, dass bestimmte CDPKs Teil des ABA-Signalweges sind und als positive Regulatoren der R- und S-typ Anionenkanäle in Schließzellen wirken. Weitere Positive Regulatoren der ABA-Signalkaskade sind die CDPKs CPK4 und CPK11 (Zhu, Yu et al. 2007). Beide CDPKs sind ebenfalls in den Schließzellen exprimiert, und CPK4 und CPK11 Verlustmutanten offenbarten einen starken ABA-insensitiven Phänotyp in Bezug auf Trockenstress, Stomaöffnung und Wasserverlust. Auch hier stellte sich heraus, dass die Doppelverlustmutante *cpk4/11* eine stärkere Ausbildung des Phänotypes zeigte als die Einzelmutationen. Dies verdeutlicht die zum Teil redundante Funktion der CDPKs. Mit ABA versetzte Keimlinge wiesen mit steigender ABA-Konzentration eine Erhöhung der beiden CPK-Proteine als auch eine vermehrte Kinaseaktivität auf. Des Weiteren legten Experimente von Ma und Wu (2007) dar, dass CPK23 Knock-Out Pflanzen ebenfalls einen gestörten Stoma-Phänotyp aufzeigten, wenn sie mit Salz- oder Trockenstress konfrontiert wurden. Eine genauere Untersuchung dieser CPK23 Kock-Out Pflanzen von Geiger *et al.* (2010) erbrachte, dass in Schließzellprotoplasten die S-Typ Ströme der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 70% abnahmen. Zusätzlich konnte in Oozyten und *Arabidopsis* Protoplasten die Interaktion von CPK23 und dem S-Typ Anionenkanal SLAC1 (Slow Anion Channel 1), welcher für die S-Typ Ströme in Schließzellen verantwortlich ist, eindeutig nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass auch ABI1 mit CPK23 interagiert, was ein weiterer Beweis für die Einbindung in den ABA-Signalweg war. In der gleichen Arbeit wurde beschrieben, dass auch die CDPK CPK21 den Kanal SLAC1 aktivieren kann, wenn auch in geringerem Umfang. Die für die Verlustmutanten von CPK6 gemachten Beobachtungen, konnten des Weiteren durch Brandt *et al.* bestätigt werden. Die Autoren zeigten in Oozyten eine Aktivierung von SLAC1 durch

CPK6, sowie eine Hemmung des Kinase/Kanal-Systems durch ABI1 (Brandt, Brodsky et al. 2012).

In Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* ist neben SLAC1 auch der SLAC1-Homologe Anionenkanal SLAH3 (SLAC1 Homolog 3) zu finden (Geiger, Maierhofer et al. 2011). Geiger *et al.* konnten zeigen, dass auch SLAH3 von der Kinase CPK21 in Oozyten aktiviert wird, und dass eine Koexpression von SLAH3, CPK21 und ABI1 in Oozyten wiederum die S-Typ Ströme minderte. Zudem wurde ebenfalls eine Interaktion von SLAH3 mit CPK3 und CPK6 gezeigt (Scherzer, Maierhofer et al. 2012). Dies erklärt zusammen mit den Daten für SLAC1 den Phänotyp der Verlustmutanten von CPK6 und CPK3. Schließlich konnten Gutermuth *et al.* (2013) veranschaulichen, dass SLAH3 ebenfalls in Pollenschläuchen exprimiert wird und für das Pollenschlauchwachstum verantwortlich ist. Die Regulation von SLAH3 wird hier durch die CPDKs CPK2 und CPK20 gesteuert, wie Experimente in Oozyten als auch mit Kock-Out Mutanten (*cpk2cpk20*, *slah3-1*) zeigten.

1.7.4.2 SnRKs

Die SnRKs werden in drei Subgruppen unterteilt, SnRK1-3. Sie zeigen die größte Homologie zu ihren namensgebenden „Urvätern“ den SNF1(Sucrose Non Fermenting)-Kinasen. SnRK1-Kinasen besitzen eine 48% Aminosäuresequenzhomologie zu den SNF1-Kinasen, welche im Bereich der Kinasedomäne bis zu 62-64% Aminosäuresequenzhomologie erreichen kann (Halford, Hey et al. 2003). In *A. thaliana* sind drei Vertreter der SnRK1-Gruppe bekannt. Die beiden Subgruppen SnRK2 und SnRK3 wurden nur in Pflanzen nachgewiesen, zeigen jedoch eine geringere Aminosäuresequenzhomologie zu den SNF1- und den SnRK1-Kinasen (Halford, Hey et al. 2003). Dabei wurden in *A. thaliana* 10 Vertreter von SnRK2-Kinasen und 26 Vertreter von SnRK3-Kinasen identifiziert (Hrabak, Chan et al. 2003; Maierhofer, Lind et al. 2014). Zudem besitzen die beiden Subgruppen SnRK2 und SnRK3 ein unterschiedliches Verhalten auf Kalzium. So sind SnRK2-Kinasen kalziumunabhängig während SnRK3-Kinasen kalziumabhängig phosphorylieren (Abbildung 1.7.4.1). Im Gegensatz zu den CDPKs besitzen SnRKs keine Myristoylierungsstellen, wodurch sie primär nicht membrangebunden sind und deshalb im Zytosol vermutet werden (Hrabak, Chan et al. 2003). Von den Vertretern der SnRK2s in *Arabidopsis* weisen SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6/OST1 eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf. Die Tripple-Knock-Out Mutante der Kinasen zeigt einen stark ABA-insensitiven Phänotyp als auch eine erhöhten Wasserverlust unter Trockenstress (Fujita, Nakashima et al. 2009; Nakashima, Fujita et al. 2009). Von den drei Einzel-Mutanten zeigt

snrk2.6/ost1 den stärksten Welken-Phänotyp. Aufgrund dieses Sachverhaltes soll die Rolle von SnRK2.6 genauer veranschaulicht werden.

1.7.4.3 SnRK2.6/OST1

Die Kinase OST1/SnRK2.6 rückte im Jahr 2002 in den Fokus der Trockenstressforschung in Schließzellen. In einem Mutantenscreen zur Identifizierung von trockenstresssensitiven Phänotypen in *A. thaliana* wurden die beiden Punktmutanten *ost1-1* und *ost1-2* entdeckt (Merlot, Mustilli et al. 2002; Mustilli, Merlot et al. 2002; Yoshida, Hobo et al. 2002). *ost1-1* und *ost1-2* besitzen jeweils einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin, wodurch sie inaktiv wurden. Im Fall von *ost1-1* wird durch den Austausch ein korrektes Ablesen des Gens verhindert (Mustilli, Merlot et al. 2002), wohingegen bei *ost1-2* der Austausch von Glycin 33 zu Arginin das Binden von ATP an die Kinasedomäne verhindert und so eine Kinase-inaktive Mutante entstand (Hanks and Quinn 1991; Mustilli, Merlot et al. 2002). Beide Mutanten zeichneten sich durch eine ausgeprägte ABA-Insensitivität und somit einem gestörten ABA-abhängigen Stomaschluss aus. Dies führte zu einem erhöhten Transpirationsverlust und somit zu einer Hypersensitivität gegenüber Trockenheit (Mustilli, Merlot et al. 2002; Yoshida, Hobo et al. 2002). Zudem konnten durch Real-Time-PCR Experimente und Reporter-GUS-Färbungen die Lokalisation von OST1 in der Schließzelle nachgewiesen werden (Mustilli, Merlot et al. 2002; Geiger, Scherzer et al. 2009). Im Gegensatz zu den CDPKs besitzen die SnRKs keine Calmodulin-ähnliche Bindestelle (Abbildung 1.7.4.1) (Hrabak, Chan et al. 2003), weswegen sie nicht durch Kalzium aktiviert werden müssen. Untersuchungen mit dem Yeast-Two-Hybrid-System ergaben zudem, dass OST1 mit der PP2C-Phosphatase ABI1 interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion durch eine Aminosäuresequenz am C-Terminus (Domäne II) zustande kam (Yoshida, Umezawa et al. 2006). Das Homolog von AB1 (HAB1) ist in der Lage OST1 zu dephosphorylieren, was gleichzeitig mit einem Verlust der Aktivität von OST1 einhergeht (Vlad, Rubio et al. 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Umezawa *et al.* (2009) welche aufzeigen konnten, dass ABI1 eine *in vivo* Phosphorylierung von OST1 *in vitro* rückgängig machen kann. Elektrophysiologische Messungen von Geiger und Scherzer (Geiger, Scherzer et al. 2009) zeigen schließlich, dass OST1 SLAC1 phosphoryliert, und dass diese Phosphorylierung den Anionenkanal aktiviert. Weiter wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass ABI1 die Phosphorylierung von SLAC1 durch OST1 zwar unterbindet, aber nicht rückgängig macht. Später durchgeführte *in vitro* Kinase Assays von Maierhofer und Geiger *et al.* (2014) zeigten jedoch eindeutig, dass ABI1 die Phosphorylierung von OST1 aufhebt. All diese Daten veranschaulichen die wichtige Funktion von OST1 beim Stomaschluss, als auch die Funktion eines positiven kalziumunabhängigen Regulators in der ABA-Kaskade.

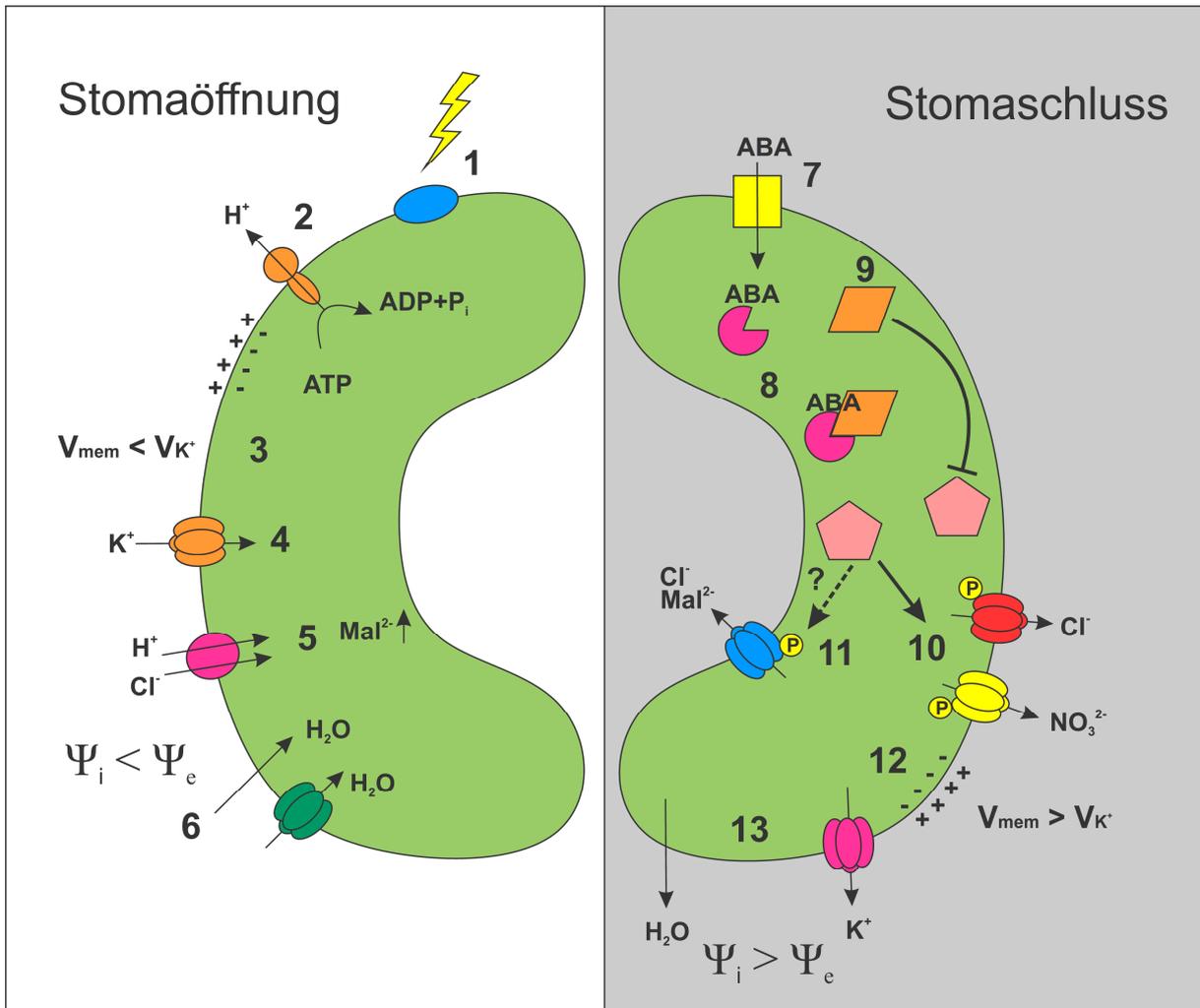
1.7.4.4 SnRK3s (CIPKs)

Die Pflanzen-spezifischen Kinasen aus der SnRK3/CIPK-Gruppe benötigen die Interaktion mit Calzineurin-B-Like-Proteinen (CBLs) um aktiv zu werden. Durch diese Interaktion entsteht das kalziumabhängiges Phosphorylierungsverhalten der CIPK (CBL interacting kinases) Kinasen, da die CBL-Proteinen als Kalziumsensor fungieren (Abbildung 1.7.4.1). Die CIPKs besitzen eine Kinasedomäne, sowie eine Bindedomäne für CBLs im C-Terminus des Proteins (Abbildung 1.7.4.1) (Batistic and Kudla 2004). Dieses als NAF-Domäne (Abbildung 1.7.4.1) bezeichnete Motiv ist 24 Aminosäure lang und stark in den CIPKs konserviert (Albrecht, Ritz et al. 2001). Die CBLs wiederum besitzen EF-Hände mit denen sie Kalzium wahrnehmen können. Nach Binden von Kalzium interagieren die CBLs mit den CIPKs. In *Arabidopsis* sind 26 CIPKs und 10 CBLs bekannt, woraus sich mannigfaltige Kombinationsmöglichkeiten für die Dekodierung von Kalziumsignalen und abiotischen Stresssignalen ergeben (Batistic and Kudla 2004; Luan 2009; Maierhofer, Lind et al. 2014). Zudem besitzen einige CBL-Proteine N-terminale Myristoylierungsstellen (und zum Teil Palmitoylierungsstellen), wodurch sie membrangebunden sind (Kudla, Xu et al. 1999; Luan 2009). Durch Interaktion mit den CIPKs, welche keine Myristoylierungsstellen besitzen, können die Kinasen an unterschiedliche Membranen gebracht werden, um dort ihre Zielproteine zu phosphorylieren (Luan 2009). So zeigten z.B. fluoreszenzmikroskopische Versuche, dass die beiden CBLs CBL1 und CBL9 an die Plasmamembran von Zellen gebunden sind (D'Angelo, Weinl et al. 2006; Cheong, Pandey et al. 2007). Beide CBLs interagieren unter anderem mit der Kinase CIPK1. Wie D'Angelo fluoreszenztechnisch in BIFC Experimenten zeigen konnte, wird CIPK1 durch die CBLs an die Plasmamembran rekrutiert. Wenn in den gleichen Experimenten die NAF-Domäne aus der CIPK1 entfernt wurde, konnte kein CIPK-Fluoreszenzsignal mehr an der Plasmamembran festgestellt werden (D'Angelo, Weinl et al. 2006). Zudem wurden in derselben Arbeit Experimente mit Knock-Out Mutanten von CBL1 und CIPK1 vorgestellt, die sich durch eine geringere Keimungsrate der Samen auf die Gabe von ABA auszeichneten. Aber auch die Arbeiten von Albrecht (Albrecht, Weinl et al. 2003) und Cheong (Cheong, Kim et al. 2003) verdeutlichen die Beteiligung der CBLs am ABA-Signalweg. Beide Autoren zeigten, dass CBL1 Knock-Out Mutanten aus *Arabidopsis* schlechtere Anpassungen an Kälte-, Trocken- und Salzstress besaßen. Knock-Out Mutanten von CBL9 in *Arabidopsis* zeigten sogar eine viel stärker ausgeprägte Hypersensitivität gegenüber Keimung und Wachstum, als dies *cbll* Mutanten taten (Pandey, Cheong et al. 2004). Das gleichzeitige Ausschalten von CBL1 und CBL9 konnte die oben beschriebenen Effekte sogar noch verstärken (Cheong, Pandey et al. 2007). Sowohl CBL1 als auch CBL9 interagieren mit der CIPK23, wie BIFC Versuche von CIPK23

mit und ohne NAF-Domäne und gleichzeitiger Expression von CBL1 oder CBL9 in Tabakprotoplasten ergaben (Cheong, Pandey et al. 2007). Mutanten von CIPK23 zeigten ein hypersensitives Verhalten gegenüber ABA, welches sich durch verstärkten Stomaschluss und verminderten Wasserverlust äußerte (Cheong, Pandey et al. 2007). Teilweise kann dieser Phänotyp durch eine geminderte Aktivität von AKT1, welcher durch CIPK23 und CBL1 und CBL9 aktiviert wird, erklärt werden (Li, Kim et al. 2006; Xu, Li et al. 2006). Zum anderen wurde eine Beteiligung der S-Typ Kanäle an diesem Phänotyp durch Maierhofer *et al.* gezeigt (2014). Koexpression von SLAC1 bzw. SLAH3 mit CIPK23 sowie CBL1 oder CBL9 führten zur Aktivierung dieser beiden S-Typ Kanäle. Weiterhin bestätigen *in vitro* Kinase Assays mit SLAC1 oder SLAH3 die Phosphorylierung der Kanäle durch die Kinase CIPK23. Zudem konnte die in den ABA-Signalweg eingebundene PP2C-Phosphatase ABI1 die durch CIPK23 hervorgerufene Phosphorylierung rückgängig machen (Maierhofer, Diekmann et al. 2014).

1.8 Übersicht über die Regulation der Stomaöffnung und des Stomaschlusses

Die aus den vorherigen Abschnitten beschriebenen Beobachtungen zur Stomaöffnung und zum Stomaschluss sollen hier in Abbildung 1.8.1 kurz zusammengefasst und grafisch wiedergegeben werden.



- | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|-----------|--|
| | Blaulichtrezeptoren (PHOT1, PHOT2) | | Kation-Einwärtsgleichrichter (AKT1, AKT2/3, KAT1, KAT2, KC1) |
| | H ⁺ -ATPasen | | Kation-Außwärtsgleichrichter (GORK) |
| | Anionen-Symporter | | SLAC1 |
| | ABA-Transporter | | SLAH3 |
| | ABA-Rezeptor (PYR/PYL/RCAR) | | R-Typ Kanäle |
| | PP2C (ABI1) | | Aquaporine |
| | Kinasen (CDPKs, CIPKs, OST1) | | |
| Ψ_i / Ψ_e | Wasserpotential intra- extrazellulär | V_{mem} | Membrtanpotential |
| | | V_K | nernstsches Kallium-Gleichgewichtspotential |

Abbildung 1.8.1: Schematischer Ablauf der Transportvorgänge an der Schließzellmembran während des Stomaschlusses (rechts) und der Stomaöffnung (links). (1) Bei der Stomaöffnung trifft (Blau-) Licht auf die Pflanze und wird durch Photorezeptoren (PHOT1 und PHOT2) wahrgenommen (Abschnitt 1.4.1). (2) Diese

Rezeptorkinasen aktivieren daraufhin H⁺-ATPasen in der Zellmembran, welche wiederum Protonen unter Spaltung von ATP in den Apoplasten transportieren (Abschnitt 1.4.1). (3) Durch die Hyperpolarisation der Membran wird die Membranspannung negativer als die Spannung des Kaliumgleichgewichtspotentials. (4) Spannungsabhängige einwärtsrichtende K⁺-Kanäle der Shaker-Familie (AKT1, AKT2/3, KAT1, KAT2, KC1) öffnen und Kalium strömt in die Zelle (Abschnitt 1.4.1). (5) Als Gegenion wird Chlorid über Anionensymporter aufgenommen. Gleichzeitig wird Malat in der Zelle aus Stärke synthetisiert oder aus internen Speichern freigesetzt. (6) Durch die Aufnahme der Ionen sinkt das Wasserpotential in der Zelle, woraufhin Wasser in die Zelle durch Diffusion oder Aquaporine nachströmt. Die Zelle schwillt an und das Stoma öffnet sich. (7) Durch Trockenstress wird ein ABA-Signal generiert. ABA wird durch einen ABA-Transporter (ABCG40) in die Zelle transportiert (Abschnitt 1.7.1). (8) Der ABA-Rezeptor PYR/PYL/RCAR bindet ABA (Abschnitt 1.7.2), und kann dadurch an die PP2C-Phosphatase ABI1 binden, und hindert ABI1 so an seiner Funktion. (9) ABI1 ist ein negativer Regulator der ABA-Signalkaskade und unterbindet die Funktion von „Downstream“ Kinasen (Abschnitt 1.7.3). (10) Kalziumabhängige Kinasen (CDPKs, CIPKs) und kalziumunabhängige Kinasen (OST1) können nun S-Typ Kanäle durch Phosphorylierung aktivieren (Abschnitt 1.7.4). Der S-Typ Kanal SLAC1 vermittelt einen Chloridausstrom, wohingegen SLAH3 Nitrat transportiert (Abschnitt 1.5). (11) Auch eine Aktivierung der R-Typ Kanäle ist zu beobachten, welche Chlorid und Malat in den Apoplasten entlassen. Ob diese Aktivierung auch durch Kinasen vermittelt wird, ist Gegenstand der Diskussion. (12) Durch den Anionenausstrom depolarisiert die Zellmembran, woraufhin spannungsabhängige auswärtsgerichtete K⁺-Kanäle (GORK) öffnen und Kalium in den Apoplasten entlassen (Abschnitt 1.4.2). (13) Das Wasserpotential in der Zelle steigt, wodurch ein Efflux von Wasser aus der Zelle stattfindet und die Zelle schrumpft.

1.9 Zielsetzung

Landpflanzen besitzen Öffnungen in ihren Blättern. Diese als Stoma bezeichneten Strukturen dienen dem Gasaustausch mit der Umgebung. Ein Stoma besteht aus zwei Schließzellen. Die Weite des Atmungsspalt zwischen den Schließzellen wird durch Aufnahme bzw. Abgabe von Wasser in die Schließzellen geregelt. Wasseraufnahme in die Schließzellen führt zum Öffnen der Stomata, Wasserabgabe zum Schließen der selbigen (Abbildung 1.8.1). Der Wasser Ein- und Ausstrom wird durch Aufnahme und Abgabe von Ionen in die Schließzellen erreicht, wodurch Wasser in oder aus den Schließzellen nachströmt (Abbildung 1.8.1). Der Transport der Ionen über die Zellmembran wird über ATP-getriebene Pumpen, Symporter und Antiporter, sowie über Ionenkanäle vermittelt. Unter Trockenstress wird das Stresshormon ABA in Schließzellen gebildet bzw. von diesen aufgenommen. ABA bewirkt den Schluss der Stomata. Dieser Stomaschluss ist begleitet von einer Akkumulation von Kalium, Chlorid, Nitrat und Malat im Apoplasten. Patch-Clamp Experimente zeigen, dass die Kaliumabgabe aus Schließzellen mit auswärts gerichteten Strömen verbunden ist, die durch den Kaliumkanal GORK hervorgerufen werden (Abbildung 1.8.1). Zuvor jedoch ist eine Depolarisation der Schließzellmembran zu beobachten die GORK aktiviert. Diese Depolarisation wird durch S-

Typ und R-Typ Ströme hervorgerufen (Abbildung 1.8.1). Beide Stromtypen beruhen auf der Abgabe von Anionen aus den Schließzellen. S-Typ Ströme sind spannungsunabhängig und besitzen eine langsame Deaktivierungskinetik mit einer Relaxationszeit die im Sekunden- bis Minutenbereich liegt. R-Typ Ströme sind stark spannungsabhängig und haben eine schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik mit Relaxationszeiten die im Millisekunden- bis Sekundenbereich liegen. Es konnte gezeigt werden, dass die S-Typ Ströme durch die Kanäle SLAC1 und SLAH3 hervorgerufen werden. Damit die Kanäle jedoch funktionieren müssen sie durch Kalziumunabhängige Kinasen (OST1) oder Kalziumabhängige Kinasen (CDPKs, CIPKs) aktiviert werden (Abbildung 1.8.1). Diese Kinasen sind negativ über die PP2C-Phosphatase ABI1 reguliert. ABI1 wird wiederum durch die Interaktion mit dem ABA-Rezeptor PYR/PYL/RCAR und dem Stresshormon ABA selbst reguliert (Abbildung 1.8.1). Die Identität der R-Typ Kanäle ist bisher noch nicht bekannt. Als Kandidaten die die R-Typ Ströme hervorrufen, wurden unter anderem die CLC-Kanäle, der CFTR-Kanal aus der Familie der ABC-Transporter sowie TMEM16A aus der Familie der CaCC vermutet. Alle bisher genannten Kandidaten scheiden aber aus unterschiedlichen Gründen aus. Eine weitere vielversprechende Proteinfamilie auf der Suche nach den R-Typ Kanälen ist die ALMT-Familie. Beim Öffnen der Stomata akkumuliert Malat in den Schließzellen (Allaway 1973). Die Akkumulation von Malat muss durch Synthese oder durch Transport in die Zelle erfolgen. Da die Mitglieder der ALMT-Familie organische Säuren leiten können und AtALMT12 in den Schließzellen exprimiert wird (Meyer, Mumm et al. 2010), könnte der Kanal an der Malatakkumulation beteiligt sein. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit die elektrochemischen Eigenschaften von AtALMT12 mit Hilfe der TEVC Methode ergründet. Nach einer Grundcharakterisierung von AtALMT12, wurden an dem Kanal mit Hilfe von Mutationen Struktur-Funktions-Analysen durchgeführt, die weiteren Aufschluss auf seine Eigenschaften lieferten. Zudem sollte mit dieser Arbeit die Topologie der ALMT-Familie besser verstanden werden, da zu Beginn dieser Arbeit die bekannten Topologiedaten einige Widersprüche aufwiesen. Des Weiteren sollte die Rolle von AtALMT12 beim Öffnen und Schließen der Stomata beleuchtet werden, und welche Mechanismen dazu führen, dass AtALMT12 aktiviert und deaktiviert wird. Hierfür wurde die Interaktion mit denen in der ABA-Signalkaskade vorkommenden Faktoren wie OST1, ABI1 und CDPKs untersucht. Zudem zeigt diese Arbeit, dass AtALMT12 mit für die Ausbildung der R-Typ Ströme verantwortlich ist, und deren molekularen Ursprung darstellt. Deswegen wird die Umbenennung des Kanals, in Analogie zu den SLACs, zu QUAC1 (Quick Anion Channel) vorgeschlagen.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung von dem *E. coli* Stamm MRF⁺ erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Die Inkubationszeit betrug 12 - 16 h, wobei die Kultivierung in flüssigem LB-Medium unter ständigem Schütteln bei 200 rpm stattfand. Zur Aufbewahrung von transformierten Klonen wurden Bakterienstocks bei -80°C aufbewahrt. Die Herstellung eines Stocks erfolgte aus einer frisch angesetzten Übernachtskultur. Dabei wurde die Kultur mit 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt, und anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

2.1.2 Transformation

Durch eine Transformation wurden Plasmide in Bakterien eingebracht, um diese zu vervielfältigen. 50 µl Aliquots von Bakterien des Stammes MRF⁺ (Stratagene; für DNA-Amplifikationen) oder RosettaTM (Merck; für Proteinexpressionen) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurde 1 µl Plasmid DNA (entsprach ca. 10 ng DNA) oder 10 µl USER Reaktion hinzugegeben (entsprach ca. 10 ng DNA). Die Bakterien wurden dann für 45 Sekunden bei 42°C in einem Wasserbad und anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf Antibiotika enthaltende LB-Platten ausgestrichen, entsprechend der Antibiotikaresistenz im eingebrachten Vektor.

Handelte es sich bei dem eingebrachten Plasmid um ein empfindliches Konstrukt oder eine Kanamycinresistenz, wurden die Bakterien nochmals für 30 - 60 Minuten in SOC-Medium überführt und bei 37°C unter schütteln inkubiert. Erst danach wurden die Kulturen auf entsprechende LB-Platten ausgestrichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.0 Überblick der RNA Expression in Oozyten und Elektrophysiologischer Messungen.

Das übliche Verfahren zum Exprimieren von Kanalproteinen in Oozyten soll im folgendem kurz wiedergegeben werden. Zunächst wurde eine gewünschte DNA-Sequenz mit Hilfe des USER-Systems (Abschnitt 2.2.1) in einen geeigneten Vektor kloniert (Abschnitte 2.2.1.1 - 2). Anschließend wurden Bakterien mit dem erstellten DNA-Konstrukt transformiert (2.1.2).

Negative und positive Klone wurden anhand eines Kontrollverdaus oder einer PCR unterschieden (Abschnitt 2.2.3). Aus positiven Klonen wurden Bakterienkulturen angesetzt, um größere Mengen des DNA-Konstruktes zu erhalten und zu isolieren (Abschnitt 2.1). Das isolierte Plasmid wurde aufgereinigt (Abschnitt 2.2.2) und danach über eine IVT-PCR in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.2.3.1). Nach einer Aufreinigung des IVT-PCR-Ansatzes wurde mit Hilfe des AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kits RNA erstellt (Abschnitt 2.2.5). Die Konzentration der RNA wurde bestimmt und eingestellt (Abschnitte 2.2.6 und 2.2.7), und anschließend wurde die RNA per Mikrokapillare in Oozyten injiziert (Abschnitt 2.2.8). Nach drei- bis viertägiger Inkubation der RNA wurden die in den Oozyten exprimierten Kanalproteine mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.4) und der Two Electrode Voltage Clamp Methode (TEVC) untersucht (Abschnitt 2.5).

2.2.1 USER™ System

Mit Hilfe des USER™ Systems konnten schnell verschiedenste DNA-Fragmente in zuvor erstellte geeignete Vektoren eingebracht werden. Des Weiteren war die Methode geeignet Mutationen in einzubringenden DNA-Fragmenten zu erzeugen.

Bei der USER™ Methode werden 8 Nukleotid-lange komplementäre Überhänge im Vektor und dem einzubringenden DNA-Fragment erzeugt. Durch diese Überhänge können das DNA-Fragment und der Vektor hybridisieren und ohne Ligation in Bakterien eingebracht werden und diese zu transformieren (Ciais, Denning et al. 1997). In Abbildung 2.2.1.1 ist eine detaillierte Beschreibung des Vorgangs dargestellt.

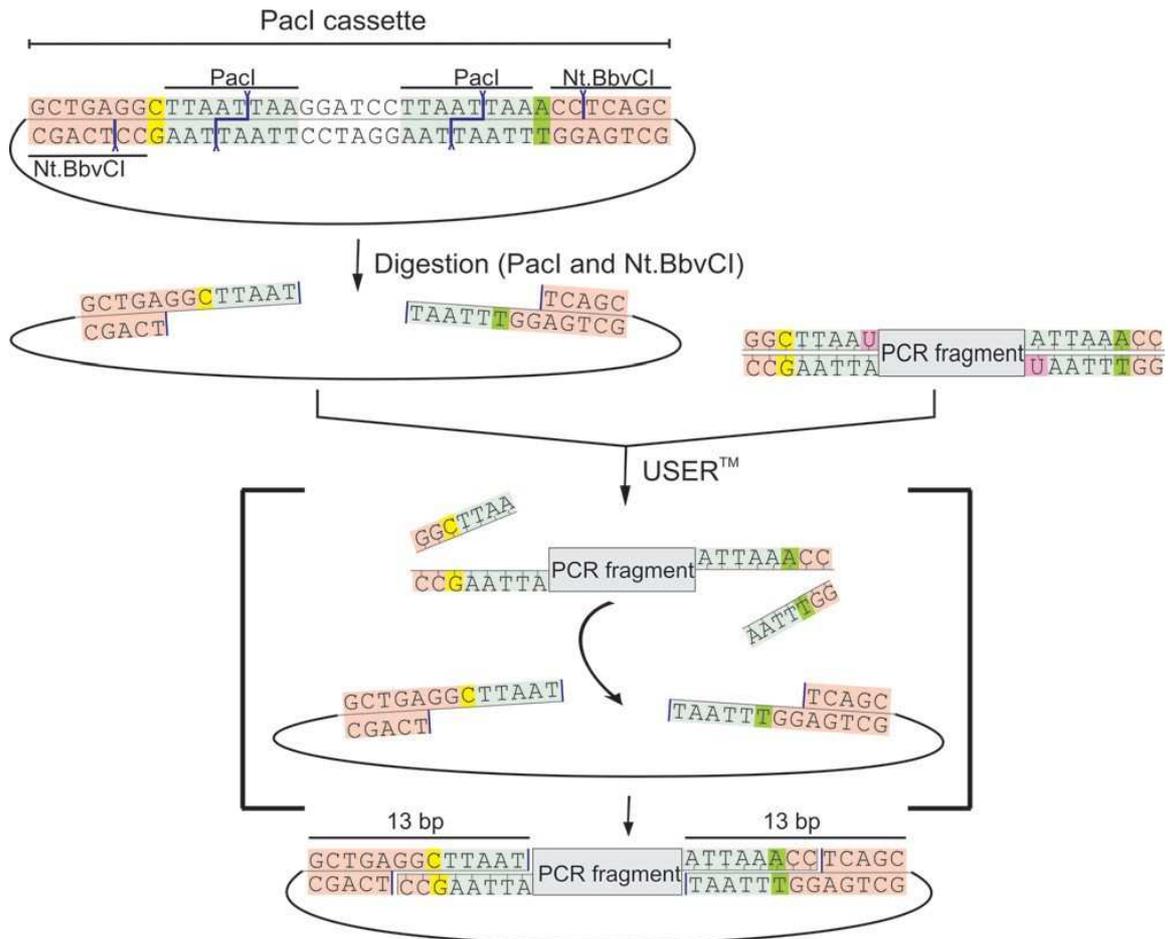


Abbildung 2.2.1.1: Schematische Darstellung der Herstellung von komplementären USER Überhängen. Zunächst wird über die Multiple Klonierungsstelle (*engl.* Multiple Cloning Site) eine 38 bp lange PacI User-Kassette in den gewünschten Vektor eingebracht (oben). Der USER-Vektor wird zuerst mit PacI und anschließend mit Nt.BbvCI verdaut, um 8 nt lange 3' Überhänge zu erzeugen (Mitte links). Das einzubringende DNA-Fragment, welches mit Uracil (pink) haltigen Primern erzeugt wurde, wird zu dem linearisierten Vektor gegeben und mit einem USER Enzym inkubiert (37° für 30 min). In diesem Schritt wird durch das USER Enzym das Uracil aus den Überhängen des DNA-Fragments entfernt und die verbleibenden 5' Enden diffundieren davon (Mitte). Im anschließenden Schritthybridisieren Vektor und Fragment an den entstandenen Überhängen (25° für 25 min). Da sich die Überhänge durch die gelb und grün markierten Nukleotide unterscheiden, wird eine verkehrte Insertion verhindert. Abbildung wurde aus (Willmer and Fricker 1996) entnommen.

2.2.1.1 Herstellung der USER Vektoren

Als Ausgangsvektor wurde der Vektor pGEM KN verwendet. Mittels der multiplen Klonierungsstelle wurde die 38 bp lange PacI-User-Kassette eingebracht (Abbildung 2.2.1.1). Nach einer Überprüfung des Inserts durch Sequenzieren wurden die USER Vektoren mit 60 U PacI (Fermentas) pro 5 µg Plasmid für 12h linearisiert und anschließende nochmals mit 20 U

NtBbvCI (New England Biolabs) für 1h bei 37°C verdaut. Nach Aufreinigung über Qiagen PCR Purification Kit (QIAGEN) wurden die linearisierten Vektoren aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dieser USER Vektor wurde als pNB1u #16 bezeichnet. Um fluoreszenzmikroskopisch zu arbeiten wurde daraufhin in pNB1u #16 ein YFP und eine weitere PAC1 Kasette eingebracht, so dass die Vektoren pNB1u #21 und pNB1u #22 (Tabelle 2.2.1.1.1) entstanden. Dabei wurde mit Hilfe von PCR vor oder nach dem YFP-Gen ein 25 bp langer Überhang generiert, der die Pac Kasette enthielt (Nour-Eldin et al. 2006). Über die bereits vorhandene USER-Kasette konnte dieses Konstrukt in den Vektor eingebracht werden. Je nachdem ob der Überhang an das 5' Ende bzw. an das 3' Ende des YFP-Gens gehängt wurde, entstand vor dem YFP bzw. nach dem YFP neue USER-Kasette. So wurden auch die weiteren in Tabelle 2.2.1.1.1 beschriebenen Split YFP-Vektoren erstellt.

Tabelle 2.2.1.1.1: Verwendete Vektoren und Nomenklatur.

Name	Beschreibung
pNB1u #16	<i>Xenopus</i> expressions Vektor mit USER-Kassette
pNB1u #17	Platzierung der C-Terminalen YFP-Hälfte vor (upstream) der USER Kassette, woraus eine N-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.
pNB1u #18	Platzierung der C-Terminalen YFP-Hälfte nach (downstream) der USER Kassette, woraus eine C-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.
pNB1u #19	Platzierung der N-Terminalen YFP-Hälfte vor (upstream) der USER Kassette, woraus eine N-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.
pNB1u #20	Platzierung der N-Terminalen YFP-Hälfte nach (downstream) der USER Kassette, woraus eine C-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.
pNB1u #21	Platzierung des ganzen YFPs vor (upstream) der USER Kassette, woraus eine N-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.
pNB1u #22	Platzierung des ganzen YFPs nach (downstream) der USER Kassette, woraus eine C-Terminale YFP Fusion zur eingebrachten DNA erfolgt.

2.2.1.2 Einbringen von USER Fragmenten in Vektoren

Der Standardvorgang mit dem die gewünschte DNA in einen Vektor eingebracht wurde sah wie folgt aus. Es wurden:

1 μ l	Vektor
2 - 8 μ l	Insert DNA mit USER Überhängen (die DNA Menge entsprach in etwa 200 - 400 ng pro Ansatz)
1 μ l	USER TM Enzym Mix (1U / μ l)
5 μ l	TE Puffer

miteinander gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C und danach für 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Dieser Ansatz konnte dann sofort für die Transformation von Bakterien genutzt werden.

2.2.2 Plasmidisolation und Reinigung

Die Plasmidisolierung wurde mittels alkalischer Lyse von Zellen durchgeführt. Bakterien wurden hierbei durch Zugabe von Lyse-Puffer, welcher Natronlauge, RNAsen und ein Detergenz (SDS) enthielt, aufgebrochen. Die Reaktion wurde durch ansäuern mit Natriumacetat gestoppt. Durch anschließende Zentrifugation wurden Zelltrümmer pelletiert und die DNA verblieb im Überstand. Das Plasmid wurde anschließend durch Zugabe von Alkohol (Isopropanol/Ethanol) aus dem Überstand gefällt und konnte nach Aufnahme in Wasser weiterverwendet werden.

Zur Herstellung des TENS (Lyse-) Puffers wurden 9,4 ml TE Puffer (10 mM Tris (pH 8,1), 1mM EDTA), 500 μ l SDS (10 % w/v), 100 μ l NaOH (10 M) und 200 μ l RNase (10 mg/ μ l) gemischt. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 60 sec zentrifugiert (10000 RPM, RT), und der Überstand danach verworfen. Die Bakterien wurden im verbliebenen Medium durch Vortexen wieder gelöst. Nach Zugabe von 400 μ l TENS und dreimaligen invertieren wurde im Anschluss 200 μ l 3 M Natriumacetatlösung dazu geben und nochmals invertiert. Der Ansatz wurde für 15 min zentrifugiert (14000 RPM, RT). Danach wurde der Überstand in 800 μ l Isopropanol überführt und 20 min zentrifugiert (14000 RPM, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen (2 min, 14000 RPM, RT). Nach erneutem Abnehmen des Überstand wurde das Pellet vollständig getrocknet und in 50 μ l TE Puffer mit RNase oder Wasser aufgenommen. Anschließend wurde das Plasmid mittels des QIAquick

PCR Purification Kits (QIAGEN) aufgereinigt. Hierbei findet eine Bindung der DNA an eine Silicamatrize statt und wird über hohe bzw. niedrige Salzkonzentrationen an diese gebunden bzw. gelöst. Alternativ erfolgte die Gewinnung und Aufreinigung auch durch das Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Nähere Informationen zu diesen Prozessen sind aus den Anleitungen des jeweiligen Kits zu entnehmen, oder auf der Homepage von QIAGEN zu finden (<http://www.qiagen.com>).

2.2.3 PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA. Des Weiteren wurde die Methode genutzt um das Einbringen von Zielgenen in Vektoren mit geeigneten Primern zu überprüfen oder gezielt Mutationen in Genen zu erzeugen. Die verwendeten Primer wurden von Metabion vorgelöst als 100 μM Lösung bezogen (siehe Anhang 7.3). Beim Erstellen von Mutationen mit Hilfe von PCR wurde anschließend ein Verdau mit dem Enzym DPN1 (1 μl Enzym (20U) auf 50 μl PCR / 1 h bei 37°C) durchgeführt, um die Template DNA zu beseitigen. PCRs wurden nach erfolgter Herstellung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) aufgereinigt.

2.2.3.1 IVT PCR

Von denen, mit der USER Methode erzeugten, Klonen der einzelnen CPKs, PP2Cs, SnRKs sowie von QUAC1 und SLAC1 wurden Plasmid Minipräparationen angefertigt. Diese stellten die Templates für die so genannte IVT PCR. Dabei wurde mit Vektor spezifischen Primern, die auf jedem erzeugten Vektor 5' der 5' untranslatierten Region (UTR) und 3' der 3' UTR aufsetzen, eine PCR durchgeführt. Die so gewonnene lineare DNA diente nach Aufreinigung (Quiagen PCR purification kit) als Template für die *in vitro* Transkription (s. 2.2.5). Basis für die Transkription ist ein Mastermix bestehend aus:

Tabelle 2.2.3.1.1: Standardzusammensetzung von IVT-PCR.

Template DNA	1 μl (ca. 10 ng)
IVT fwd Primer	1 μl (10 μM)
IVT rew Primer	1 μl (10 μM)
Polymerase (Phusion C _x)	1 μl (2U/ μl)
dNTP Mix (ATP,GTP,CTP,TTP)	1 μl (10mM)

Phusion Buffer (10x)	1 μ l
H ₂ O (DNase/RNase frei (DEPC behandelt))	35 μ l

Nach Pipettieren wurde der Ansatz kurz gemischt (Vortexer) und anschließend für drei Sekunden zentrifugiert. Danach wurde die PCR in einem Eppendorf PCR Cycler (Eppendorf Mastercycler) durchgeführt. Je nach Größe des zu erzeugenden Fragmentes wurde die Elongationszeit variiert. Das Standardprotokoll war wie folgt beschaffen.

Tabelle 2.2.3.1.2: Standardtemperaturprotokoll IVT-PCR.

	Initiation	60 sec / 98°C
30 X {	Melting	20 sec / 98°C
	Anaealing	20 sec / 58°C
	Elongation	90 sec / 72°C
	Final Elongation	300 sec / 37°C

2.2.4 Mutagenese mit Hilfe des USER Systems

In dieser Arbeit wurden auch die Auswirkungen von Punktmutationen und Deletionen auf den Kanal QUAC1 untersucht. Zum Erstellen von beiden wurde ebenfalls das USER System benutzt. Die hierfür verwendeten Primer befinden sich im Anhang. Zum Verfahren selbst sei im kurzen nur gesagt, dass das USER Prinzip nur ein Adenin und ein Thymin voraussetzt, welche in einem Abstand von 7 - 16 AS zueinander sein müssen. Mit Hilfe dieser Information ließen sich in dem Gen von QUAC1/ALMT12 geeignete Stellen finden, um Bereiche zu deletieren. Vor oder nach der zu deletierenden Stelle musste sich lediglich die beschriebene Aminosäuresequenz (A(7 - 16X)T) befinden. Dann wurden Primer erstellt die jeweils das Genfragment vor bzw. nach der Deletion bildeten. Die beiden so gewonnenen Fragmente konnten dann durch die Sequenz (A(7 - 16X)T), da dies in beiden Fragmenten enthalten war, mit Hilfe des USER-Enzym fusioniert werden (s. 2.2.1). In seltenen Fällen waren aber keine

geeigneten Adenine oder Thyminen vorhanden, diese wurden dann durch eine Stille Punktmutation etabliert. Die Punktmutation wurde mit in die Deletionsprimer eingebaut, und somit gleichzeitig eingebracht. Die Erstellung aller Punktmutation erfolgte, indem die betreffenden Codonsequenz im Gen, durch eine andere Codonsequenz bzw. einzelne AS in den Primern ausgetauscht wurden. Hierbei wurde beachtet, dass die zu Mutierenden Stelle bzw. Base im Primer links und rechts von drei bis sechs Genidentischen Basen flankiert waren, damit der Primer sich besser an das Ziel-Gen heftete. Anschließender Verdau der Deletions- bzw. Punktmutationsfragmente mit dem Restriktionsenzym DpnI eliminierte die Template-DNA. Für genauere Informationen siehe (Hetherington and Woodward 2003).

2.2.5 *In Vitro* Transkription (IVT)

Für die Expression von Proteinen in Oozyten von *Xenopus laevis* wurde cRNA (copy RNA) verwendet. Die Herstellung der benötigten cRNA erfolgte durch *in vitro* Transkription (AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kit, CELLSSCRIPT Inc.). Dabei wurde aus cDNA (copy DNA) mithilfe einer RNA-Polymerase cRNA erstellt. Die benutzte RNA-Polymerase stammt aus dem bakteriellen T7 Virus. Hierbei war zu beachten, dass vor der zu amplifizierenden cDNA Sequenz ein passender Promotor (T7-Promotor) für die RNA Polymerase eingebaut wurde. Als Template für die Herstellung der cRNA diente die aus der IVT PCR (2.2.3.1) erstellte cDNA. Im Folgenden ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes wiedergegeben.

Tabelle 2.2.5.1: Reaktionszusammensetzung für IVT.

cDNA Template	2,75 µl
10 X AmpliCap-Max T7 Transcription Buffer	1 µl
AmpliCap-Max Cap/NTP PreMix	4 µl
100 mM DTT	1 µl
ScriptGuard RNase Inhibitor	0,25 µl
AmpliCap-Max T7 Enzyme Solution	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 90 min inkubiert, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 7,5 M LiCl gestoppt, und über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächstens Tag wurde der Ansatz bei 4°C mit 15000 g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und nochmals für 10 min bei 4°C mit 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen, und das Pellet bei 37°C für 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl RNase freiem Wasser (BPC) aufgenommen. Nach einem erneuten Einfrier/Auftau Zyklus wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Des Weiteren wurde die RNA auf einem 1 %igen MEN-Agarosegel für 60 min bei 7 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit dem Intas UV Imager (Intas UV-Systeme) dokumentiert (2.2.7).

Beim Umgang mit cRNA wurde soweit möglich immer auf Eis und mit Handschuhen gearbeitet. Des Weiteren wurden RNase-freie Chemikalien, Geräte und Behälter verwendet.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die durch PCR und IVT hergestellte DNA und RNA wurde mittels photometrischer Messungen mit Hilfe des NanoDrop 2000c bestimmt.

Dabei erfolgte die Bestimmung der DNA und RNA Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$A = \epsilon * b * c$$

A = Absorption, **ε** = Extinktionskoeffizient in $l * mol^{-1} * cm^{-1}$ (für doppelsträngige DNA ca. 50 ng-cm/µl, RNA ca. 40 ng-cm/µl), **b** = Schichtdicke der durchstrahlten Probe in cm, **c** = Konzentration der durchstrahlten Probe in $mol * l^{-1}$

konnte aus der Absorption so auf die Konzentration rückgeschlossen werden. Nach Bestimmung der Konzentration wurden die RNAs auf Konzentrationen von 250 - 1000 ng /µl eingestellt (Abschnitt 2.2.8).

2.2.7 RNA-Gelelektrophorese

Zusätzlich wurde die Qualität der cRNA durch eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. 1µl RNA wurde mit 2µl Glyoxal-Lösung versetzt, gemischt und danach für 20 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 µl RNA-Probenpuffer hinzugegeben und die RNA wurde auf ein 1,5%iges MEN-Agarosegel aufgetragen und in 1x

MEN-Puffer, bei einer angelegten Spannung von 60-80 mV, elektrophoretisch aufgetrennt. Im Agarosegel selbst befand sich GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain, BIOTUM), durch welches das RNA Bandenmuster durch Fluoreszenzanregung bei 255 nm auf einem Imagereader (IntasUV Imager, Intas UV Systeme) sichtbar gemacht werden konnte¹. Zusammensetzung der Puffer und des Gels ist in Tabelle 2.2.7.1 wiedergegeben.

¹ Dies ist eine Fußnote, jede Doktorarbeit braucht mindestens eine. Diese hier ist zum Gedenken an Terry Pratchett. Wenn Sie, lieber Leser, diese gefunden haben, zeigen Sie wirklich Interesse an dieser Arbeit. Danke.

Tabelle 2.2.7.1 Medien für RNA-Gelelektrophorese.

10x MEN Puffer	MOPS (pH 7; NaOH)	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	5 mM
RNA Probenpuffer (1,3x)	Formamid	95 %
	Bromphenolblau 0,025 %	0,025 %
	Xylen cyanol	0,025 %
	EDTA	0,5 mM
1% MEN Agarosegel	Agarose	500 mg
	MEN Puffer (1x)	41 ml
	Formaldehyd	9 ml
	GelRed(10000x)	5 μ l

2.2.8 cRNA Injektion

49 μ l der gereinigten cRNA wurde mittels des Nanoject II Auto Nanoliter Injector (Drummond) in Oozyten eingebracht. Hierzu wurden zunächst Kapillaren (Drumond #3-00-203-G/X, Drumond Scientific Company) mit einem Kapillarenzieher (pp-83, Narishige) zu Mikropipetten ausgezogen und anschließend unter einem Mikroskop an einem Draht abgebrochen. Hierdurch entstanden Kapillaren mit kleinen (\emptyset = ca. 2 μ m) und scharfkantigen Öffnung, die sich sehr gut zum Injizieren eigneten. Die Konzentration der cRNA betrug für AtALMT12/QUAC1 und dessen Mutanten 1000 ng/ μ l, Kinasen wie OST1 wurden mit 250 ng/ μ l injiziert. Die injizierten Oozyten wurden 3 - 4 Tage bei 17°C aufbewahrt und anschließend elektrophysiologisch und/oder fluoreszenztechnisch untersucht.

2.3 Präparation von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Oozyten von *X. laevis* wurden von Tieren aus der eigenen Froschhaltung bezogen. Da die Oozyten nicht durch Ablachen gewonnen werden konnten, wurden die Tiere in einem halbjährlichen Zyklus operiert. Hierzu wurden die weiblichen Frösche mit einer 0,75 g/l Lösung Tricain-methansulfonat (MS-222 / Sigma) für 15 min betäubt. Für weitere 15 min wurde zusätzlich Eis mit in die Lösung gegeben, um den Kreislauf der Tiere weiter abzusenken. Die Frösche wurden als ausreichend narkotisiert betrachtet, wenn der Bauchdrehreflex ausgeschaltet war. Für die Operation wurde gereinigtes und sterilisiertes OP-Besteck verwendet. Die Tiere wurden während der OP auf Eis in Tricain getränkte Tücher gebettet, um ein Austrocknen zu verhindern und weiterhin eine Betäubung zu gewährleisten. Für die Entnahme der Oozyten wurde ein longitudinaler Schnitt von 1 cm Länge im unteren äußeren Bauchbereich der Tiere, knapp oberhalb der Hinterbeine durchgeführt (Abbildung 2.3.1 A). Nach durchtrennen der Oberhaut, wurde die darunterliegende Bauchdecke durchtrennt, wodurch man sofort Zugang zu den Ovarien der Tiere bekam (Abbildung 2.3.1 B). Den Tieren wurden mithilfe einer Pinzette einzelne Ovarlappen entnommen, und mit einer Schere abgetrennt (Abbildung 2.3.1 C). Die entnommenen Lappen wurden in ND69⁺ Lösung aufbewahrt. Die verbliebenen Teile des Ovars wurden zurück in die Bauchhöhle der Tiere verbracht. Anschließend wurde die Bauchdecke und Oberhaut mit Nadel und Faden (SILKAM 5 / 0 Braun,) verschlossen. Dies erfolgte durch einen Stich in der Bauchdecke und mit drei Stichen in der Oberhaut (Abbildung 2.3.1 D). Nach dem Aufwachen der Tiere in einem Einzelbecken, wurden diese zurück in die Hauptbecken überführt.

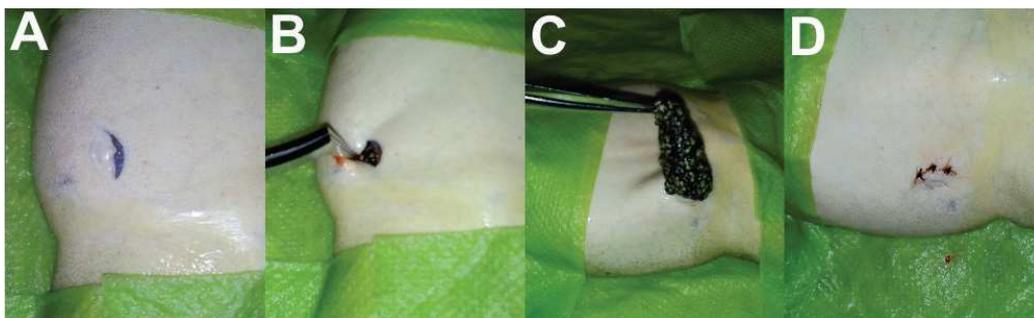


Abbildung 2.3.1: Operation von *X. laevis* zur Oozytengewinnung. (A) Ventral Seite von *X. laevis* mit longitudinalen Schnitt oberhalb der Hinterbeine. (B) Ovarien in der Bauchhöhle nach Durchtrennen der Bauchdecke. (C) Entnahme der Ovarien mit Pinzette. (D) Naht der durch die OP verursachten Wunde.

Die gewonnenen Oozyten wurden zunächst unter einem Binokular mechanisch mithilfe von Uhrmachpinzetten in Gruppen von 20 Oozyten separiert, dreimal mit Kalziumfreier ND96

Lösung (ND96⁻) gewaschen, und für 90 min in ND96⁻ mit Collagenase NB 4G (2mg/ml; 0,263 units/mg, Serva) verdaut. Nach dem Collagenaseverdau wurden die Oozyten mehrmals mit ND96⁺ gewaschen. Dies diente dazu Collagenase sowie Ovargewebe und Follikelzellen von den Oozyten zu entfernen, da diese Zellbestandteile langsamer absanken als die reifen Oozyten. Im Anschluss wurden gesund aussehende Oozyten des Stadiums V und VI (Methods in Molecular Biology (322), Xenopus Protocols - Cell Biology and Signal Transduction, Chapter 2 - 4, 2006) aussortiert und für die RNA Injektion verwendet. Die Lagerung der Oozyten erfolgte bei 17 °C in ND96⁺ Lösung.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie und Kolokalisation

Um die Expression von QUAC1 in Oozyten zu überprüfen, wurde neben dem elektrophysiologischen Ansatz auch fluoreszenzmikroskopisch gearbeitet. Dabei wurden QUAC1 und dessen Mutanten N- und C-terminal mit YFP bzw. GFP fusioniert. Hierdurch konnte direkt die Expression in Oozyten gezeigt werden.

Weiterhin wurde die Interaktion von QUAC1 mit anderen Proteinen wie OST1 untersucht. Hierzu wurde die **Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation** (*engl. Bimolecular Fluorescence Complementation*) (**BIFC**) verwendet. Dabei wurden die C- und N-terminalen Hälften von YFP an die zu Untersuchenden Proteine fusioniert. Beide Hälften des Fluorophors können alleine nicht fluoreszieren. Nur wenn die beiden zu untersuchenden Proteine durch Interaktion in unmittelbare Nähe zueinander traten, konnte eine Zusammenlagerung und Komplementation des Fluorophors stattfinden. Dies wiederum führte zu einem wahrnehmbaren Fluoreszenzsignal.

2.4.1 BIFC und YFP/GFP Detektion

Bilder von Fluorophor exprimierenden *X. laevis* Oozyten wurden mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scannig Mikroskops (Leica TCS SP5) aufgenommen. Die Anregung von YFP und YFP-BIFC erfolgte bei 514 nm, die Emission der YFP Fluoreszenz wurde zwischen 525 nm und 600 nm aufgenommen. Für eGFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, die Emission wurde zwischen 500 nm und 555 nm aufgezeichnet. Die Bilder wurden mit Auflösungen von 512x512 und 1024x1024 aufgenommen.

2.4.2 Lokalisation des N- und C-Terminus von QUAC1

YFP ist pH sensitiv und zeigt unter verschiedenen pH Bedingungen unterschiedliche Absorptions- und Emissionspektren (Young, Wightman et al. 2010). Diese Eigenschaft wurde genutzt um die Lokalisation des C- und N-Terminus von QUAC1 zu bestimmen. Hierzu wurde

QUAC1 N- und C-terminal mit YFP (Venus, Riken Brain Science Institute, Saitama, Japan) fusioniert und in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert bzw. YFP::SLAC in Gegenwart mit CPK23 als Kontrolle. 24 Stunden vor Aufnahme der Bilder wurden die Oozyten in ND96⁺ pH 6 aufbewahrt. Die Oozyten wurden dann in eine Perfusionskammer überführt, die mittels eines Deckglases und Vaseline abgedichtet wurde. Anschließend erfolgte eine schrittweise Perfusion mit ND96⁺ pH 7,2 für 10 min, ND96⁺ pH 5,6 für 10 min und ND96⁺ pH 5,6 versetzt mit 20 mM Natriumacetat für 15 min. Während des gesamten Vorgangs wurden alle 30 sec Bilder mittels eines konfokalen Laser Scannig Mikroskops (Leica TCS SP5). aufgenommen. Die Anregung von YFP erfolgte bei 514 nm, die Emission der YFP Fluoreszenz wurde zwischen 520 nm und 540 nm aufgenommen.

2.5 Two Electrode Voltage Clamp (TEVC)

Die Two Electrode Voltage Clamp (TEVC) oder auch Zwei Elektroden Spannungsklemme ist eine minimalinvasive Methode mit der Ströme von Zellen abgeleitet werden können. Zusammen mit der Zusammensetzung der Badlösungen lassen sich Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Stromleitenden Kanäle ziehen. Sie wurde Anfang der 50er Jahre von mehreren Wissenschaftlern beschrieben (Cole 1949; Hodgkin, Huxley et al. 1949; Marmont 1949; Hodgkin, Huxley et al. 1952). Erste Experimente wurden an Tintenfisch-Axonon durchgeführt. Später wurde die TEVC zusammen mit dem heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten (Gurdon, Lane et al. 1971) kombiniert und wurde eine Standardmethode der Elektrophysiologie (Finkel and Gage 1985).

2.5.1 Definition von Stromrichtung, Einwärts- und Auswärtsstrom

Das extrazelluläre Potential der Zelle wird laut Konvention auf den Wert Null gesetzt. Ein Einstrom von Anionen in die Zelle bzw. ein Ausstrom von Kationen in den extrazellulären Raum entspricht demnach einem positiven elektrischen Strom. Ein Einstrom von Kationen in die Zelle und ein Ausstrom von Anionen in den extrazellulären Raum, entsprechen einem negativen elektrischen Strom. Da die beiden Begriffe „Einstrom“ und „Ausstrom“ in der Elektrophysiologie vor allem durch die Charakterisierung von Kationenkanälen geprägt sind, werden sie auch meist in diesem Bezug verwendet. Wird von einem Auswärtsstrom gesprochen ist ein positiver Strom bei positiven Spannungen gemeint. Ein negativer Strom bei negativen Spannungen hingegen wird als Einwärtsstrom bezeichnet (Zimmermann, Thomine et al. 1994). So handelt es sich bei den in Abbildung 2.5.1.1 gezeigten Strömen bei -120 mV und -180 mV um Einwärtsströme (obwohl Anionen aus der Zelle fliesen!). Die Ströme bei +40 mV hingegen sind Auswärtsströme (Anionen fliesen aber in die Zelle).

In dieser Arbeit werden des Weiteren die Begriffe **Aktivierung**, **Deaktivierung** und **Inaktivierung** häufig verwendet.

Unter **Aktivierung** (Abbildung 2.5.1.1 a) versteht man, das Öffnen des Kanals durch ein extrinsisches Signal wie z.B. Spannung, Licht oder Liganden. Durch das Öffnen des Kanals werden Ionen befördert, dies kann in Strom/Zeitdiagrammen in der zeitabhängigen Zunahme der Ströme beobachtet werden. Als Beispiele seien hier die Spannungsabhängigen Kaliumkanäle der Shaker-Familie erwähnt. Sie besitzen einen Spannungssensor (S4 Domäne), welcher das elektrische Feld bzw. die Membranspannung der Zelle wahrnimmt (Dietrich, Sanders et al. 2001). Hyperpolarisiert die Zellmembran sorgt der Spannungssensor für eine Konformationsänderung des Kanalproteins wodurch dann Ionen durch den Kanal fließen können. Eine Konformationsänderung kann auch durch Ligandenbindung an einen Kanal erfolgen, wie es z.B. für Kalium-Einwärtsgleichrichter aus dem Tierreich und PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) der Fall ist.

Unter **Deaktivierung** (Abbildung 2.5.1.1 b) versteht man, das Schließen eines Kanals durch wegfallen oder umkehren des externen Stimulus. Durch das Schließen des Kanals können keine Ionen mehr befördert werden, dies kann in Strom/Zeitdiagrammen in der Abnahme der Ströme beobachtet werden. Als Beispiele sein hier wieder spannungsgesteuerte und ligandengesteuerte Kanäle erwähnt. Bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen der Shaker-Familie führt eine Repolarisation oder Umkehren der Membranspannung, welche wieder über den Spannungssensor S4 wahrgenommen wird, zu einer Konformationsänderung im Protein, welche den Fluss der Kationen durch den Kanal unterbindet. Auch wenn PIP₂ nicht mehr an die erwähnten ligandengesteuerten Kaliumeinwärtsgleichrichter bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung und dem Schluss des Kanals.

Ein der Deaktivierung ähnlicher Prozess ist die **Inaktivierung**; hierbei ist ebenfalls eine Abnahme der Ströme in den in Strom/Zeitdiagrammen zu verzeichnen. Der wesentliche Unterschied zur Deaktivierung ist jedoch, dass diese Abnahme stattfindet, obwohl das aktivierende externe Signal noch vorhanden ist.

Ein Beispiel hierfür ist die Inaktivierung der Natriumkanäle in Nervenzellen (Hodgkin, Huxley et al. 1949; Hodgkin and Katz 1949). Nach Aktivierung durch Depolarisation sind diese Kanäle geöffnet. Auch wenn der Stimulus bestehen bleibt, nehmen jedoch die Ströme nach kurzer Zeit wieder ab. Als Erklärungsmodell wird davon ausgegangen, dass die immer noch geöffnete Kanalpore durch eine Struktur des Kanals blockiert wird. Dieses Verhalten wurde an Shaker-

Kanälen untersucht und ist auch als N-terminale Inaktivierung oder dem Begriff „Ball and Chain inactivation“ bekannt. Hierbei wird von einem positiv geladen Aminosäure-Ball (bestehend aus 19 AS) ausgegangen, welcher an einer Aminosäure-Kette (60AS) hängt und die Pore blockieren kann (Aldrich 2001; Zhou, Morais-Cabral et al. 2001).

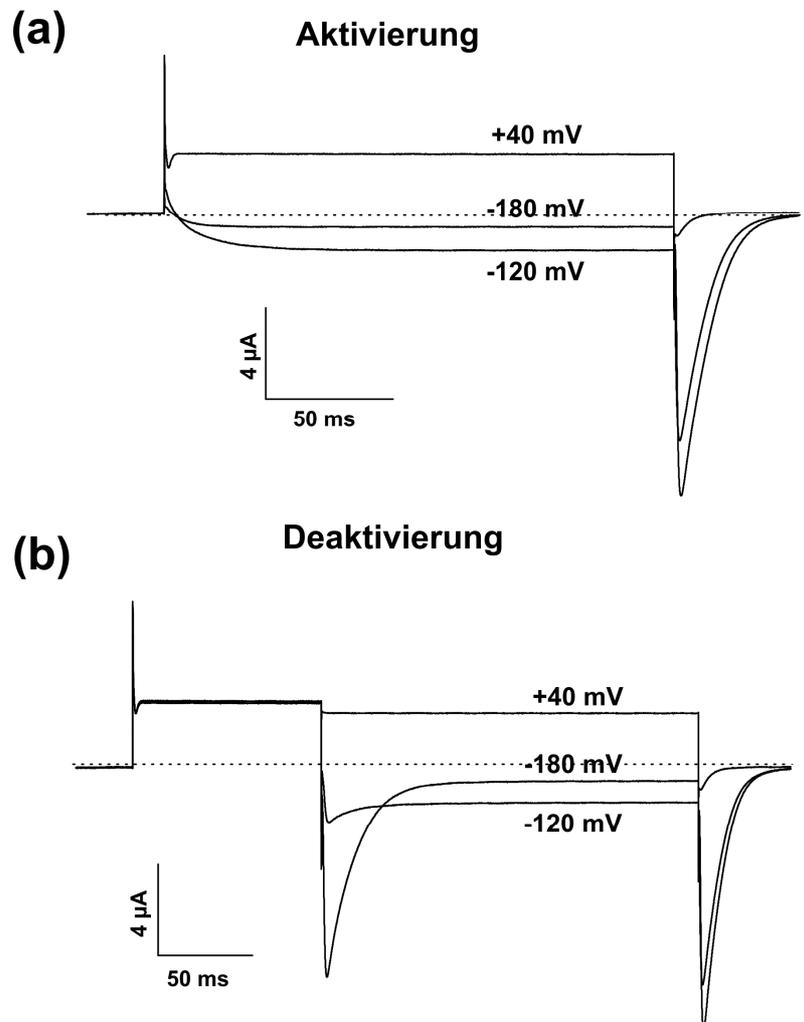


Abbildung 2.5.1.1: Strom/Zeitdiagrammen der Aktivierung und Deaktivierung von QUAC1. In (a) ist bei +40 mV eine schnelle Aktivierung zu sehen, der Stromwert steigt schnell (sprunghaft) von seinem Ausgangswert zu seinem Endwert. Bei Spannungen von -120 mV und -180 mV ist eine langsamere, aber länger anhaltende, Aktivierung zu sehen. In (b) ist nach einem aktivierenden Puls von +60 mV die Deaktivierung der Ströme nach Spannungssprüngen zu +40 mV, -120 mV und -180 mV zu erkennen. Besonders stark ausgeprägt ist die Deaktivierung bei dem Spannungssprung zu -180 mV.

2.5.2 Methodischer Aufbau und Ablauf

QUAC1 exprimierende Oozyten wurden mittels der TEVC Methode untersucht. Hierbei wird das Membranpotential der Oozyten auf eine vorgegebene Spannung geklemmt (Voltage Clamp) und die durch den Kanal (QUAC1) hervorgerufenen makroskopischen Ströme

aufgezeichnet. Die Oozyte befindet sich in einer Kammer und wird mit Messlösung perfundiert. Die Perfusion erfolgt durch hydrostatischen Druck, dabei wurden 50 ml Spritzen (Braun) als Lösungsreservoir verwendet. Die Geschwindigkeit der Perfusion, kann durch unterschiedlich hohe Aufhängung der Spritzen reguliert werden. Mit Hilfe einer Stereolupe (Leica) und zweier Mikromanipulatoren (Marzhauser MM33), werden zwei Micro-Glaskapillaren in die exprimierende Oozyte eingestochen. Die Kapillaren, werden aus Borsilikatglaskapillaren (KWIK-FILTM, World Percision Instruments Inc., USA) gezogen und sind mit 3M KCl Lösung gefüllt, und enthalten einen chlorierten Silberdraht der als Elektrode fungiert. Des Weiteren befindet sich im Badmedium eine Badelektrode die zum Abgleich mit dem selbigen dient. Die Badelektrode besteht aus einem mit 3M KCl befüllt Schlauch der einseitig mit einem 1,5% Agarosepfropfen (3M KCl) verschlossen ist. Auch hier wird ein Silberdraht als Elektrode verwendet.

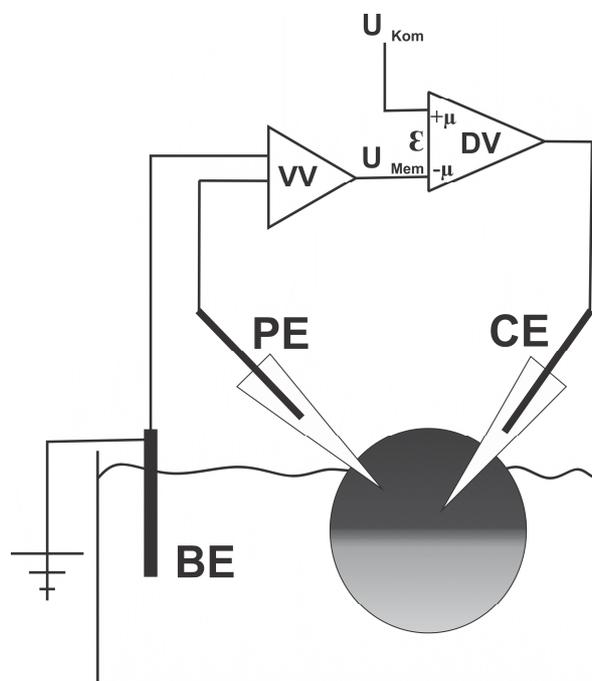


Abbildung 2.5.2.1: Schematischer Aufbau der TEVC Messung. Das Membranpotential (U_{Mem}) der Oozyte wird mit Hilfe der Potentialelektrode (PE) und des Vorverstärkers (VV) gemessen. Die Vorgegebene Kommandospannung (U_{Kom}) wird über den Differentialverstärker (DV) mit der Membranspannung verglichen.

Die Differenzspannung wird als Ladung über die Stromelektrode (CE) in die Oozyte injiziert und die, gewollte Spannung so erreicht. (BE) = Badelektrode.

Eine der beiden Glaskapillaren dient als Spannungselektrode (*eng.* potential electrode / PE), die andere als Stromelektrode (*eng.* current electrode / CE). Über den Vorverstärker (VV) wird mit Hilfe der Spannungselektrode sowie der Badelektrode die Membranspannung der Zelle (Oozyte) ermittelt. Die gemessene Membranspannung (U_{Mem}) wird mit Hilfe eines Differentialverstärkers (DV) mit der vorgegebenen Kommandospannung (U_{Kom}) verglichen.

Der Differenzbetrag der Spannung ($U_{\text{Kom}} - U_{\text{Mem}}$) wird in einen Stromwert umgerechnet ($U=R \cdot I$). Mittels der Stromelektrode wird so viel Ladung in die Oozyte injiziert bis die Kommandospannung erreicht ist (Abbildung 2.5.2.1). Die Spannungselektrode als auch die Badelektrode werden möglichst nahe an der Oozytenmembran platziert. Im Fall der Spannungselektrode, wird dies durch ein seichtes einstechen der Oozytenmembran erreicht. Die Stromelektrode hingegen wird möglichst mittig in der Oozyte platziert, um eine gleichmäßige Polarisierung zu erreichen.

2.5.3 Datenanalyse

Die des Vorverstärker aufgezeichneten Daten wurden an den Messverstärker (Turbo TEC 10X, NPI electronic, Tamm) geleitet. Die so registrierten analogen Signale des Messverstärkers wurden weiter an einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, Instrutech Corporation, New York, USA) gesendet, digitalisiert und für den Messrechner lesbar gemacht. Die durch TEVC gewonnen Daten wurden dann mittels der Software Patch Master (HEKA, Lambrecht/Pfalz) aufgezeichnet. Anschließend wurden die Daten im ASCII Format exportiert und mit dem Statistikprogramm OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton/USA) ausgewertet. Hierbei erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittels, der Standardabweichung und des Standardfehlers. Anschließend wurden die Daten grafisch in Origin aufgearbeitet.

Zur Untersuchung der R-Typ Eigenschaften von QUAC1 wurde ein Pulsprotokoll verwendet, welches aus einer Serie von depolarisierten Pulsen von +60 mV zu -200 mV bestand. Nach jedem Durchlauf wurde die Spannung um -10 mV bzw. -20 mV gesenkt. In näherer Betrachtung heißt das, dass von einer Haltespannung von -20 mV ein Spannungssprung auf -200 mV für 50 ms erfolgte, gefolgt von einem Aktivierungspuls von +60 mV für 100 ms. Anschließend folgte das Pulsprotokoll von +60 mV zu -200 mV für 500 ms. Danach wurde ein nochmaliger

Spannungssprung auf -200 mV für 50 ms ausgeführt um dann wieder zurück zur Haltespannung von -20 mV zurückzukehren (Abbildung 2.5.3.1).

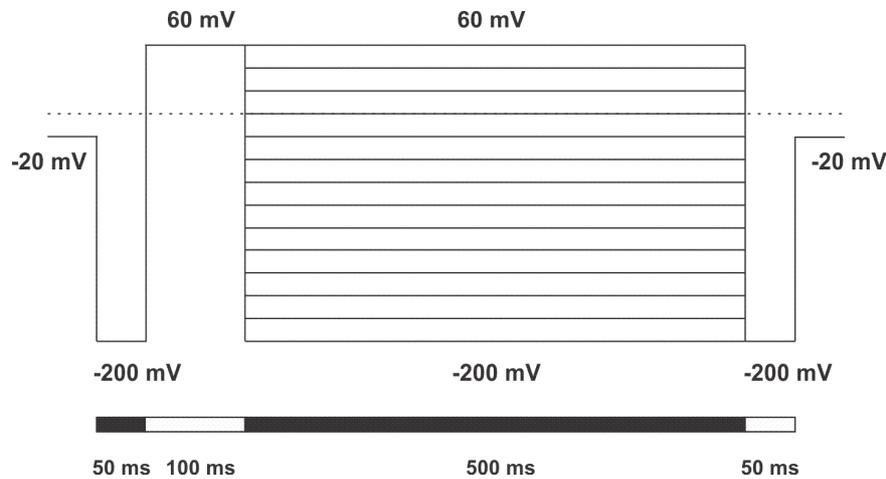


Abbildung 2.5.3.1: Pulsprotokoll zum Bestimmen der von QUAC1 verursachten Ströme. Die durchgehenden Linien geben die jeweils angelegte Spannung an (Siehe Zahlen zur Orientierung) Die gestrichelte Linie gibt 0 mV Spannung an. Die schwarz weiße Skala zeigt die jeweilige Dauer des über ihr liegenden Pulses an.

Zum Charakterisieren und Vergleichen von QUAC1 und seinen Mutanten wurden unterschiedliche Ströme abgegriffen. Diese waren die Gleichgewichtsströme (*engl.* Steady-State-Ströme (I_{ss})) sowie die instantanen Ströme (I_{inst}). Die instantanen Ströme wurden nach dem Aktivierungspuls, nachdem der Sprung zu einer depolarisierteren Spannung erfolgt war, abgegriffen (Abbildung 2.5.3.2). Da die Spannungssprünge schneller erfolgen, als der Kanal reagieren konnte, konnten aus diesen Strömen das Umkehrpotential (U_{rev}) ermittelt werden. Die Steady-State-Ströme hingegen wurden in der Plateauphase nach dem Sprung zu einer der Testspannung aufgenommen (Abbildung 2.5.3.2). Des Weiteren wurden die Tail-Ströme (I_{tail}) aufgezeichnet um die Offenwahrscheinlichkeit (P_0) zu berechnen. Diese wurden abgegriffen nachdem ein Spannungssprung zu -200 mV , nach der vorangegangenen Plateauphase der Testpulse, erfolgte (Abbildung 2.5.3.2).

Die Gleichgewichtsströme einer Zelle (I_{ss}) werden durch die Anzahl der Kanäle (N), deren Einzelkanallstrom (i) und deren Offenwahrscheinlichkeit (P_0) bestimmt.

$$I_{SS}(U, t) = N + i(U) + P_0(U, t)$$

Die Anzahl der exprimierten Kanäle in der Zelle kann zum Zeitpunkt der Messung als konstant angesehen werden. Da bei der Messung der Tail-Ströme immer zu einer konstanten Spannung (-200 mV) gesprungen wurde, ist davon auszugehen, dass der spannungsabhängige Einzelkanalstrom $i(U)$ ebenfalls konstant war. Da die durchgeführten Spannungssprünge schneller erfolgen, als der Kanal reagieren kann, ist davon auszugehen, dass die Tail-Ströme direkt nach dem Spannungssprung zu -200 mV die Offenwahrscheinlichkeiten wiedergeben.

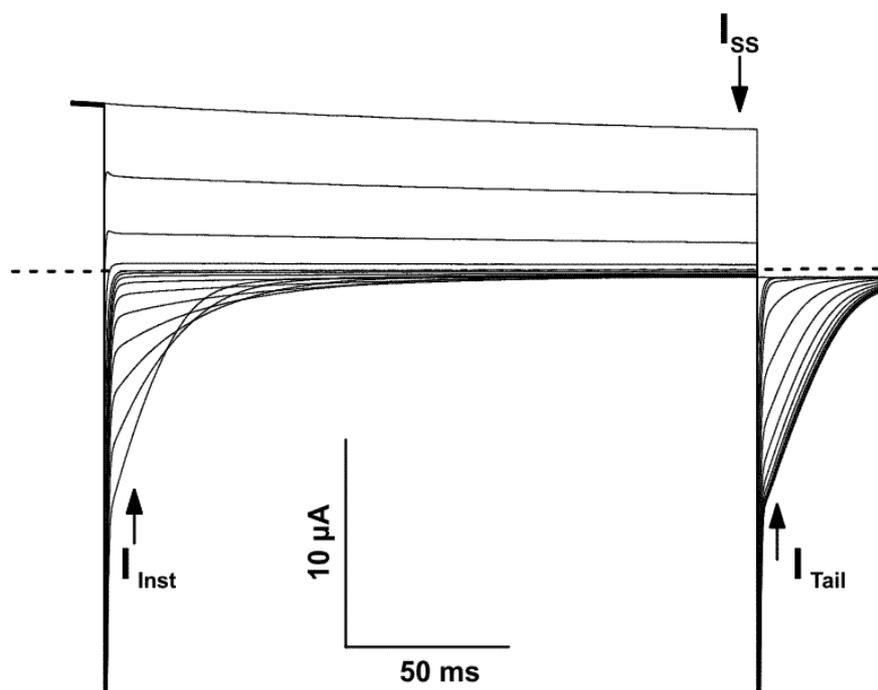


Abbildung 2.5.3.2: Ströme die zur Charakterisierung von QUAC1 verwendet wurden. Die durchgehenden Linien geben die jeweilige Stromantwort auf eine angelegte Spannung an. Die gestrichelte Linie gibt den 0 A Strom an. Die instantanen Ströme (I_{inst}) werden am Anfang des schrittweisen Spannungssprungprotokolls abgegriffen, die Gleichgewichts / Steady-State-Ströme (I_{ss}) erst in der Plateau Phase des Selben. Des Weiteren wurden die Tail Ströme (I_{tail}) aufgezeichnet um die Offenwahrscheinlichkeit (P_0) zu berechnen. Dies geschah nach dem schrittweisen Pulsprotokoll, und zum Sprung zu -200 mV.

Für die Auswertung und Darstellung der Offenwahrscheinlichkeit (P_0) wurde wie folgt vorgegangen. Die in Abbildung 2.5.3.2 beschriebenen Tail Ströme wurden sofort nach dem zweiten Spannungssprung zu -200 mV (50 ms) abgegriffen (Abbildung 2.5.3.1). Aus diesen

sigmoiden Kurven musste zunächst eine gemittelte Kurve gebildet werden. Hierzu wurden die aus Patch Master erhaltenen Rohkurven einzeln einem Boltzman-Fit unterzogen, um den Minimalwert (A1) zu erhalten. Anschließend wurde von den Rohkurven der Minimalwert subtrahiert. Dies diente dem angleichen der Kurven (alle Kurven laufen bei ihrem Plateau durch Null). Danach erfolgte ein erneuter Boltzman-Fit der angepassten Kurven, diesmal um den Maximalwert (A2) zu erlangen. Die mit A1 subtrahierten Kurven wurden dann durch den negativen Maximalwert geteilt ($-A2$). Hierdurch wurden die Kurven normiert. Aus den so nivellierten und normierten Kurven, wurde für die einzelnen Messpunkte ($\mu\text{A} / \text{mV}$) nun das arithmetische Mittel gebildet, so dass eine einzige Kurve entstand. Diese gemittelte Kurve wurde dann ein letztes Mal einem Boltzmann-Fit unterzogen.

2.5.4 Medienzusammensetzung

Zur Untersuchung von QUAC1 wurde ein malathaltiges und chloridhaltiges Standardmedium verwendet. Soweit nicht anders bei den Experimenten angegeben, war die Zusammensetzung wie folgt: 10 mM MES/Tris, pH 5,6, 1 mM CaGluconat₂, 1 mM MgGluconat₂, 1 mM LaCl₃, und 25 mM NaHMalat oder 25 mM NaCl. Die Lösung wurde dann mit D-Sorbitol auf eine Osmolarität von 220 mosmol kg⁻¹ eingestellt.

3 Ergebnisse

Die beim Stomaschluss auftretenden R-Typ Ströme waren lange Zeit bekannt und konnten gut *in planta* beschrieben werden (Keller, Hedrich et al. 1989; Hedrich, Busch et al. 1990; Marten, Zeilinger et al. 1992). Sie zeichnen sich durch eine starke Spannungsabhängigkeit und schnelle Deaktivierung aus (Marten, Zeilinger et al. 1992; Kolb, Marten et al. 1995). Durch die Spannungsabhängigkeit bilden sie einen typischen glockenförmigen Verlauf in Stromspannungsdiagrammen aus (Abbildung 3.1). Die dort auftretenden Peak Ströme werden von Malat moduliert, und verschieben sie hin zu Hyperpolarisierten Spannungen (Hedrich and Marten 1993). Jedoch war die Identität der R-Typ Ströme verursachenden Kanäle lange ungewiss. Mehrere Kandidaten wurden als Ursprung dieser Ströme vorgeschlagen (CFTR, CLCs, AtTMEM16a)(Abschnitt 1.5.2). In Kooperation mit Meyer (Meyer, Mumm et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass AtALMT12 in der Plasmamembran der Schließzellen lokalisiert ist. Gaswechselfmessungen von AtALMT12 k.o.-Mutanten (*almt12-1*, *almt12-2*) aus *Arabidopsis* Pflanzen hatten höhere Verdunstungsraten bei hell/dunkel Transition als der entsprechende WT. Zudem besaßen *almt12-1* und *almt12-2* einen langsameren und unvollständigen Stomaschluss auf ABA-Gabe. Dies zeigt eine regulierende Funktion von ALMT12 beim Stomaschluss. Wie später in Zusammenarbeit mit Mumm (Meyer, Mumm et al. 2010) gezeigt wurde, hatten Schließzellprotoplasten von AtALMT12 k.o.-Mutanten geringere R-Typ Ströme, im Vergleich zu Kontrollprotoplasten (Abbildung 3.1). Diese Ergebnisse unterstützen stark die Hypothese, dass ALMT12 zumindest einen Teil der R-Typ Ströme hervorruft. In Analogie zu den SLAC (Slow Anion Channel) Kanälen des S-Typs wird deswegen für diesen potentiellen R-Typ Kanal der Name QUAC1 (Quick Anion Channel) vorgeschlagen. In dieser Arbeit wurde das QUAC1/ALMT12 Protein isoliert in Oozyten charakterisiert, um eine Verbindung zu den R-Typ Strömen zu belegen. Durch die Versuche *in planta* als auch in Oozyten ergibt sich somit ein umfassendes Bild.

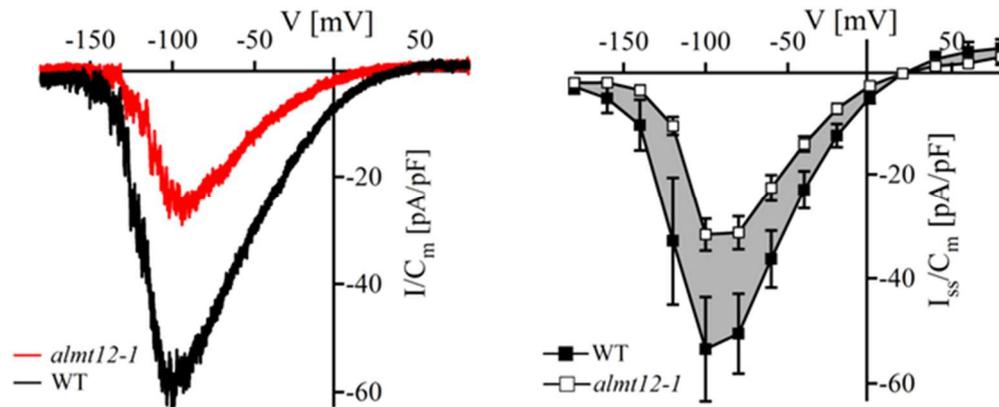


Abbildung 3.1: Spannungsabhängiges Verhalten der R-Typ Ströme in Wildtyp und *almt12-1* Arabidopsis Schließzellprotoplasten. (links) repräsentative R-Typ Stromantwort auf eine Spannungsrampe von +70 mV zu -180 mV (*almt12-1* in rot, Wildtyp in schwarz). (rechts) Stromdichte der Gleichgewichtsströme (I_{ss}) aufgetragen gegen die angelegte Spannung. Eine starke Reduktion der R-Typ Ströme ist in der Mutante *almt12-1* zu erkennen. Messungen wurden in Anwesenheit von 20 mM externen Malat durchgeführt. Datenpunkte geben die Mittelwerte \pm den Standardfehler für $n = 6$ Experimente wieder. Messungen wurden von Patrick Mumm durchgeführt. Abbildung wurde (Meyer, Mumm et al. 2010) entnommen und verändert.

3.1 Fluoreszenzmikroskopie bestätigt transiente QUAC1 Expression in Oozyten

Zur Überprüfung der Expression von QUAC1 in Oozyten wurde ein Fluoreszenz-basierter Ansatz gewählt. Die cDNA des Proteins wurde mit der kodierenden Sequenz des fluoreszierenden Proteins YFP gekoppelt, so dass nach der Expression in Oozyten eine translationale Fusion entstand. Nach drei Tagen Expressionszeit wurden die Oozyten unter einem Laser Scanning Mikroskop (LSM) betrachtet, und das YFP mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. In Abbildung 3.1.1 b + c ist eine YFP-Fluoreszenz auf Höhe des Äquators der injizierten Oozyten zu sehen. Sowohl eine N-terminale Fusion mit YFP (YFP::QUAC1), als auch eine C-terminale Fusion von YFP (QUAC1::YFP) mit dem Kanalprotein führte zu einer Expression der Fusionsprodukte (Abbildung 3.1.1 b + c). Oozyten welche QUAC1 ohne YFP-Marker exprimierten zeigten keine Fluoreszenz (Abbildung 3.1.1 a). Durch die in Abbildung 3.1.1 aufgeführten Experimente konnte eine grundsätzliche Expression von QUAC1 in der Oozytenperipherie nachgewiesen werden. Ob der Kanal tatsächlich in der Oozytenmembran lokalisiert ist, sollten Untersuchungen von QUAC1 mit der Zwei Elektroden Spannungsklemmentechnik (TEVC) zeigen.

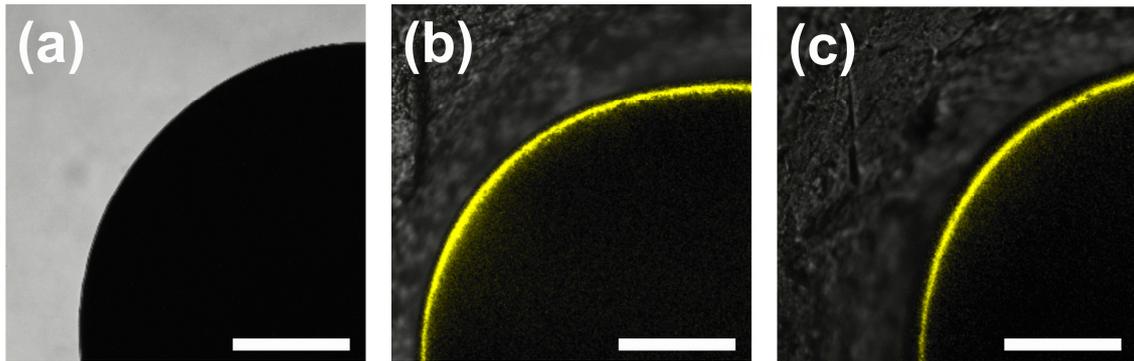


Abbildung 3.1.1: Exemplarische Fluoreszenzmessungen von QUAC1 exprimierenden Oozyten. (a) QUAC1 Expression ohne YFP Marker, (b + c) zeigen die Expression von QUAC1 mit gekoppeltem YFP; (b) YFP::QUAC1 und (c) QUAC1::YFP. Sowohl in (b) als auch in (c) ist eine Floreszenz von YFP in der Oozytenperipherie zu erkennen, welche nicht in den Kotrollen (a) auftrat. Die Skalen entsprechen 250 µm.

3.2 QUAC1 Ströme korrelieren mit externer Chloridkonzentration

Wie die Arbeit von Meyer *et al.* (Meyer, Mumm *et al.* 2010) zeigt, lokalisiert AtALMT12/QUAC1 in der Plasmamembran von Schließzellen. Zudem belegten Gaswechsel Messungen in ALMT12 k.o.-Mutanten einen langsameren Stomaschluss. Deshalb wurde vermutet, dass QUAC1 ein R-Typ Kanal der Schließzellmembran ist und eine wichtige Rolle beim Stomaschluss spielt (Meyer, Mumm *et al.* 2010). Des Weiteren wurden in der Literatur bereits die Eigenschaften einzelner ALMT-Familienmitglieder mit einer Anionen Leitfähigkeit in Verbindung gebracht (Yamaguchi, Sasaki *et al.* 2005; Ligaba, Katsuhara *et al.* 2006; Kobayashi, Hoekenga *et al.* 2007; Kovermann, Meyer *et al.* 2007; Motoda, Sasaki *et al.* 2007; Pineros, Cancado *et al.* 2008). Aus diesen Gründen sollte eine Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von QUAC1 in *Xenopus* Oozyten zeigen, ob QUAC1 tatsächlich für den lange gesuchten R-Typ Kanal kodiert.

QUAC1 wurde für drei Tage in *X. laevis* Oozyten exprimiert. Mithilfe der TEVC Methode sollten die elektrischen Eigenschaften, wie z.B. die Aktivierungskinetik, Deaktivierungskinetik, die rel. Permeabilität, etc. bestimmt werden und mit den bekannten R-Typ Strömen aus Schließzellen verglichen werden. Hierzu wurde das in Abbildung 2.5.3.1 beschriebene Pulsprotokoll verwendet. Das Spannungsprotokoll bestand aus 14 aufeinander folgenden Durchläufen. Vor dem aktivierenden Puls von +60 mV wurde das Membranpotential auf -200

mV geklemmt, ein typisches Ruhemembranpotential von Arabidopsis Schließzellen. Daraufhin folgte das Testspannungssegment indem von 60 mV bis -200 mV die Spannung bei jedem Durchlauf in 20 mV Schritten erniedrigt wurde. Nach den unterschiedlichen Testpulsen wurde wiederum ein Spannungspuls von -200 mV angelegt.

Die ersten TEVC-Versuche wurden in chloridhaltigen Medien durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigten Wasser injizierte Kontrollloozyten keine makroskopischen Stromantworten (Abbildung 3.2.1 rechts). Interessanterweise führte jedoch ein aktivierender Spannungspuls von +60 mV zu einer reproduzierbaren Stromantwort bei QUAC1 exprimierenden Oozyten. Es konnten rasch zunehmende Auswärtsströme (positive Ströme) beobachtet werden, die bei anhaltender Depolarisation der Oozytenmembran langsam abnahmen (Abbildung 3.2.1 links, 3.2.2). Im Testspannungsbereich konnte bei zunehmend hyperpolarisierenden Spannungen eine starke und schnelle (im ms Bereich) Deaktivierungskinetik beobachtet werden. Die zunächst instantan auftretenden Ströme (I_{Inst}) relaxierten schnell in einen Gleichgewichtsstrom (I_{ss}), der sich bei negativen Spannungen nahe bei 0 befand (Abbildung 3.2.1 links, 3.2.2 b als auch 2.5.3.2).

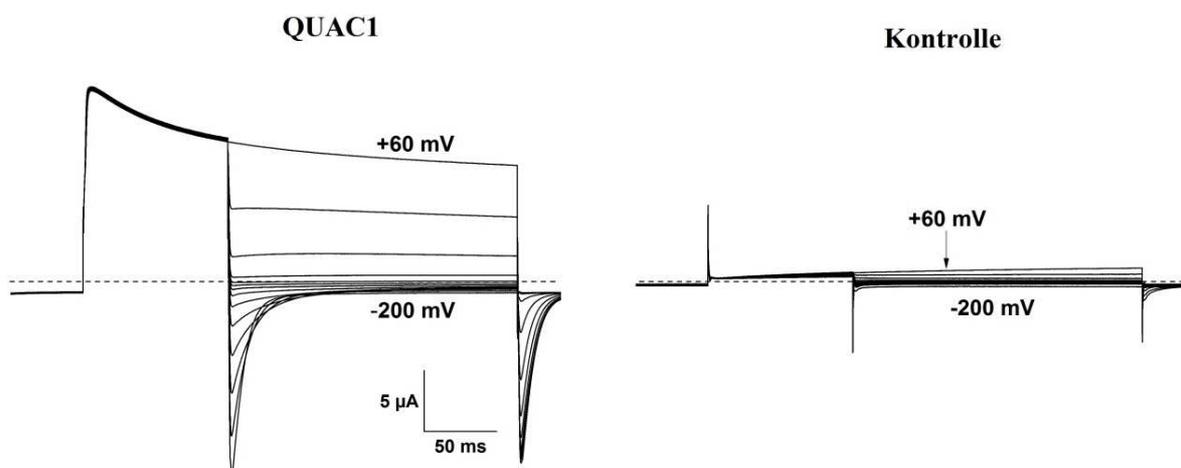


Abbildung 3.2.1: QUAC1 exprimierende Oozyten zeigen makroskopische Ströme in Chloridmedien. Dargestellt sind exemplarische Kinetiken von QUAC1 exprimierenden Oozyten und Kontrollloozyten in Anwesenheit von Chlorid im Außenmedium. Oozyten wurden nach drei Tagen Expression nach dem oben und in Abschnitt 2 beschriebenem Protokoll vermessen. Kontrollloozyten wurde Wasser an Stelle von RNA injiziert. Die obigen Messungen wurden in Anwesenheit von 100 mM NaCl im Außenmedium durchgeführt. Die gepunktete Linie stellt die Nullstromlinie dar.

Um die Auswirkung der verwendeten Anionen in der Messlösung zu untersuchen, wurden die Stromantworten von QUAC1 exprimierenden Oozyten in Abhängigkeit der extrazellulären

Chloridkonzentration bestimmt. Mit steigender Konzentration von Chloridionen im Außenmedium nahm die Stromamplitude bei +60 mV zu (Abbildung 3.2.2 a + b). Des Weiteren waren bei positiven Spannungen die Steady-State-Ströme ebenfalls in ihrer Stromamplitude erhöht. In Abbildung 3.2.2 a und b konnte darüber hinaus eine stärkere Deaktivierung bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen verzeichnet werden je höher die Chloridionenkonzentration im Außenmedium war. Dieser Effekt ist gut zu erkennen, da jeweils ein Spannungssprung von +60 mV auf -160 mV bzw. auf -200 mV bei unterschiedlichen Chloridionenkonzentrationen abgebildet ist.

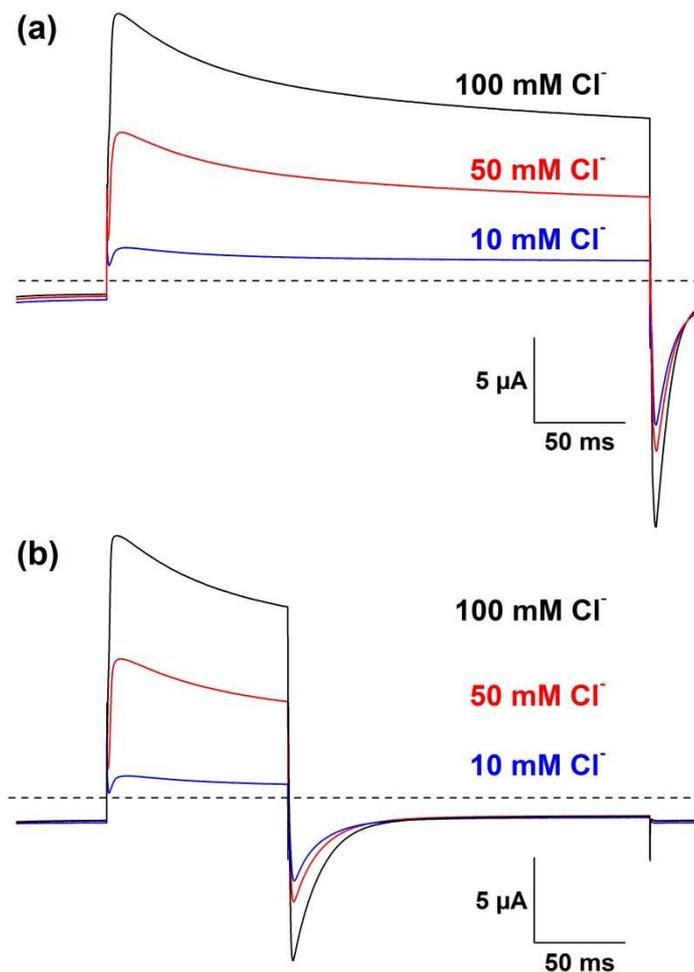


Abbildung 3.2.2: QUAC1 Ströme korrelieren mit der externen Chloridkonzentration. Dargestellt sind die Stromspuren einer Zelle, die mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen (10 mM (blau), 50 mM (rot), 100 mM (schwarz)) perfundiert wurde. Die Oozyte wurde währenddessen mit demselben Pulsprotokoll vermessen. In (a) wird von +60 mV auf +60 mV gesprungen und abschließend erfolgt ein nochmaliger Spannungssprung auf -200 mV. In (b) wird von +60 mV auf -160 mV gesprungen und abschließend erfolgt ein nochmaliger

Spannungssprung auf -200 mV. Die durch Verwendung unterschiedlicher Chloridkonzentrationen variierende Ionenstärke wurde durch Natriumgluconat ausgeglichen. Die gepunktete Linie stellt 0 mA Stromstärke dar.

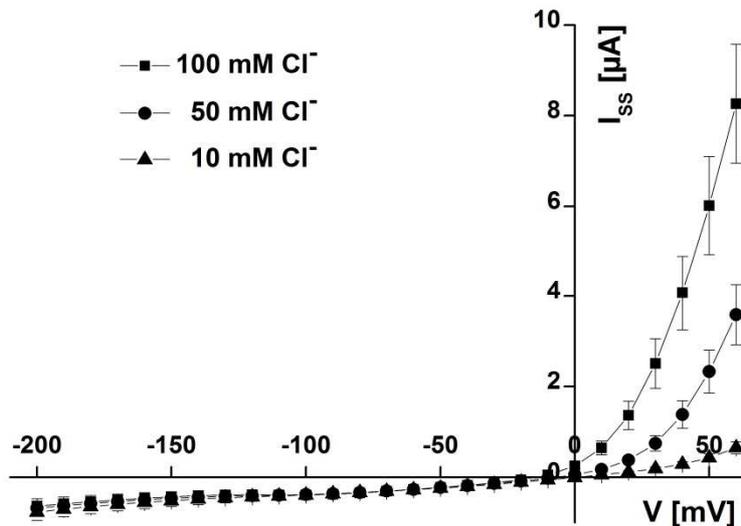


Abbildung 3.2.3: Auswärtsströme von QUAC1 nehmen mit steigender Chloridkonzentration zu, Einwärtsströme bleiben hingegen gleich. Dargestellt ist ein Stromspannungsdiagramm von QUAC1 exprimierenden Oozyten für unterschiedliche Chloridionenkonzentrationen im Außenmedium. Mit zunehmender Chloridionenkonzentration ist ein Anstieg in der Amplitude der Auswärtsströme (Anionen Influx) bei positiven Spannungen zu beobachten. Bei negativen Spannungen jenseits von 0 mV ist ein geringer Einwärtsstrom (Anionen Efflux) zu verzeichnen. Dieser ändert sich jedoch nicht bei unterschiedlichen Chloridionenkonzentrationen im Außenmedium. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte von 5 Experimenten \pm SEM.

Die Zunahme in den Auswärtsströmen korrelierte mit der Konzentration des Hauptanions (Chlorid) in der Lösung (vergleiche auch Abbildung 3.2.3). Je mehr Chloridionen im Außenmedium waren, desto größer waren die observierten Auswärtsströme (Abbildung 3.2.3). Bei Spannungen kleiner als 0 mV war ein geringer Einwärtsstrom (Anionen Efflux) zu verzeichnen, dieser änderte sich jedoch nicht mit der Chloridkonzentration im Außenmedium (Abbildung 3.2.3) Zusammen mit der Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Spannungen wurde hierdurch gezeigt, dass QUAC1 in der Lage ist, Chlorid zu leiten,

insbesondere dadurch, dass bei den nicht QUAC1 exprimierenden Kontrolloozyten keine Ströme auftraten (vergleiche Abbildung 3.2.1).

Besonders die schnellen Deaktivierungskinetiken wiesen zum ersten Mal auf eine Verbindung der R-Typ Ströme in Schließzellen und dem Genprodukt von QUAC1 hin. Detailliertere Studien von QUAC1 in Oozyten hinsichtlich seiner Permeabilitätseigenschaften, Spannungsabhängigkeit und seiner Aktivierbarkeit durch Malat sollten diese Vermutung stützen.

3.3 Externes Malat aktiviert QUAC1

Nachdem gezeigt wurde, dass QUAC1 eine Chloridionenleitfähigkeit besitzt, war es interessant zu erfahren, wie der Kanal auf weitere Anionen reagiert. Besonders organische Säuren wie Malat waren von Bedeutung, da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass Mitglieder der ALMT-Familie Malat abgeben können ((Ligaba, Katsuhara et al. 2006) sowie Abschnitte 1.5 und 1.6). Zudem ist für die R-Typ Kanäle bekannt, dass ihre Offenwahrscheinlichkeit in Anwesenheit von Malat zu hyperpolarisierten Spannungen verschoben wird (Hedrich and Marten 1993). Ein einfaches Experiment, dass die Beeinflussung von QUAC1 durch Malat wiedergibt, ist exemplarisch in Abbildung 3.3.1 zu sehen.

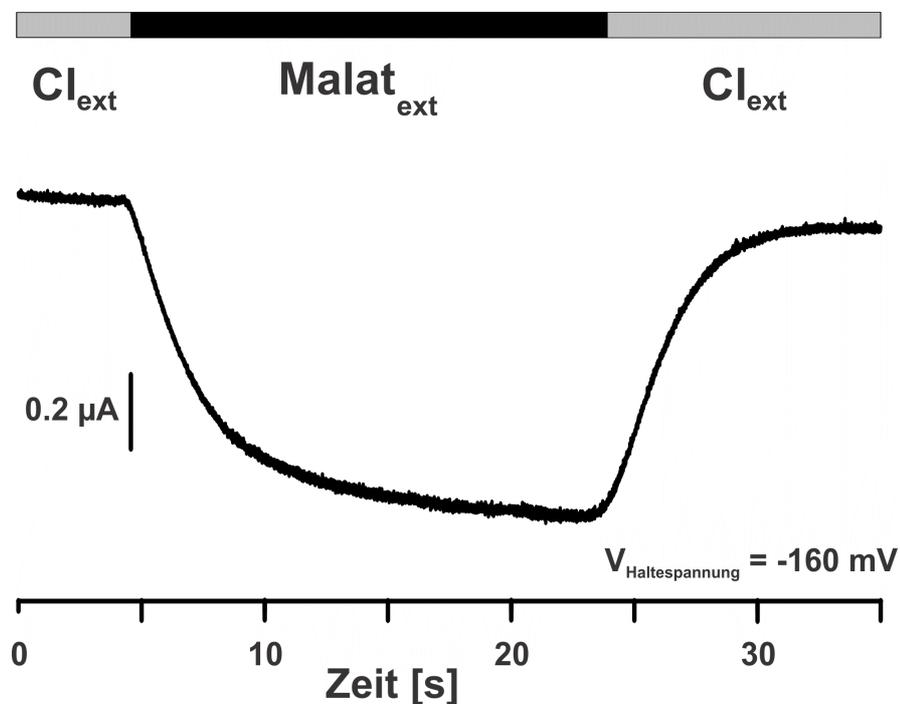


Abbildung 3.3.1: Externes Malat aktiviert reversibel QUAC1. Einzelstromspur von einer QUAC1 exprimierenden Oozyte. Bei einer Haltespannung von -160 mV wurde von einem chloridhaltigen Medium (hellgrauer Balken) zu einem malathaltigen Medium (schwarzer Balken) gewechselt. Während des Lösungswechsels war ein schneller Anstieg der QUAC1-vermittelten Auswärtsströme um ca. $0,8$ μ A zu beobachten. Nachdem sich eine stabile Stromamplitude eingestellt hatte, wurde wieder zum chloridhaltigen Medium gewechselt. Hierbei wurde ein schneller Rückgang der Stromamplitude auf das Ausgangsniveau beobachtet. Die Chlorid- und Malatkonzentration betrug jeweils 25 mM.

QUAC1 exprimierende Oozyten wurden hierbei bei einer konstanten Haltespannung von -160 mV erst einer 25 mM Chloridlösung, dann einer 25 mM Malatlösung und anschließend wieder einer 25 mM Chloridlösung ausgesetzt. Nach dem Lösungswechsel zur malathaltigen Lösung war ein rascher Anstieg des Stroms um $0,8$ μ A zu beobachten. Nach dem erneuten Wechsel zur chloridhaltigen Lösung relaxierte der Malat-induzierte Einwärtsstrom (Anionen Efflux) wieder auf sein Ausgangsniveau. Dieses Experiment zeigte eindeutig eine reversible Induktion der QUAC1 Aktivität durch Malat.

Um den biophysikalischen Mechanismus der Malatinduktion von QUAC1-vermittelten Strömen im Detail aufzuklären, wurden variierende externe Malatkonzentrationen appliziert und die Ströme bei Spannungen zwischen $+60$ und -200 mV ausgewertet. Zunächst wurden die Kinetiken der Stromantworten als Antwort auf schnelle Spannungssprünge aufgezeichnet. Zur Aktivierung von QUAC1 wurde ein Spannungspuls zu $+60$ mV appliziert.

So zeigten mit malathaltigen Medien perfundiert QUAC1 exprimierende Oozyten eine veränderte Kinetik im Vergleich zur Perfusion mit chloridhaltigen Medien (Abbildung 3.3.2). Oozyten in 50 mM NaCl-Lösung zeigten die in Abbildung 3.2.1 und Abbildung 3.3.2 (links) beschriebenen typischen Kinetiken. Während der Perfusion mit 50 mM Malat, änderte sich diese Kinetik. Bei einem Spannungssprung zu $+60$ mV waren instantane und in ihrer Amplitude konstante Auswärtsströme zu beobachten (Abbildung 3.3.2 rechts). Im Gegensatz zu den Messungen in chloridhaltigen Medien, waren die Gleichgewichtsströme im Malatmedium (50 mM) weniger Spannungsabhängig (Abbildung 3.3.2 rechts). Eine Deaktivierung des Kanalstroms war erst bei Spannungen, die negativer als -150 mV lagen (vergleiche Abbildung 3.3.3 a) zu verzeichnen.

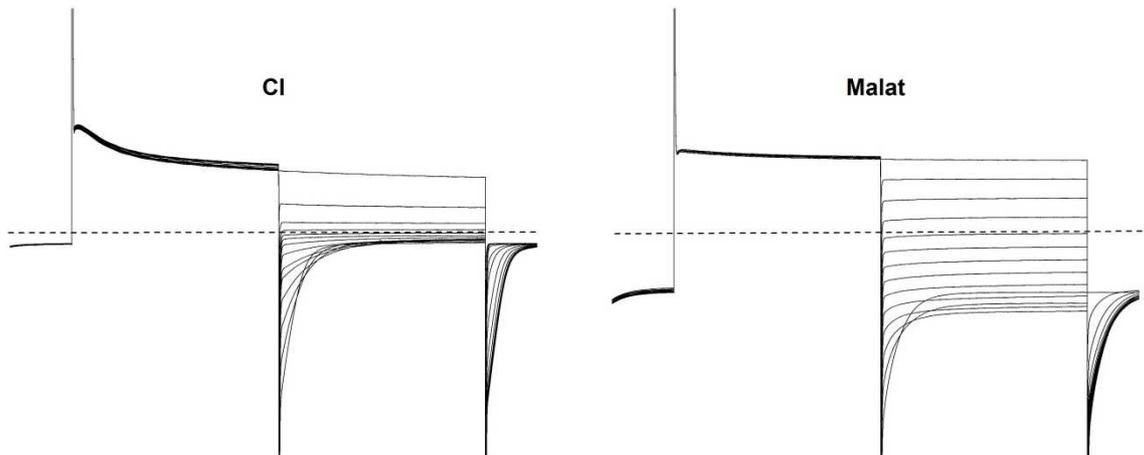


Abbildung 3.3.2: QUAC1 exprimierende Oozyten besitzen in Malatmedium höhere Einwärtsströme als in Chloridmedium. Die exemplarische Ganz-Zell-Ableitungen einer QUAC1 exprimierenden Oozyte zeigt die Stromantwort von QUAC1 in chloridhaltigem Medium (links) und die Stromantwort von QUAC1 in malathaltigem Medium (rechts). In Anwesenheit von Malat im Außenmedium nehmen die Gleichgewichtsströme mit hyperpolarisierender Spannung zu. Ab Spannungen negativer von -140 mV ist eine starke Deaktivierung zu verzeichnen, und die Amplitude der Gleichgewichtsströme nimmt ab. Dieser Effekt variierte je nach Malatkonzentration (Abbildung 3.3.3). Die Konzentration von Chlorid und Malat im Außenmedium betrug jeweils 50 mM. Die gepunktete Linie stellt die Nullstromlinie dar.

Die in Abbildung 3.3.2 beispielhaft dargestellten Daten wurden in Abbildung 3.3.3 a als Stromspannungsdiagramme von sechs unabhängigen Experimenten bei unterschiedlichen Malatkonzentrationen (50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM) im Außenmedium statistisch zusammengefasst. Die negativen Peakströme, welche durch starke Deaktivierung bei stark hyperpolarisierenden Spannungen entstanden, sind in diesem Diagramm gut zu erkennen. Diese glockenförmigen Kurvenverläufe der Stromspannungsdiagramme waren typisch für QUAC1 in der Anwesenheit von Malat im Außenmedium. Für alle Kurvenverläufe ist zu erkennen, dass mit steigender Malatkonzentration sowohl die Einwärts- als auch die Auswärtsströme zunahm (Peakstrom in μA : 5 mM Malat = $2,3\mu\text{A}$, 10 mM Malat = $3,5\mu\text{A}$, 25 mM Malat = $4,9\mu\text{A}$, 50 mM Malat = $6\mu\text{A}$)(Abbildung 3.3.3 a). Außerdem war mit steigender Malatkonzentration, neben der Zunahme in den Peakströmen, auch eine Verschiebung der Selbigen hin zu negativeren Spannungen zu erkennen (Peakstrom bei Malatkonzentration / Spannung: 5 mM Malat = -110 mV , 10 mM Malat = -130 mV , 25 mM Malat = -140 mV , 50 mM Malat = -160 mV)(Abbildung 3.3.3 a). Zudem konnte mit steigender Malatkonzentration

im Außenmedium eine Verschiebung des Umkehrpotentials hin zu negativeren Spannungen beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.5.2)

Die Zunahme der Auswärtsströme (Anion Influx) lässt sich durch die steigende Malatkonzentration im Außenmedium erklären. Die observierten negativen Malat-abhängigen Peakströme deuteten jedoch auf einen weiteren Einfluss von Malat auf die Aktivität von QUAC1 hin. Um zu untersuchen, ob Malat das Spannungs-abhängige Öffnungsverhalten von QUAC1 beeinflusst, wurde neben den Gleichgewichtsströmen auch die relative Offenwahrscheinlichkeit des Anionenkanals bei unterschiedlichen Malatkonzentrationen bestimmt.

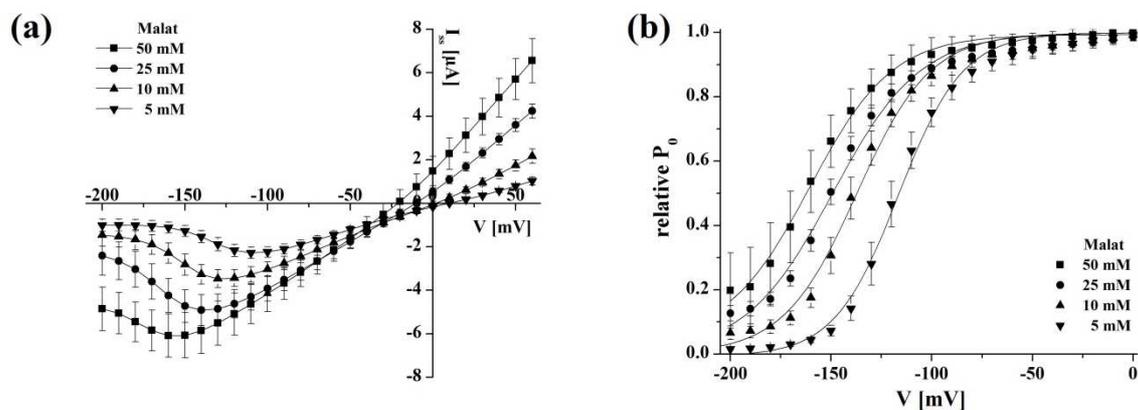


Abbildung 3.3.3: Externes Malat verschiebt die negativen Peakströme und die Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1. In (a) sind Gleichgewichtsströme als Funktion der Spannung in Anwesenheit unterschiedlicher Malatkonzentrationen (50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM) im Außenmedium dargestellt. Mit steigender Malatkonzentration nehmen sowohl die Auswärtsströme (positive Ströme) als auch die Einwärtsströme (negative Ströme) zu. In Anwesenheit von Malat ist ein typischer Peakstrom bei negativen Spannungen zu erkennen (vergleiche Abbildung 3.2.3), der bei stark hyperpolarisierender Spannung wieder abnimmt. Dieser Peakstrom nimmt mit steigender Malatkonzentration in seiner Intensität zu und verschiebt sich hin zu negativeren Spannungen. In (b) sind die relativen Offenwahrscheinlichkeiten zu den in (a) gezeigten Messungen dargestellt. Mit steigender Malatkonzentration verschiebt sich die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit ($P_{1/2}$) hin zu negativeren Spannungen. Die Datenpunkte aus (a + b) geben den Mittelwert \pm SD aus $n = 6$ Experimenten wieder. Die durchgezogenen Linien in (b) geben die mit einer Boltzmannfunktion gefitteten Offenwahrscheinlichkeiten wieder.

Abbildung 3.3.3 b gibt die entsprechenden relativen Offenwahrscheinlichkeiten zu den in Abbildung 3.3.3 a dargestellten Experimenten wieder. Die relativen Offenwahrscheinlichkeiten

(P_0) wurden aus den Folgepulsströmen bei -200 mV ermittelt (siehe Abschnitt 2.5; Abbildung 2.5.3.1 und Abbildung 2.5.3.2). Die halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeiten ($P_{1/2}$) stellen ein gutes elektrisches Charakteristikum für die spannungsabhängige-Aktivierbarkeit eines Kanals dar. Bei QUAC1 verschob sich die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit ($P_{1/2}$) mit steigenden Malatkonzentrationen hin zu negativeren Spannungen ($P_{1/2}$: 5 mM / -115 mV, 10 mM / -137 mV, 25 mM / -148 mV, 50 mM / -161 mV). Diese Verschiebung von $P_{1/2}$ hatte zur Folge, dass QUAC1 bereits bei negativeren Spannungen in der Lage war Anionen zu leiten. Bei 50 mM Malat im Außenmedium war sogar zu erkennen, dass die Verschiebung der relativen Offenwahrscheinlichkeit so weit zu negativen Spannungen erfolgte, dass der Anionenkanal innerhalb des getesteten Spannungsbereichs nicht mehr vollständig schloss. Dies ist gut an der 50 mM Malatkurve in Abbildung 3.3.3 a zu erkennen. Selbst bei einer Membranspannung von -200 mV waren bei einer Malatkonzentrationen von 50 mM noch deutlich stärkere Anionenausströme zu erkennen als bei niedrigeren Malatkonzentrationen.

3.4 Einwärtsströme werden durch intrazelluläres Malat erhöht

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Beobachtungen zeigten eindeutig eine Malat-abhängige Induktion von QUAC1-vermittelten Anionenströmen. Es war festzustellen, dass Malat sowohl ein permeierendes Ion als auch einen Liganden repräsentiert, der die Spannungsabhängigkeit von QUAC1 moduliert. Diese Experimente zeigten allerdings nur die elektrischen Eigenschaften von QUAC1, wenn Malat auf der extrazellulären Seite der Membran präsent war. Um die Abhängigkeit des Anionenkanals von intrazellulärem Malat zu untersuchen, wurde in QUAC1 exprimierende Oozyten 50 nl einer 200 mM Malatlösung (pH 7,2; Malatendkonzentration in der Oozyte ca. 18 mM) injiziert. Die Malat beladenen Oozyten, sowie mit Wasser injizierte QUAC1 exprimierende Kontrolloozyten, wurden anschließend in Standardchloridmedien mittels TEVC vermessen.

In Abbildung 3.4.1 sind exemplarische Stromspuren von Malat-beladenen und unbeladenen QUAC1-exprimierenden Oozyten dargestellt. Abbildung 3.4.1 a zeigt den Effekt einer mit Wasser injizierten QUAC1 exprimierenden Oozyte. Die Oozyten wiesen den charakteristischen Verlauf von QUAC1 in chloridhaltigen Medien auf (vergleiche Abbildung 3.2.1 und 3.3.2). Wie bei nicht injizierten QUAC1 exprimierenden Oozyten traten große instantane Ströme auf, welche bei negativen Spannungen eine schnelle Deaktivierung zeigten. Nach der Relaxation in den Gleichgewichtszustand, waren kaum noch Anionenströme bei negativen Spannungen zu messen. Somit zeigten die Oozyten keine durch die Wassereinjektion bedingte Änderung der Stromkinetik und der I_{ss} im Vergleich zu nicht injizierte Oozyten in chloridhaltigem Medium

(vergleiche Abschnitt 3.2 und 3.3). Abbildung 3.4.1 b zeigt die Ganzzell-Stromantwort von Malat-injizierten Oozyten, die QUAC1 exprimieren. Im Vergleich zu Wasser injizierten Oozyten war die Deaktivierungskinetik deutlich langsamer. Zudem waren die Gleichgewichtsströme bei negativen Spannungen gegenüber dem Kontrollexperiment in Abbildung 3.4.1 a stark erhöht. Mit zunehmender Hyperpolarisation des Membranpotentials nahm auch die Deaktivierung der Ströme zu (vergleiche -200 mV und -180 mV zu -140 mV und -120 mV).

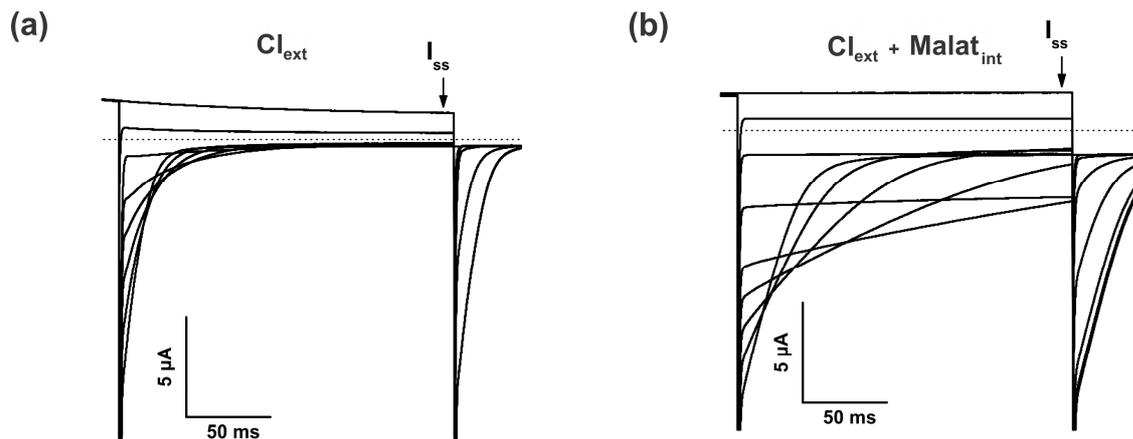


Abbildung 3.4.1: Effekt von (a) Wasser- bzw. (b) Malatinjektion auf die Stromantwort von QUAC1 exprimierenden Oozyten. Die dargestellten Stromspuren wurden bei folgenden Testspannungen aufgenommen (a), +60 mV, +40 mV, mV -80 mV, -120 mV, -140 mV, -160 mV, -180 mV, -200 mV und in (b), +60 mV, 0 mV, -40 mV, -80 mV, -120 mV, -140 mV, -160 mV, -180 mV, -200 mV. Die Spannung im Folgepuls lag bei -200 mV und das Haltepotential bei -20 mV. In (a) ist zu erkennen, dass die Injektion von Wasser keinen Effekt auf das Verhalten von QUAC1 hat (vergleiche Abbildung 3.2.1 und 3.3.2). Injektion von Malat (b) hingegen, zeigte eine starke Zunahme der Gleichgewichtsströme als auch der Dauer und Stärke der instantanen Ströme. Die finale Konzentration in den Malat injizierten Oozyten betrug ca. 18 mM, die Messungen wurden in Standardchloridmedium durchgeführt. Die gepunktete Linie stellt die Nullstromlinie dar.

Um einen direkten Vergleich der Spannungsabhängigen Gleichgewichtsströme von QUAC1 durchführen zu können, wurden die I_{ss} von Malat- bzw. Wasser-injizierten Oozyten gegen die angelegte Membranspannung in Abbildung 3.4.2 aufgetragen. Die Wasser injizierten Oozyten (helle Quadrate) zeigten ähnliche Stromspannungsverläufe, wie sie bereits in Abbildung 3.2.3 beobachtet wurden. Es waren nennenswerte Auswärtsströme bei positiven Spannungen (bis zu $1\mu\text{A}$), und nur geringen Einwärtsströme bei negativen Spannungen zu verzeichnen. Die Malat injizierten Oozyten (dunkle Quadrate) hingegen zeigten einen typischen, glockenförmigen R-Typ Stromspannungsverlauf, wie er bereits in Anwesenheit von extrazellulärem Malat beschrieben wurde. Die Peakströme erreichten bis zu $-4\mu\text{A}$ bei -100 mV , also 13-mal höher als

bei der Wasserkontrolle. Bei Spannungen negativ von -160 mV nahmen die Einwärtsströme erneut zu, was vermutlich auf Verletzungen der Membran durch die Malatinjektion zurückzuführen ist. Die Steigerung der Efflux-Ströme nach Beladung der Oozyten mit Malat bestätigen die Vermutung, dass Malat im Gegensatz zu Chlorid sehr gut durch die Kanalpore permeieren kann.

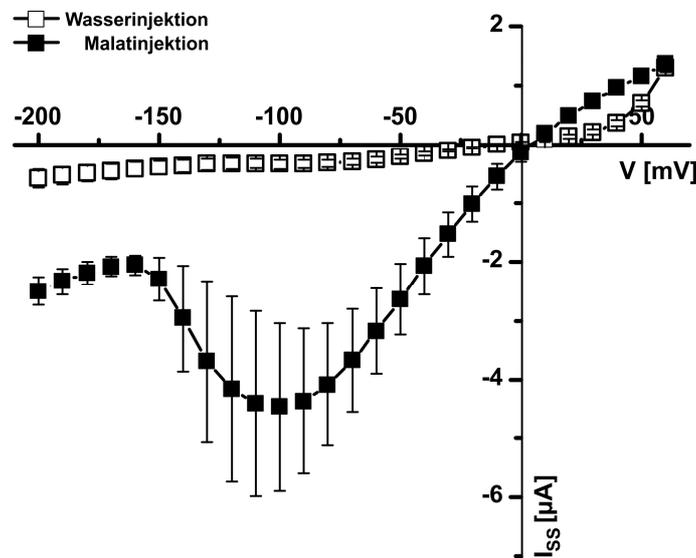


Abbildung 3.4.2: Malat Injektion erhöht Einwärtsströme stark. Stromspannungsdiagramm von QUAC1-exprimierenden Oozyten, die entweder mit Wasser (offene Quadrate) oder Malat (schwarze Quadrate) injiziert wurden. Die Experimente wurden in einem Standardchloridmedium durchgeführt. Die finale Malatkonzentration in Oozyten betrug ca. 18 mM. Die Datenpunkte geben den Mittelwert \pm SE von $n = 4 - 5$ Experimenten wieder.

Da in Abschnitt 3.3 jedoch bereits bei der Anwesenheit von Malat im Außenmedium eine Erhöhung der Einwärtsströme auftrat, ohne dass Malat zuvor artifiziell eingebracht wurde, stellt sich die Frage, welches Anion für diese Ströme verantwortlich war. Zur Klärung dieser Frage wurden Oozyten in einem Standardchloridmedium (25 mM) auf eine Spannung von -100 mV geklemmt (Abbildung 3.4.3). Anschließend erfolgte eine dreiminütige Perfusion mit einem Standardmalatmedium (25 mM), wobei davon auszugehen ist, dass bei -100 mV keine Malataufnahme stattfinden sollte. Zur Überprüfung der Stromantwort wurde das in Abschnitt 2.5.3 beschriebene Pulsprotokoll angelegt und die daraus resultierenden Ströme aufgezeichnet. Das Stromspannungsdiagramm zeigte nach dieser Prozedur einen Stromspannungsverlauf mit R-Typ typischer Glockenkurve. Danach wurde dieselbe Oozyte für drei Minuten auf +40 mV geklemmt und weiterhin mit dem Standardmalatmedium perfundiert. Durch die Spannung von +40 mV sollte der elektrochemische Gradient eine Aufnahme von Anionen und somit von

Malat begünstigen. Nach dieser Zeitspanne wurde erneut das Spannungsprotokoll angelegt und die resultierenden Ströme aufgezeichnet. Im Gegensatz zu der zuvor aufgezeichneten Stromspannungskurve zeigte sich nach der Spannungsgetriebenen (+40 mV) Malatbeladung eine deutliche Erhöhung (4-fach) des Peakstroms und eine Verschiebung des Peaks hin zu negativeren Spannungen (Abbildung 3.4.3). Aufgrund des oben beschriebenen Verfahrens können diese Effekte nur durch die Aufnahme von Malat erklärt werden. Diese Experimente verdeutlichen, dass Malat tatsächlich ein permeierendes Anion von QUAC1 ist.

Abbildung 3.4.3: Spannungsgesteuerte Malatbeladung in QUAC1-exprimierende Oozyten erhöhen den Anionenefflux deutlich. Die Messung der Gleichgewichtsströme als Funktion des Membranpotentials ohne (Haltespannung von -100 mV) oder mit Malatbeladung (Haltespannung von +40 mV) einer exemplarischen Oozyte ist gezeigt.

3.5.1 Synergistische Effekte von intra- und extrazellulärem Malat auf QUAC1

In Abschnitt 3.3 konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt von extrazellulärem Malat auf QUAC1 gezeigt werden. Des Weiteren konnte in Abschnitt 3.4 durch die Beladung von QUAC1-exprimierenden Oozyten mit Malat (Injektion und elektrische Beladung) gezeigt werden, dass intrazelluläres Malat ebenfalls einen Effekt auf die QUAC1-vermittelten Anionenströme hatte. Da bei den Versuchen in Abschnitt 3.4 keine Bestimmung der intrazellulären Malatkonzentration möglich gewesen war (Abbildung 3.4.3), sollten nun die

Effekte von intrazellulärem Malat genauer untersucht werden. Es lag die Vermutung nahe, dass auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit der QUAC1 Eigenschaften vorliegen könnte. Außerdem sollte ergründet werden, ob es eine synergistische Wirkung von intra- und extrazellulärem Malat gibt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an Malat in QUAC1 exprimierende Oozyten injiziert. Die Malatendkonzentration in den Oozyten betrug 0 mM, 4,5 mM, 9 mM und 18 mM. Diese beladenen Oozyten wurden dann in An- und Abwesenheit von Malat im Außenmedium vermessen. Die Auswirkungen von unterschiedlichen intrazellulären Malatkonzentrationen ohne Zugabe von extrazellulärem Malat sind in Abbildung 3.5.1.1 a zu sehen. Für 0 mM intrazelluläres Malat waren ähnliche Stromspannungsdiagramme wie in Abbildung 3.2.3 zu verzeichnen. Bei allen anderen internen Malatkonzentrationen (4,5 mM, 9 mM, 18 mM) waren hingegen die charakteristischen R-Typ Stromspannungskurven zu verzeichnen. Mit steigender interner Malatkonzentration war ein Anstieg der Peakströme zu messen. Ebenfalls konnte eine Verschiebung der Selbigen hin zu negativeren Spannungen beobachtet werden. Die positiven Auswärtsströme hingegen blieben bei allen Konzentrationen relativ konstant. Eine genauere Untersuchung der relativen Offenwahrscheinlichkeiten (Abbildung 3.5.1.1 c) zeigte, dass sich die Verschiebung der Peakströme, in der Verschiebung der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit ($P_{1/2}$) begründete. Mit steigender interner Malatkonzentration verschoben sich die $P_{1/2}$ Spannungen von -63 mV bei 0 mM Malat, zu -85 mV bei 4,5 mM Malat, und -90 mV bei 9 mM Malat bis hin zu -118 mV bei 18 mM Malat. Diese Beobachtungen waren denen aus Abschnitt 3.3 sehr ähnlich, da auch dort eine konzentrationsabhängige Zunahme als auch eine Verschiebung der Peakströme verzeichnet werden konnte, die mit der Verschiebung der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit ($P_{1/2}$) einherging.

Wenn zu den unterschiedlichen internen Malatkonzentrationen noch zusätzlich extrazelluläres Malat (25 mM) angeboten wurde, ergab sich der in Abbildung 3.5.1.1 b dargestellte Stromspannungsverlauf. Bei allen internen Malatkonzentrationen konnte der glockenförmige Kurvenverlauf beobachtet werden. Wie bereits zuvor war mit Anstieg der internen Malatkonzentration eine Zunahme der Peakströme, als auch eine Verschiebung der Peakströme zu negativeren Spannungen zu verzeichnen. Durch die Anwesenheit des extrazellulären Malats verschoben sich die Peakströme jedoch noch negativer als in Abwesenheit des Anions (vergleiche Abbildung 3.5.1.1 a). Weiterhin konnte eine extreme Zunahme der Peakströme verzeichnet werden, wenn Malat intra- und extrazellulär vorhanden war. Die Peakströme erreichten dabei Werte von -1 μ A bei 0 mM Malat, -4 μ A bei 4,5 mM Malat, -7 μ A bei 9 mM Malat sowie -14 μ A bei 18 mM Malat.

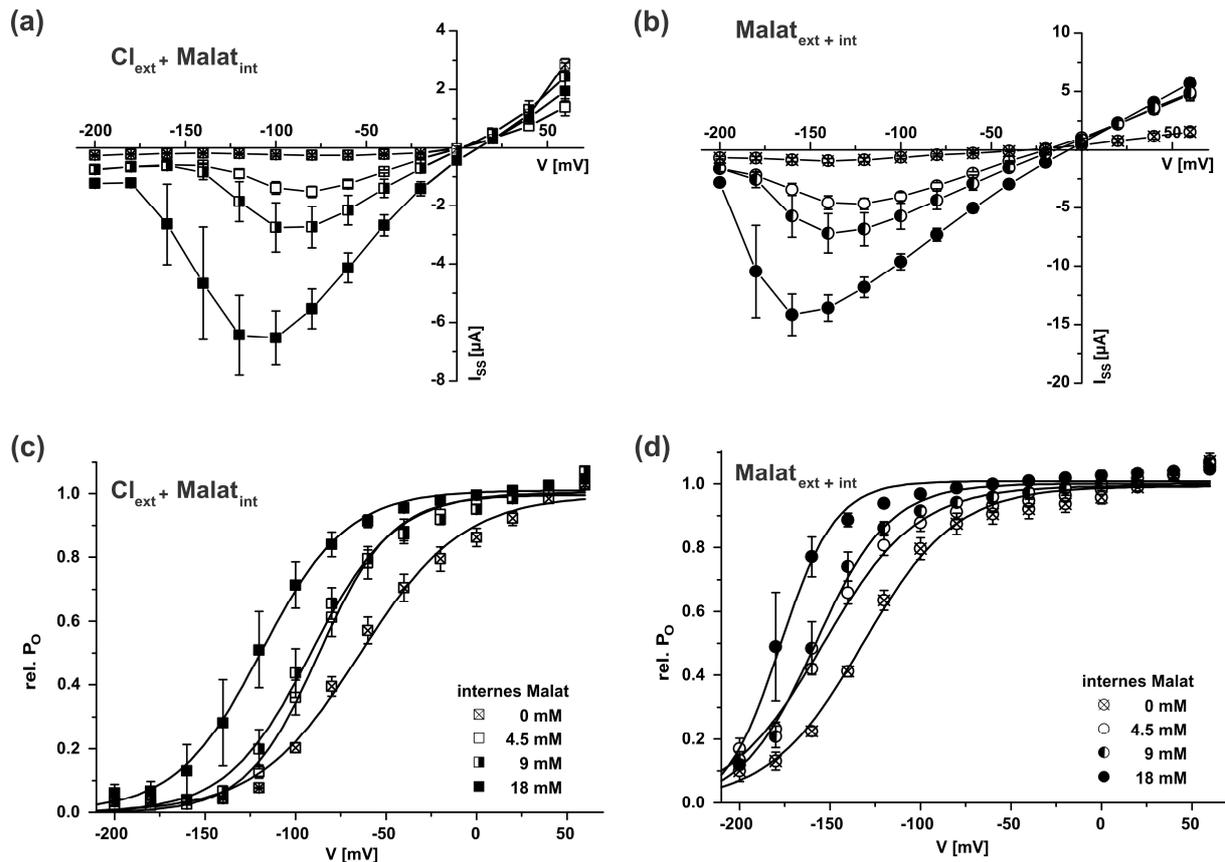


Abbildung 3.5.1.1: Effekt von intra- und extrazellulärem Malat auf QUAC1 vermittelte Anionenströme und auf das Spannungsabhängige Schalten des Anionenkanals. (a + b) Stromspannungsdiagramm von QUAC1-exprimierenden Oozyten bei intrazellulärer Malatzugabe (a) bzw. intra- und extrazellulärer Malatzugabe (b). (c + d) Korrespondierende relative Offenwahrscheinlichkeit zu (a + b) bei intrazellulärer Malatzugabe (c) bzw. intra- und extrazellulärer Malatzugabe (d). Die internen Malatkonzentrationen betragen 0 mM (gekreuzte Symbole), 4,5 mM (offene Symbole), 9 mM (halboffene Symbole), 18 mM (geschlossene Symbole). Die Chlorid- bzw. Malatkonzentration betrug 25 mM im Außenmedium. Die dargestellten Punkte sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3 - 4$ Experimenten. Die Datenpunkte wurden mit einer Boltzmann-Gleichung gefittet (durchgezogene Linien) in (c + d).

Die Auswertung der relativen Offenwahrscheinlichkeiten zeigte, dass die Werte der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeiten ($P_{1/2}$) in Anwesenheit von extra- und intrazellulärem Malat ebenfalls zu negativeren Spannungen verschoben waren, als in Gegenwart von intrazellulärem Malat alleine. Die Werte von $P_{1/2}$ betragen dabei -132 mV bei 0 mM Malat, -154 mV bei 4,5 mM Malat, -158 mV bei 9 mM Malat und -176 mV bei 18 mM Malat. Die Anwesenheit von extrazellulärem Malat sorgte somit dafür, dass sich $P_{1/2}$ um weitere 60 – 70 mV zu negativeren Spannungen verschob.

3.5.2 Verschiebung des Umkehrpotentials korrespondiert mit experimentellen Werten

Die Bestimmung von Permeationseigenschaften mit der Hilfe Umkehrpotentials bei variierenden Substratkonzentrationen wird für die Charakterisierung von Kanalproteinen gerne angewandt. Eine Übereinstimmung der Verschiebung des Umkehrpotentials mit den vorhergesagten Nernstpotentials dient als Beweis, dass das untersuchte Kanalprotein tatsächlich das angebotene Ion permeieren lässt. Wie in Abschnitt 3.3 bereits erwähnt wurde, verschiebt sich das Umkehrpotential U_{rev} mit steigender Malatkonzentration im Außenmedium hin zu negativen Spannungen. Im Gegensatz dazu führte eine steigende interne Malatkonzentration zu einer positiven Verschiebung von U_{rev} (Abbildung 3.5.1.1 a + b). Beide Sachverhalte sind im Einklang mit denen aus der Nernstgleichung abgeleiteten Überlegungen. Jedoch war die Verschiebung von U_{rev} nicht so ausgeprägt wie es von der Nernstgleichung gefordert wird. Diese Diskrepanz könnte von nicht definierten Malatkonzentrationen innerhalb der Oozyte oder an der unbekanntem Wertigkeit des Malations herrühren. Um einen genaueren Überblick über das Verhalten des Umkehrpotentials, sowie über die Wertigkeit der permeierenden Malationen zu erhalten, wurde Malat in die Oozyten injiziert (20 mM Endkonzentration). Da die in der Literatur beschriebenen Malatkonzentrationen in Oozyten kleiner waren als 1mM (Pineros, Cancado et al. 2008), wurden die Oozyten-endogenen Malatkonzentration vernachlässigt. Des Weiteren wurde das Umkehrpotential durch die Bestimmung der instantanen Ströme ermittelt, um die Permeationseigenschaften des offenen Kanals zu messen und um den Einfluss des Spannungs-abhängigen Schaltverhaltens des Kanals auszuschließen. Die so experimentell bestimmten Umkehrspannungen sind in Abbildung 3.5.2.1 zu sehen. Sehr gut ist die Korrelation der experimentellen U_{rev} mit den theoretischen U_{rev} Werten bei einer angenommenen Wertigkeit von $z = 2$ zu erkennen. Diese Daten unterstützen die in den Abschnitten 3.3 - 5 gemachten Beobachtungen, und belegen die Leitfähigkeit von QUAC1 für Malat. Des Weiteren deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass vornehmlich zweifach geladenen Malationen durch den Kanal transportiert werden.

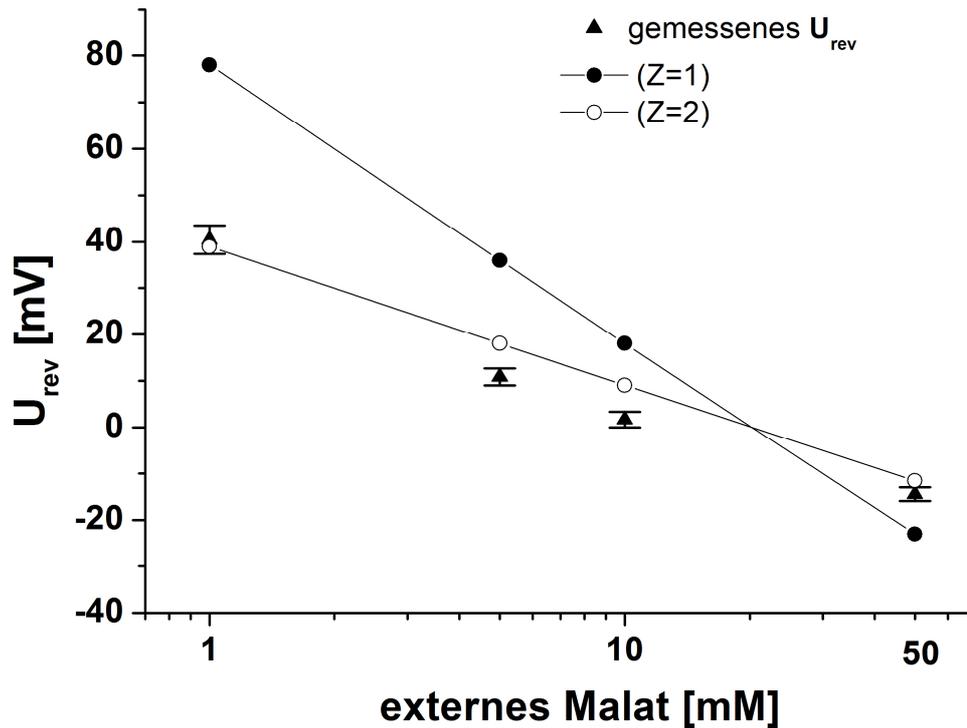


Abbildung 3.5.2.1: Theoretisch und experimentell bestimmte Umkehrpotentiale (U_{rev}) von QUAC1 exprimierenden Oozyten aufgetragen gegen die externe (logarithmische) Malatkonzentration. Schwarze und helle Kreise geben die theoretischen Werte von U_{rev} aus der Nernstgleichung für unterschiedliche äußere Malatkonzentrationen wieder, unter der Annahme das die Ladungszahl Z dem Wert 1 (schwarze Kreise) oder dem Wert 2 (helle Kreise) entspricht, sowie einer internen Malakonzentration von 20 mM. Die schwarzen Dreiecke geben die experimentell ermittelten U_{rev} von mit 20 mM Malat beladenen Oozyten und variierenden äußeren Malatkonzentrationen wieder. Die Verschiebung von U_{rev} unter experimentellen Bedingungen korreliert gut mit den theoretischen Werten für ein zweiwertiges Malation ($Z = 2$). Die experimentellen Werte von U_{rev} sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 6$ Experimenten.

3.6 Sulfat ist ebenfalls ein permeierendes Ion

Wie die Daten aus den Abschnitten 3.3 - 3.5 zeigten, ist QUAC1 in der Lage Malat zu permeieren. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass R-Typ Kanäle in der Lage sind Sulfat zu befördern (Frachisse, Thomine et al. 1999; Roberts 2006). Deshalb wurde das Verhalten von QUAC1 auf eine Erhöhung der intrazellulären Sulfatkonzentration hin untersucht. Hierzu wurden QUAC1 exprimierende Oozyten mit gepufferter Kaliumsulfat-Lösung (pH 7,5) injiziert, so dass die Endkonzentration an Sulfat in den Oozyten ca. 50 mM betrug. Diese mit Sulfat beladenen Oozyten, als auch unbeladene QUAC1-exprimierende

Oozyten wurden dann elektrophysiologisch untersucht. Hierbei wurde unter aktivierenden Bedingung für QUAC1 gearbeitet, da bei den Messungen immer 25 mM Malat im Badmedium vorhanden war. Wie aus dem Stromspannungsdiagramm in Abbildung 3.6.1 ersichtlich wird, zeigten QUAC1 exprimierende Oozyten (helle Quadrate) den typischen glockenförmigen Stromspannungsverlauf in Gegenwart von Malat (vergleiche Abschnitte 3.2 - 3.5).

Abbildung 3.6.1: Sulfatbeladung in QUAC1-exprimierende Oozyten erhöht den Anionenefflux deutlich. Stromspannungsdiagramm von QUAC1 exprimierenden Oozyten in An- und Abwesenheit von intrazellulärem Sulfat. Dreiecke geben nicht exprimierende Kontrolloozyten wieder. Quadrate stehen für QUAC1 exprimierende Oozyten. Helle Symbole sind unbeladene Oozyten, schwarze Symbole hingegen sind mit Kaliumsulfat beladene Oozyten. Injizierte Kaliumsulfatlösung wurde auf pH 7,5 gepuffert. Die Endkonzentration von Kaliumsulfat in den beladenen Oozyten betrug 50 mM. Sämtliche Messungen wurden in Anwesenheit von 25 mM Malat im Außenmedium durchgeführt. Symbole geben die Mittelwerte \pm SE aus $n = 4$ für QUAC1 und $n = 3$ für Kontrolloozyten an.

Injektion von Sulfat in QUAC1-exprimierende Oozyten (dunkle Quadrate) hatte zur Folge, dass sich die Peakströme vervierfachen. Zugleich zeigte sich auch eine Erhöhung der Auswärtsströme bei Spannungen von 0 mV bis +60 mV. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls bei der Erhöhung der extrazellulären bzw. intrazellulären Malatkonzentration gemacht (Abschnitt 3.3 bzw. 3.5). Zudem scheint die Injektion von Sulfat auch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zu beeinflussen. Die Peakströme der Sulfat-beladenen Oozyten war im Vergleich zu unbeladenen Oozyten zu negativeren Membranpotentialen verschoben, so dass im Testspannungsbereich das spannungsabhängige Schließen von QUAC1 kaum zu beobachten war. Kontrolloozyten zeigten weder R-Typ ähnliche Ströme noch eine Induktion von Strömen nach der Beladung mit Sulfat. Diese Experimente weisen darauf hin, dass neben Malat auch Sulfat ein Substrat für QUAC1 darstellt (Abbildung 3.6.1).

3.7 Externes Aluminium zeigt auf QUAC1 keine Wirkung

Für die ALMT-Familie ist bekannt, dass einige ihrer Mitglieder auf die Anwesenheit von Aluminiumionen reagieren (Sasaki, Yamamoto et al. 2004; Ligaba, Katsuhara et al. 2006; Kobayashi, Hoekenga et al. 2007; Pineros, Cancado et al. 2008; Zhang, Ryan et al. 2008). Dies ist ihrer Funktion zur Detoxifizierung des Bodens zuzuschreiben. Die durch Aluminium aktivierten Mitglieder der ALMT-Familie geben organischen Säuren an den Boden ab, um als Chelatoren schädliche Ionen im Boden wie z.B. bei saurem pH vorkommende Aluminiumionen zu binden (Yamaguchi and Kasamo 2001). Da QUAC1 ebenfalls ein Mitglied der ALMT-Familie ist, liegt es nahe die Reaktion von QUAC1 auf Aluminiumionen zu überprüfen. Hierzu wurde QUAC1 drei Tage in *X. laevis* Oozyten exprimiert und dann unter Standardbedingungen in An- und Abwesenheit von Aluminiumionen vermessen. Zu diesem Zweck wurde dem Standardchloridmedium 1 mM Aluminiumchlorid beigefügt². QUAC1 zeigte dabei keine Änderung hinsichtlich seiner elektrischen Eigenschaften. In Abbildung 3.7.1 a sind die Stromamplituden von QUAC1-exprimierenden Oozyten bei -100 mV abgebildet. Mit Wasser injizierte QUAC1-exprimierende Oozyten zeigten nur geringe Stromamplituden in An- und Abwesenheit von Aluminium (Abbildung 3.7.1 a links). Wie bereits zuvor beschrieben, reagieren QUAC1-exprimierende Oozyten stark auf die Zugabe von Malat. Da nicht auszuschließen war, dass dieser Effekt eventuell durch Anwesenheit von Aluminium beeinflusst wird, wurde dies mit Malat-injizierten Oozyten überprüft. Malat injizierte Oozyten zeigten gegenüber mit Wasser injizierten Oozyten einen dramatischen Anstieg in ihrer

²Aluminiumchlorid konnte malathaltigen Medien nicht zugegeben werden, da dies zum Ausfall von Aluminium-Malat-Chelaten führte²

Stromamplitude (Abbildung 3.7.1 a). Die An- bzw. Abwesenheit von Aluminium im Außenmedium zeigte hingegen keinen Effekt auf die Stromamplitude. Wie in dem IV-Diagramm (Abbildung 3.7.1 b) zu sehen ist, zeigte Aluminium über den gesamten gemessenen Spannungsintervall keinen Effekt auf den Verlauf der Ströme oder deren Ausprägung, und somit auf die Aktivierung des Kanals. Diese Ergebnisse zeigen, dass QUAC1 nicht von Aluminiumionen beeinflusst wird, im Gegensatz zu anderen Vertretern der ALMT-Familie.

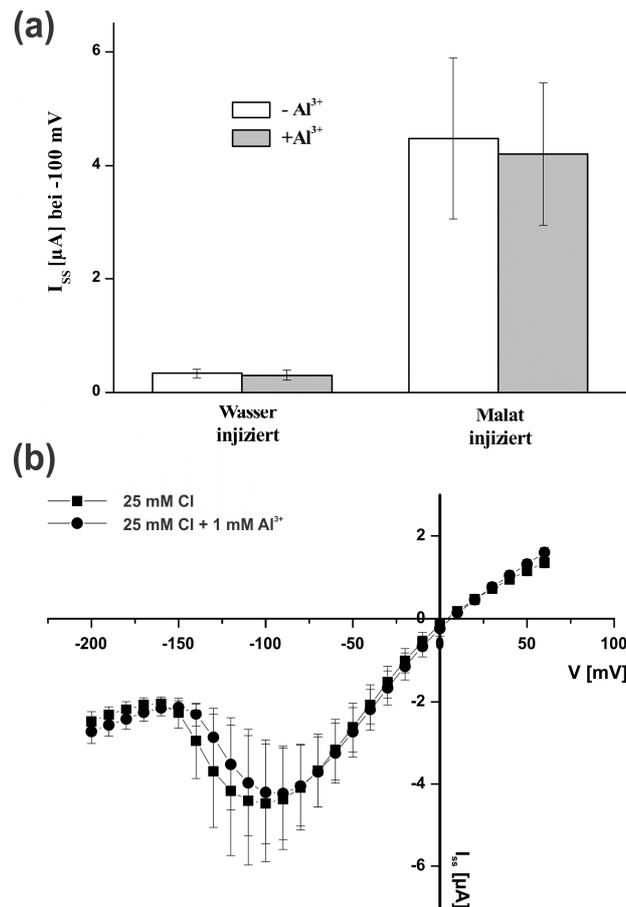


Abbildung 3.7.1: In QUAC1 exprimierenden Oozyten wird durch Aluminium keine Veränderung der Stromantwort induziert. Stromamplituden (a) und Stromspannungsdiagramme (b) von QUAC1-exprimierenden Oozyten in An- und Abwesenheit von Aluminium im Außenmedium. Mit Wasser injizierte Oozyten zeigten nur geringe QUAC1-vermittelte Ströme (a, links), wohingegen mit Malat-injizierte Oozyten einen starken Anstieg in ihren Stromamplituden zeigten (a, rechts). Die Oozyten zeigten keine Veränderung in ihrer Stromamplitude nachdem von aluminiumfreiem Medium (weiße Balken) zu aluminiumhaltigem Medium (graue Balken) gewechselt wurde. Dies galt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von internem Malat. (b) zeigt den gesamten vermessenen Spannungsbereich der Experimente aus (a, rechts). Zu erkennen sind R-Typ typische Peakströme. Das Verhalten von QUAC1 wurde nicht durch Zugabe von Aluminium beeinträchtigt. Die Balkendiagramme geben die Mittelwerte der Stromamplitude \pm SD bei -100 mV wieder. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 4 - 5$. Die finale Malatkonzentration in beladenen Oozyten betrug 18 mM.

3.8 Komponenten des schnellen ABA-Signalweges regulieren die Aktivität von QUAC1

R-Typ Kanäle sind zusammen mit den S-Typ Kanälen für die Initiation des Stomaschlusses verantwortlich (siehe Abschnitt 1.5). Als genetische Herkunft für die S-Typ Ströme wurde der Kanal AtSLAC1 identifiziert (Vahisalu, Kollist et al. 2008; Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010). Der Kanal AtSLAC1 wiederum ist eingebunden in ein Regulationssystem von Kinasen, Phosphatasen und ABA-Rezeptoren, welche seine Aktivität steuern. Die Kinase OST1 beispielsweise wirkt aktivierend auf den Anionenkanal, während die Phosphatase ABI1 die Aktivität von SLAC1 reprimiert (Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010).

Meyer, Mumm et al. (2010) zeigten, dass das Fehlen von QUAC1 in *Arabidopsis thaliana* Schließzellen zu einem verlangsamten Stomaschluss führt. Meine Ausführungen zu den elektrischen Eigenschaften dieses Anionen Kanals haben verdeutlicht, dass QUAC1 sehr stark dem bereits von Hedrich und Marten (Keller, Hedrich et al. 1989; Hedrich, Busch et al. 1990; Hedrich and Marten 1993) beschriebenen R-Typ Kanälen entspricht. Patch-Clamp Experimente untermauerten diese Annahme, da die Malat-abhängige Komponente der R-Typ Leitfähigkeit in Schließzellen fehlte (Abbildung 3.1). Da R-Typ und S-Typ Anionenkanäle synergistisch beim Stomaschluss zusammenarbeiten liegt eine gemeinsame Kontrolle über die schnelle ABA-Signaltransduktionskette der Schließzellen nahe. Deshalb wurde die Interaktion von QUAC1 mit OST1 sowie ABI1 überprüft und deren funktionelle Konsequenz auf die QUAC1 vermittelten Anionenströme analysiert.

In ersten Experimenten wurde die Interaktion von OST1 mit QUAC1 mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) untersucht. Hierbei wurde an den N-Terminus von QUAC1 die N-terminale Hälfte des Fluoreszenzproteins YFP gekoppelt (YFP^{NT}::QUAC1), die Kinase OST1 hingegen wurde am C-Terminus mit dem C-terminalen Teil von YFP fusioniert (OST1::YFP^{CT}). Wurden beide Konstrukte einzeln in Oozyten exprimiert so zeigte sich keine Fluoreszenz (Abbildung 3.8.1 a). Wenn hingegen beide Konstrukte koexprimiert wurden (Abbildung 3.8.1 b), so konnten Fluoreszenzsignale in den exprimierenden Oozyten observiert werden. Diese Fluoreszenz konnte nur erfolgen, wenn sich die Kinase OST1 und der Kanal QUAC1 in hinreichender Nähe zueinander befanden, so dass eine Komplementation des YFP Moleküls in der Oozytenperipherie erfolgen konnte. Da dies geschah, konnte man von einer direkten physikalischen Interaktion zwischen OST1 und QUAC1 ausgehen.

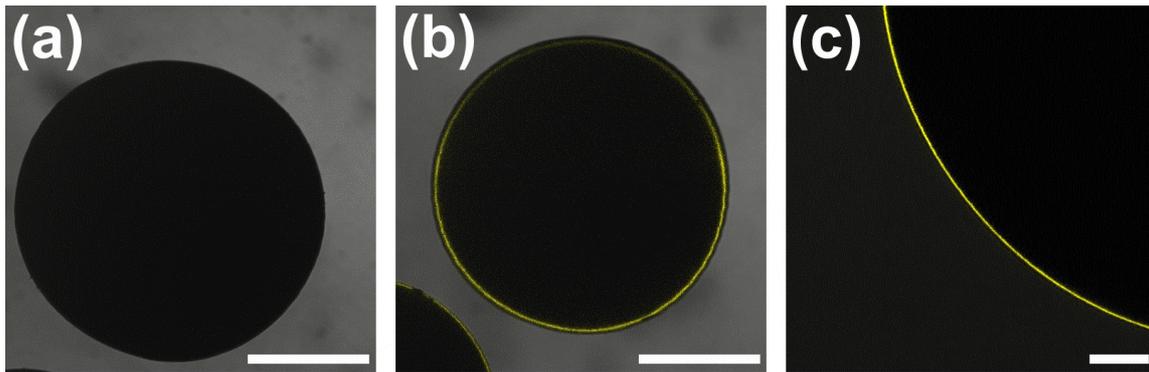


Abbildung 3.8.1: QUAC1 OST1 Protein-Protein-Interaktion wird durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bestätigt. In (a) ist eine Oozyte dargestellt die den Kanal QUAC1 (YFP^{NT}::QUAC1) exprimiert. Die Aufnahmen von (b) und (c) zeigen Oozyten die zusätzlich zu dem Konstrukt YFP^{NT}::QUAC1 noch die Kinase AtOST1::YFP^{CT} exprimierten. Eine Interaktion von QUAC1 mit OST1 war durch die Fluoreszenz in (b) und (c) zu erkennen. (c) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Oozyte aus (b). Man erkennt, dass die Fluoreszenz in der Oozytenperipherie lokalisiert war. Die Größen der Skalen in (a) und (b) betragen 500 μm ; die Skala in (c) entspricht 100 μm . Repräsentative Oozyten sind gezeigt.

Nachdem eine physikalische Interaktion von QUAC1 und OST1 gezeigt werden konnte, wurden QUAC1 und OST1 exprimierende Oozyten, sowie QUAC1/OST1 koexprimierende Oozyten mit Hilfe der TEVC Technik untersucht. Abbildung 3.8.2 zeigt beispielhafte Stromantworten auf verwendete standard Spannungspulsprotokolle. In Chlorid- als auch in Malat-basierenden Medien (Abbildung 3.8.2 a + d) zeigte QUAC1 die bereits zuvor beschriebenen typischen R-Typ Ströme mit schnellen Deaktivierungskinetiken bei stark hyperpolarisierenden Spannungen. Oozyten, die nur OST1 exprimierten, zeigten hingegen keine makroskopischen Anionenströme (Abbildung 3.8.2 c + f). Interessanterweise führte die Koexpression von QUAC1 und OST1 zu einer Verstärkung der QUAC1 vermittelten Ströme. Sowohl die instantanen Ströme nach einer Voraktivierung durch einen +60 mV Spannungspuls, als auch die Gleichgewichtsströme, waren im Vergleich zur Expression von QUAC1 alleine, deutlich erhöht (Abbildung 3.8.2 b + e; vergleiche Abbildung 3.8.3).

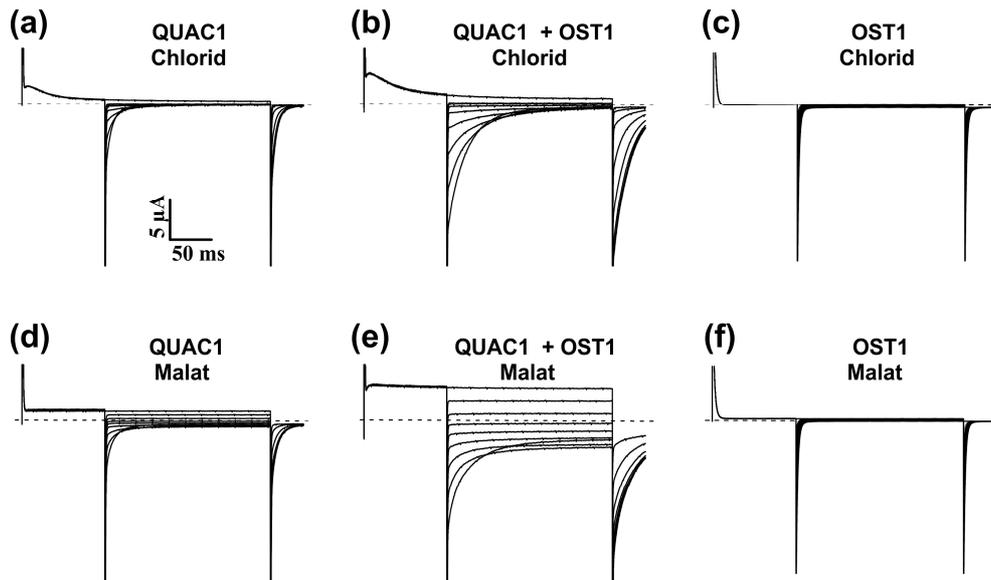


Abbildung 3.8.2: Ganzzell-Stromableitungen zeigen eine deutlich erhöhte Stromantwort von QUAC1, wenn der Kanal mit der Kinase OST1 koexprimiert wurde. Exemplarische Ganzzellströme von Oozyten, die entweder QUAC1, OST1 oder QUAC1 und OST1 zusammen exprimierten, werden exemplarisch gezeigt. Die Messungen (a-c) wurden in chloridhaltigen Medien (25 mM) durchgeführt, die Messungen (d-e) hingegen wurden in malathaltigen Medien (25 mM) aufgezeichnet. Oozyten wurden mit dem Standardpulsprotokoll (Abbildung 2.5.3.1) vermessen. Die für dieses Experiment verwendeten Konstrukte waren YFP^{NT}::QUAC1 und AtOST1::YFP^{CT}.

Aus Experimenten wie sie in Abbildung 3.8.2 gezeigt sind, wurden die Gleichgewichtsströme ermittelt (Abbildung 3.8.3). Die Auswertung der Gleichgewichtsströme zeigte, dass die Koexpression von QUAC1 und OST1 bereits in Chloridmedien zu einer Erhöhung der Auswärts- als auch der Einwärtsströme führte (Abbildung 3.8.3 a). Aus der Ermittlung der relativen Offenwahrscheinlichkeiten (Abbildung 3.8.3 b) konnte man ablesen, dass durch die Koexpression von OST1 mit QUAC1 eine Verschiebung der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 um 20 mV zu negativeren Spannungen erfolgte. In Anwesenheit von Malat im Außenmedium (Abbildung 3.8.3 c) bildete sich sowohl bei QUAC1 Expression, als auch bei QUAC1/OST1 Koexpression, eine typische Glockenkurve in den Gleichgewichtsströmen von QUAC1 aus. Sowohl die Einwärts- als auch die Auswärtsströme waren in Anwesenheit von OST1 erhöht. Der glockenförmige Stromspannungsverlauf war bei den QUAC1/OST1-koexprimierenden Oozyten weitaus stärker ausgeprägt. Während die alleinige Expression von QUAC1 einen maximalen Peakstrom von $-0,7 \mu\text{A}$ zur Folge hatte, zeigte sich durch Expression von QUAC1 zusammen mit OST1 ein Peakstrom von $-3,3 \mu\text{A}$. Das entspricht einer fünffachen Steigerung der QUAC1 Ströme durch die Koexpression des

Kanals mit OST1. Gleichzeitig zeigte sich durch die Koexpression von OST1 eine Verschiebung des Peakstroms (QUAC1 = -130 mV; QUAC1/OST1 = -150 mV) zu negativeren Spannungen. Die Auswertung der relativen Offenwahrscheinlichkeiten zu diesen Versuchen (Abbildung 3.8.3 d) zeigte, dass die Koexpression von QUAC1 mit OST1 auch hier eine Verschiebung der halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Spannungen zur Folge hatte, wie es bereits durch die Verschiebung der Peakströme vermutet werden konnte. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass sowohl Malat als auch die Koexpression von QUAC1 mit OST1 die Offenwahrscheinlichkeit des Anionenkanals deutlich zu negativeren Membranpotentialen verschieben. Dadurch ergibt sich eine erhöhte Stromantwort bei gegebenen negativen Spannungen wie z.B. bei physiologischen Membranpotentialen der pflanzlichen Schließzelle.

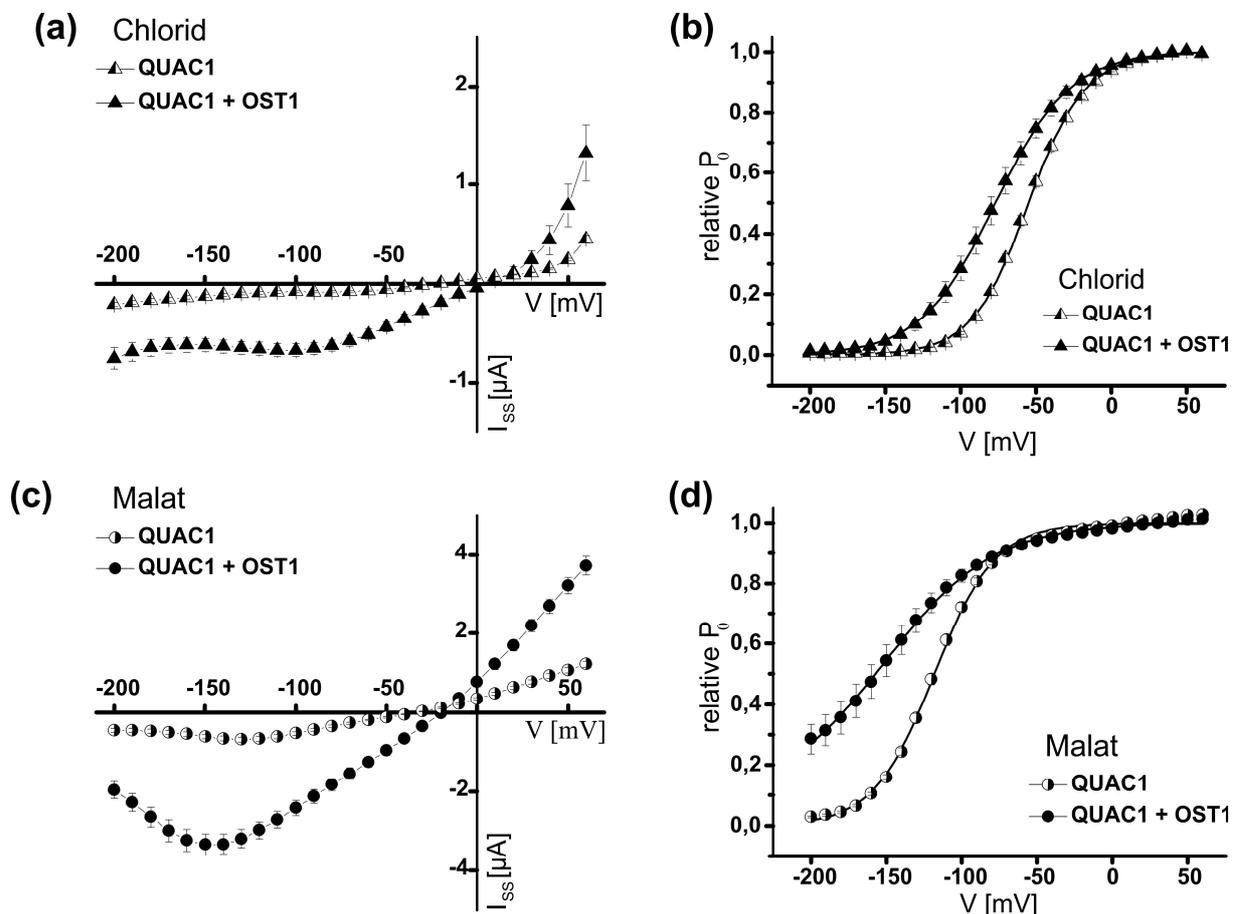


Abbildung 3.8.3: OST1 aktiviert QUAC1 und induzierte Veränderung der QUAC1 Spannungsabhängigkeit. Stromspannungsdiagramme (a + c) und Offenwahrscheinlichkeiten (b + d) von QUAC1 exprimierenden oder QUAC1 und OST1 koexprimierenden Oozyten. Messungen (a + b) wurden in Anwesenheit von 25 mM Chlorid erstellt, Messungen (c + d) wurden in Anwesenheit von 25 mM Malat durchgeführt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 12 - 13$, die Punkte entsprechen dem Mittelwert \pm SD.

Nachdem die Interaktion der Kinase OST1 mit QUAC1 mittels BiFC nachgewiesen wurde und die Konsequenz dieser Interaktion mit der TEVC Methode gezeigt werden konnte, drängte sich die Frage auf, ob ähnlich wie bei der Regulation von SLAC1 auch bei QUAC1 die Phosphatase ABI1 einen negativen Einfluss auf die Stromantwort hat.

Deshalb wurde wiederum ein BiFC basierendes Experiment gewählt, um zu zeigen, ob ABI1 in der Lage ist die Interaktion zwischen QUAC1 und OST1 zu brechen. Hierzu wurden Oozyten abermals mit den Konstrukten AtOST1::YFP^{CT} und YFP^{NT}::QUAC1 injiziert, welche wie in Abbildung 3.8.1 gezeigt interagieren, und somit fluoreszieren. Zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten wurde einigen Oozyten noch die Kinase AtABI1 injiziert, welche die Interaktion von OST1 mit seinen Zielproteinen verhindert bzw. rückgängig macht (siehe Abschnitt 1.7). Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 3.8.4 zu sehen. Oozyten, die die beiden Konstrukte AtOST1::YFP^{CT} und YFP^{NT}::QUAC1 exprimierten, zeigten ein Fluoreszenzsignal bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 514 nm, welche nur durch Komplementierung von YFP hervorgerufen werden konnte (Abbildung 3.8.4 b). Oozyten, die zusätzlich AtABI1 exprimierten (Abbildung 3.8.4 c), sowie Kontrolloozyten welche nur AtOST1::YFP^{CT} exprimierten (Abbildung 3.8.4 a), zeigten hingegen keine Fluoreszenz. Ein Ausbleiben der Fluoreszenz in Anwesenheit von ABI1 deutete darauf hin, dass sich OST1 und QUAC1 nicht mehr in hinreichender Nähe zueinander befanden, und dass die zuvor in Abbildung 3.8.1 und Abbildung 3.8.3 gezeigten Interaktionen gestört sein könnten. Wie bereits zuvor wurde die funktionelle Konsequenz mittels TEVC genauer betrachtet.

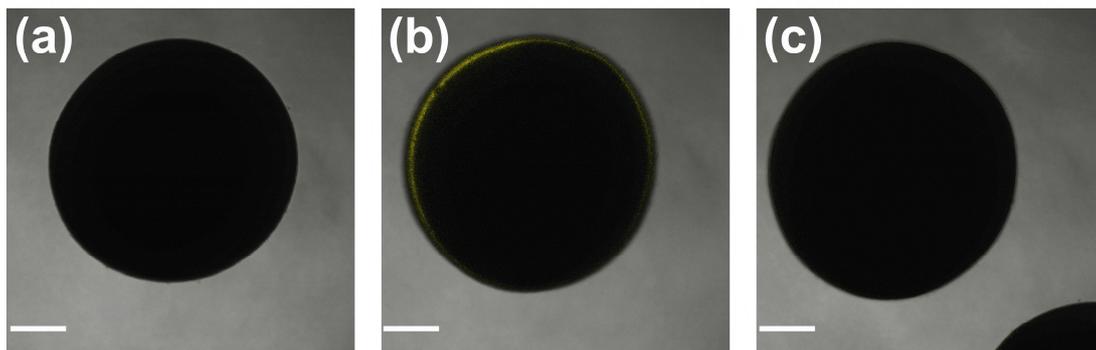


Abbildung 3.8.4: Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) offenbart Unterbindung von Protein-Protein-Interaktion von QUAC1 und OST1 durch ABI1. Die Fotografien zeigen die Expression folgender Konstrukte in Oozyten: (a) OST1 mit C-terminalen gekoppeltem YFP (AtOST1::YFP^{CT}), (b) OST1 mit C-terminalen gekoppeltem YFP und QUAC1 mit gekoppeltem N-terminalen YFP (AtOST1::YFP^{CT} / YFP^{NT}::QUAC1), (c) AtOST1::YFP^{CT} / YFP^{NT}::QUAC1 in Anwesenheit von AtABI1. Die Skalen geben 250 μm wieder.

In Abbildung 3.8.5 sind die Gleichgewichtsströme von QUAC1/OST1 in An- und Abwesenheit von ABI1 unter Malatbedingungen zu sehen. Die Koexpression von QUAC1/OST1 (dunkle Kreise) zeigte die typische glockenförmige R-Typ Stromspannungskurve, mit einem Maximum der Glockenkurve von $-0,8 \mu\text{A}$ bei -140 mV . Die Triple-Expression von QUAC1/OST1/ABI1 (helle Kreise) verlor hingegen den typischen R-Typ Stromverlauf komplett. Gleichzeitig ging damit einher, dass die Einwärts- und Auswärtsströme im Vergleich zu der Koexpression stark abnahmen, und sich Ströme zeigten, die sonst nur bei nicht exprimierenden Kontrollloozyten auftraten. Bei beiden Kurven ist aber zu erkennen, dass sich das Umkehrpotential nicht verschoben hatte und zwischen -30 und -40 mV lokalisiert war. Diese Daten deuten darauf hin, dass ABI1 den Effekt von OST1 auf QUAC1 aufhebt.

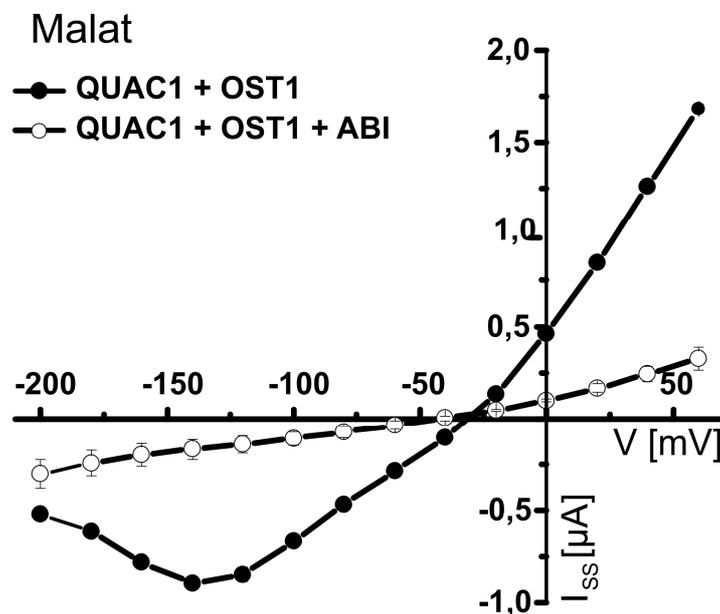


Abbildung 3.8.5: ABI1 unterbindet die von OST1 ausgelöste Aktivierung der QUAC1 Ströme. Stromspannungsdiagramme von QUAC1 und OST1 in An- und Abwesenheit von AtABI1. In Anwesenheit von ABI1 findet eine Reduktion der Ein- und Auswärtsströme statt und eine Ausbildung von glockenförmigen Strömen bleibt aus. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$, die Punkte geben die Mittelwerte \pm Standardfehler wieder. Die Messungen wurden in Gegenwart von 25 mM Malat durchgeführt

Die hier dargestellten Daten werden zudem durch die in Kooperation mit Patrick Mumm angefertigten Patch-Clamp Experimente in Abbildung 3.8.6 bestärkt. Patch-Clamp Messungen an Schließzellprotoplasten von ABA-insensitiven Mutanten (*abil-1*) und Knock-Out Mutanten von OST1 (*ost1-2*) offenbarten einen Rückgang der R-Typ Ströme in Anwesenheit von ABA. Bei beiden Mutanten nahmen die observierten Peak Ströme um die Hälfte ab. In der Mutante *abil-1* kann ABI1 aufgrund einer Punktmutation nicht mehr an den Co-Rezeptor

PYR/PYL/RCAR in Anwesenheit von ABA binden. Dies führt zu einer konstitutiv aktiven Phosphatase. Die Mutante *ost1-2* hingegen besitzt keine aktive Kinase OST1 mehr. Somit führen beide Mutationen zu einem ähnlichen Phänotyp, der auf der Störung der ABA-Signalkaskade beruht.

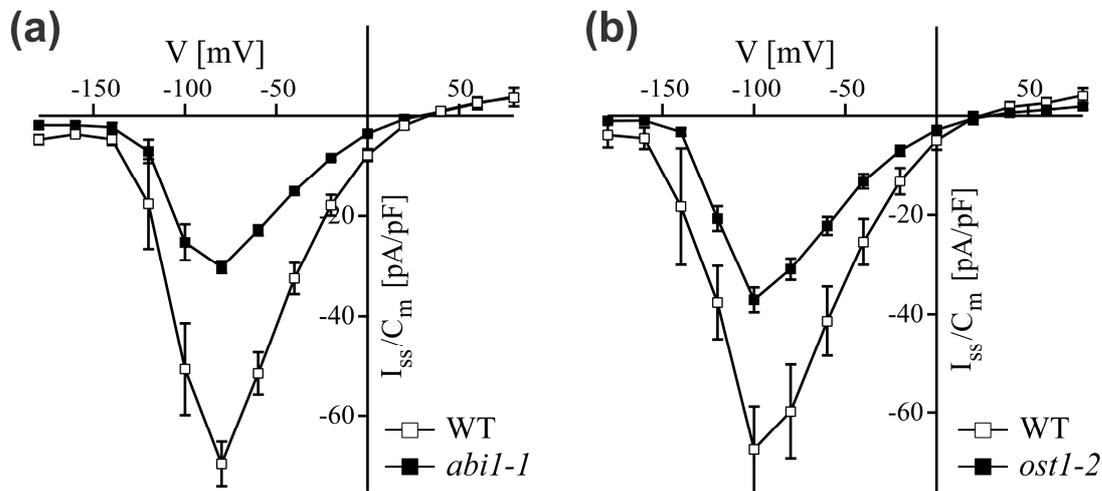


Abbildung 3.8.6: Die Mutanten *abil-1* und *ost1-2* zeigen eine Reduktion der R-Typ Ströme in Schließzellprotoplasten. (a) Stromdichte der Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von *abil-1* (dunkle Quadrate) und Wildtyp (helle Quadrate). (b) Stromdichte der Gleichgewichtsströme (I_{ss}) von *ost1-2* (dunkle Quadrate) und Wildtyp (helle Quadrate). Datenpunkte geben den Mittelwert \pm Standardfehler von $n=5-6$ Experimenten wieder. Die Pipettenlösung enthielt $25 \mu\text{M}$ ABA und war auf 110 nM freies Ca^{2+} eingestellt. Messungen wurden durch Patrick Mumm erstellt. Abbildung wurde aus (Imes, Mumm et al. 2013) entnommen und modifiziert

3.9 Kalziumabhängige Komponenten des ABA-Signalweges beeinflussen die Aktivität von QUAC1

Neben OST1 sind auch kalziumabhängige Kinasen aus der CDPK-SnRK Superfamilie (Hrabak, Chan et al. 2003) in der Lage SLAC1 zu aktivieren. Zwei Beispiele hierfür sind die CDPKs CPK21 und CPK23 (Geiger, Scherzer et al. 2010). Es lag deswegen nahe auch Mitglieder dieser Familie auf Interaktionen mit QUAC1 zu testen. Aufgrund einer Kooperation im Lehrstuhl mit Dr. Kai Konrad gab es Hinweise darauf, dass die CPKs 2, 20 und 34 mit QUAC1 interagierten könnten. Zur Untersuchung der Interaktion wurden dementsprechend die drei CPKs am N-Terminus mit der N-terminalen Hälfte von YFP versehen ($\text{YFP}^{\text{NT}}::\text{CPK2}$, $\text{YFP}^{\text{NT}}::\text{CPK20}$, $\text{YFP}^{\text{NT}}::\text{CPK34}$) und mit QUAC1 koexprimiert, an dessen N-Terminus die C-terminale Hälfte von YFP fusioniert war ($\text{YFP}^{\text{CT}}::\text{QUAC1}$). Interaktionsstudien mittels BiFC (Abbildung 3.9.1) zeigten, dass QUAC1 mit allen drei CPKs interagierte. Hierbei war das Fluoreszenzsignal bei

der Interaktion mit CPK34 am stärksten ausgeprägt (Abbildung 3.9.1, unten rechts), gefolgt von einer schwächeren Fluoreszenz bei Koexpression von CPK2 oder CPK20 mit QUAC1 (Abbildung 3.9.1, oben rechts bzw. unten links).

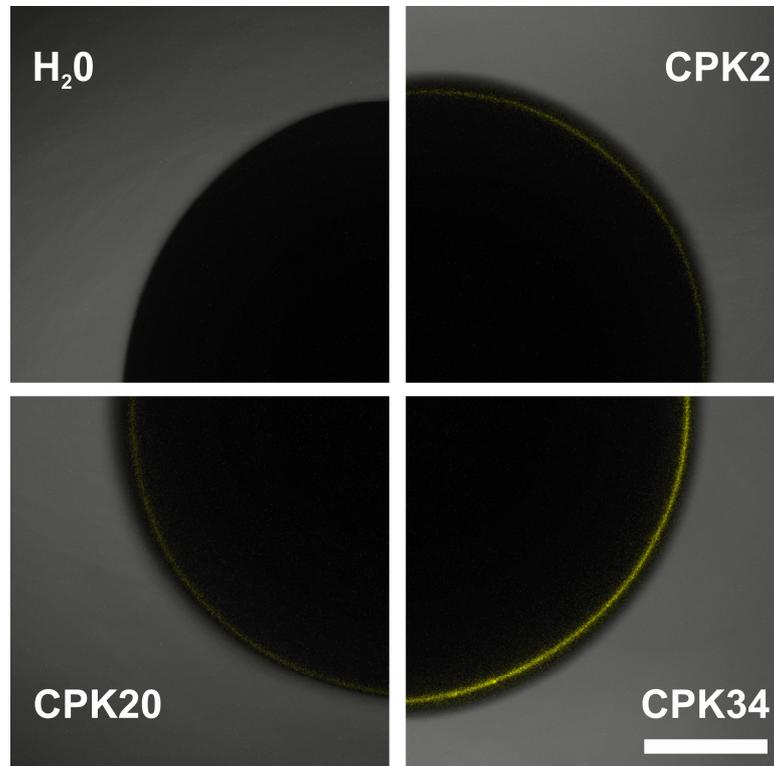


Abbildung 3.9.1: BIFC-Experimente zeigen Protein-Protein-Interaktion von QUAC1 mit CDPKs (CPK2, CPK20, CPK34). QUAC1 (YFP^{CT}::QUAC1) wurde zusammen mit den CPKs 2, 20 und 34 (YFP^{NT}::CPK2, YFP^{NT}::CPK20, YFP^{NT}::CPK34) sowie einer Wasserkontrolle für drei Tage koexprimiert. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte anschließend mittels eines LSM. Die Skala gibt 250 μ m wieder.

Die zu den in Abbildung 3.9.1 durchgeführten TEVC Messungen der Koexpression von QUAC1 mit CPK2, CPK20 oder CPK34 sind in Abbildung 3.9.2 zu sehen. QUAC1 wurde dabei sowohl in Chloridmedien (25 mM) als auch in Malatmedien (25 mM) vermessen. Die in Chloridmedien aufgenommenen Ströme unterschieden sich dabei kaum untereinander, unabhängig davon, ob eine Kinase präsent war oder nicht. Im Malatmedien wiesen die Gleichgewichtsströme den R-Typ typischen glockenförmigen Verlauf bei negativen Spannungen auf. Jedoch waren die Maximalströme (Peakströme) bei Koexpression von QUAC1 mit CPK2 und CPK20 doppelt so hoch als bei Oozyten, die nur QUAC1 exprimierten. Diese Aktivierung ging einher mit der Verschiebung des Peakstroms zu negativeren Membranpotentialen, wie es schon bei der Koexpression der Kanals mit OST1 beobachtet werden konnte (Abbildung 3.9.2). Die Koexpression von CPK34 zeigte im Vergleich zu den

beiden anderen CPKs ein völlig anderes Bild (Abbildung 3.9.2, unten rechts). Die in Malatmedien beobachtete Glockenform der Ströme war kaum zu erkennen, da der Peakstrom auf $1,5 \mu\text{A}$ sank, und sich im Vergleich zu QUAC1 alleine, somit halbierte. Da in Abbildung 3.9.1 eine deutliche Interaktion von CPK34 mit QUAC1 gezeigt wurde, scheint CPK34, im Gegensatz zu CPK2, CPK20 und OST1, die Aktivität von QUAC1 zu inhibieren. Da im Rahmen dieser Arbeit aktivierende Kinasen identifiziert werden sollten und nach Parallelen zur ABA-abhängigen Aktivierung von SLAC1 gesucht wurde, wurde der negative Effekt von CPK34 auf die QUAC1 Aktivität nicht näher untersucht.

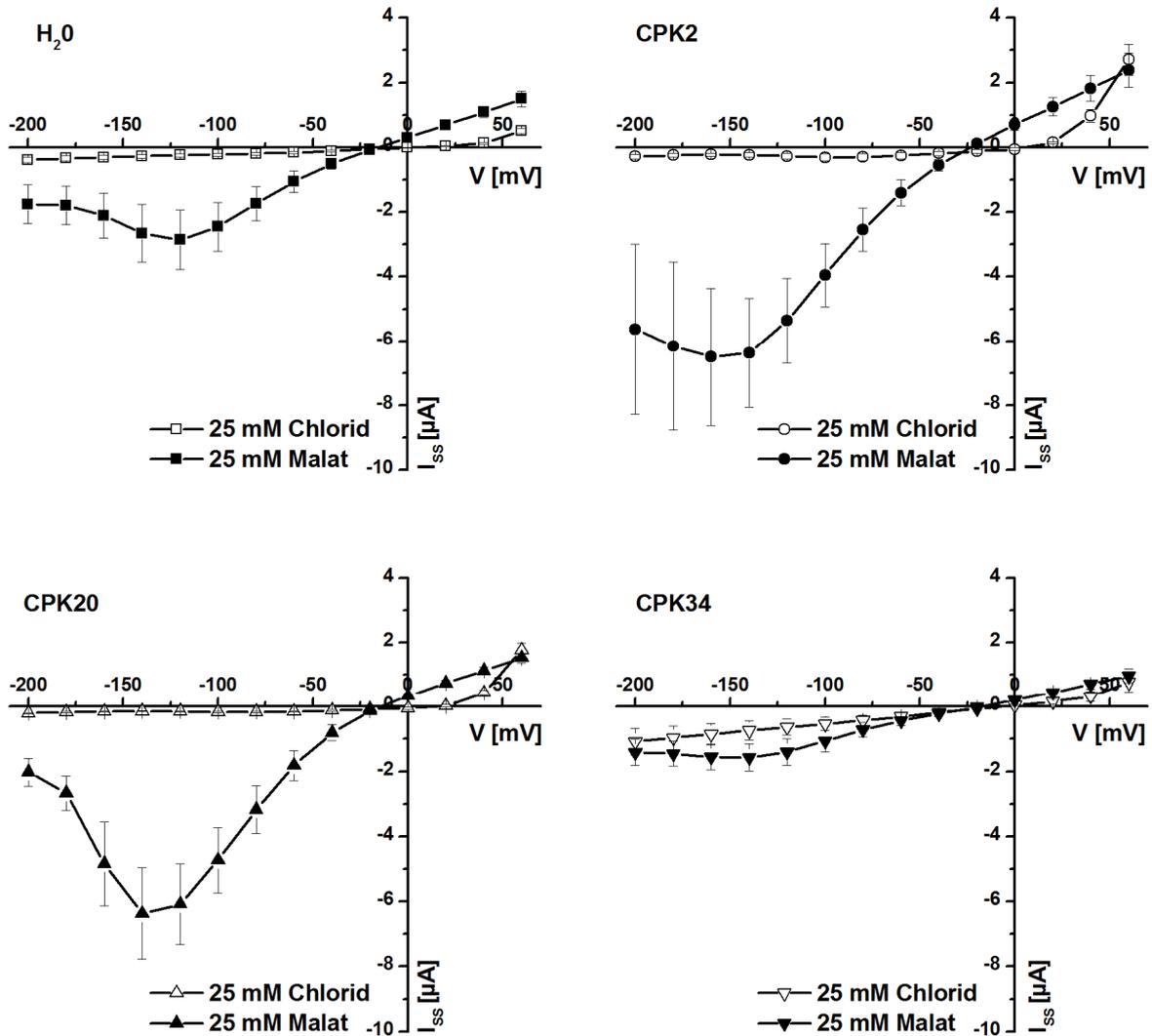


Abbildung 3.9.2: CDPKs erhöhen stark die Einwärtsströme von QUAC1. Stromspannungsdiagramme der Koexpression von QUAC1 mit verschiedenen CDPKs. QUAC1 wurde mit Wasser (oben links) sowie den CPKs 2 (oben rechts), 20 (unten links) und 34 (unten rechts) koexprimiert und mittels TEVC in Chlorid- und Malatmedien vermessen. Die Gleichgewichtsströme zeigten bei der Wasserkontrolle, CPK2 und CPK20 das typische Verhalten von QUAC1 in malathaltigen oder chloridhaltigen Medien. Die charakteristische Glockenform des R-Typs ist aber je nach koexprimierter Kinase unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei Koexpression mit CPK34 konnten keine typischen R-Typ Ströme aufgezeichnet werden. Die Anzahl der Experimente betrug Wasserkontrolle $n = 6$, CPK2 $n = 8$, CPK20 $n = 4$ und CPK 34 $n = 4$, die Punkte geben die Mittelwerte \pm Standardfehler wieder.

3.10 Orientierung des N- und C- Terminus von QUAC1

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die Topologie von ALMT Transportproteinen noch weitgehend unbekannt bzw. kontrovers diskutiert. Für eine Beschreibung der Topologie von QUAC1 ist es zunächst von essentieller Bedeutung, ob die N- und C-terminalen Enden des Proteins extra- bzw. intrazellulär lokalisiert sind. Hydrophatie-basierte Modelle (Dreyer, Gomez-Porras et al. 2012; Mumm, Imes et al. 2013) ergaben eine unterschiedliche Anzahl von Transmembrandomänen, was schließlich zu einer kontroversen Orientierung von einzelnen Transmembranlinkern und der Lokalisation der Termini des Proteins führte. Um die Lage der Termini experimentell zu bestimmen, wurde QUAC1 entweder am C-Terminus (QUAC1::YFP) oder am N-Terminus (YFP::QUAC1) mit YFP fusioniert. Nach der Expression dieser Fusionsproteine in *X. laevis* Oozyten, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an einem konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Hierbei wurde die pH-Sensitivität von YFP ausgenutzt: Die YFP Fluoreszenzintensität fällt im sauren Milieu ab, während im basischen Medium mit einer erhöhten Fluoreszenz zu erwarten ist (Young, Wightman et al. 2010).

Die Oozyten wurden während der Aufnahme der Fluoreszenz mit Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes (pH 7,2; pH 5,6; pH 5,6 +20 mM Natriumacetat) umspült (Abbildung 3.10.1). Natriumacetat liegt bei einem pH von 5,6 in seiner protonierten ungeladenen Form vor und ist somit membrangängig. Nachdem das Acetat über die Oozytenmembran in das Zytosol der Oozyte diffundiert, wird es in dem dort basischen Milieu deprotoniert und säuert das Innere der Oozyte an. Falls der N- oder C-Terminus von QUAC1 im Zytosol lokalisiert sein sollte, dann ist eine Abnahme der YFP-Fluoreszenz bei einer Perfusion mit Acetat zu erwarten. Falls einer oder beide Termini im extrazellulären lokalisiert sein sollten, dann sollte eine Abnahme der Fluoreszenz beim pH-Wechsel von 7,2 nach 5,6 zu beobachten sein. In diesem Fall sollte jedoch keine weitere Fluoreszenzabnahme bei der Zugabe von Acetat detektierbar sein.

Bei Perfusion mit ND96 Lösung von pH 7,2 war die Fluoreszenzintensität bei YFP::QUAC1 exprimierenden Oozyten konstant. Die anschließende Perfusion mit ND96 Lösung von pH 5,6 zeigte nur eine schwache Änderung der YFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.10.1). Bei Perfusion mit ND96 Lösung mit pH 5,6 +20 mM Acetat hingegen zeigte sich mit einer kurzen Verzögerung ein Absinken der Fluoreszenzintensität um 40% relativ zur Anfangsfluoreszenzintensität. Für das entsprechende YFP-Fusionskonstrukt QUAC1::YFP zeigte sich ein nahezu identischer Verlauf der Fluoreszenzintensität. Durch die Ansäuerung des

Zytosols durch die Perfusion mit Acetat sank die Fluoreszenz um 45% relativ zur Ausgangsfluoreszenz ab (Abbildung 3.10.1).

In beiden Experimenten war zu beobachten, dass ein Absinken der Fluoreszenzintensität zeitverzögert nach der Zugabe von Acetat auftrat. Dies lässt darauf schließen, dass sich sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus auf der zytosolischen Seite der Membran befinden. Eine Lokalisation der C- und N-Termini auf der extrazellulären Seite hätte eine sofortige Änderung in der Fluoreszenzintensität nach dem Wechsel zur Lösung ND96 mit pH 5,6 zur Folge gehabt.

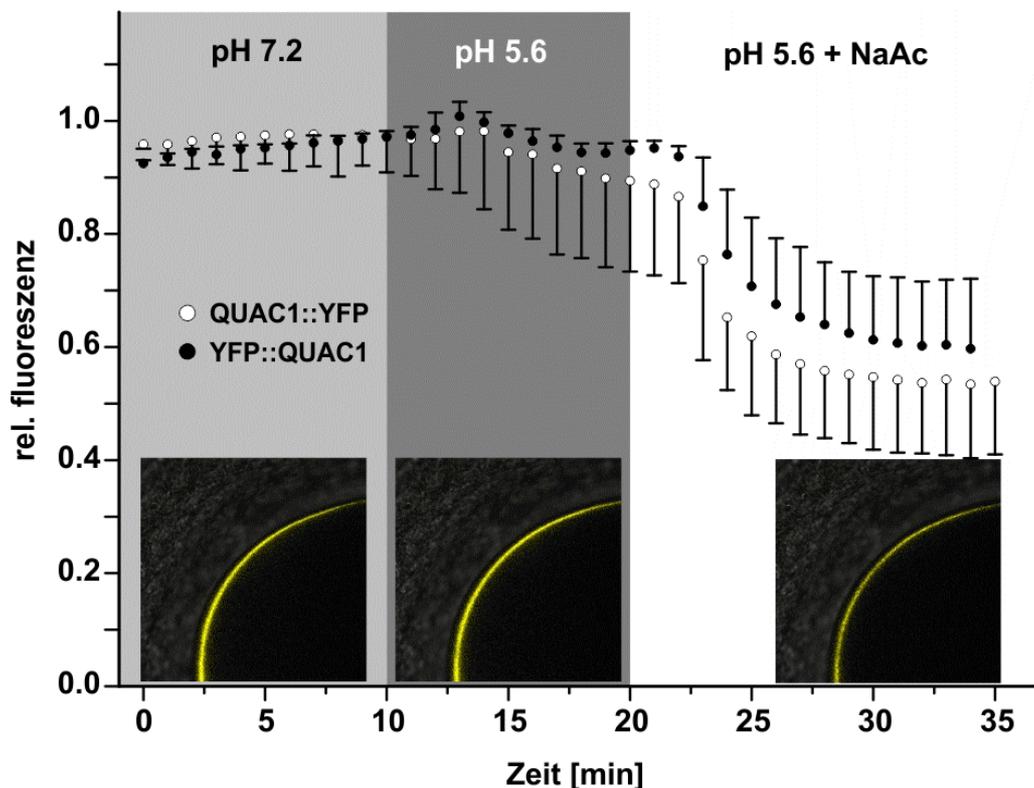


Abbildung 3.10.1: QUAC1 N- und C- Terminus befinden sich intrazellulär. Relative YFP-Fluoreszenz von QUAC1::YFP bzw. YFP::QUAC1 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten. Die dargestellten Kurvenpunkte sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\pm SD). Die weißen Punkte geben die relative Fluoreszenz von dem Konstrukt QUAC1::YFP, die schwarzen Punkte hingegen geben die relative Fluoreszenz des Konstruktes YFP::QUAC1 wieder. Die Fluoreszenzbilder zeigen die Fluoreszenz in Oozyten zum Ende des jeweiligen Perfusionsintervalls (exemplarisch dargestellt für YFP::QUAC1). Die Fluoreszenzintensität wurde alle 30 Sekunden durch Aufnahme eines Mikroskopiebildes bestimmt.

In Analogie zu den beiden vorher beschriebenen Versuchen, wurde ein Kontrollexperiment mit gleichem Aufbau durchgeführt. Hierbei wurde das Fusionskonstrukt SLAC1::YFP in Oozyten

eingbracht. Die Topologie des Kanals SLAC1 ist bekannt und es existieren 3D Kristall Struktur Modelle (Chen, Hu et al. 2010), die belegen, dass der C-Terminus von SLAC1 auf der zytosolischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Aus diesem Grund war SLAC1 ein geeigneter Kandidat, um die aus den vorherigen QUAC1 Versuchen gemachten Beobachtungen zu verifizieren. Hierzu wurde ein Konstrukt verwendet bei dem an den C-Terminus von SLAC1 YFP gekoppelt wurde (SLAC1::YFP). Wie zuvor zeigte sich bei Perfusion mit ND96 Lösung mit pH 7,2 als auch bei Perfusion mit ND96 Lösung mit pH 5,6 keine Änderung in der Fluoreszenzintensität (Abbildung 3.10.2). Nachdem hingegen mit ND96 Lösung mit pH 5,6 +20 mM Acetat perfundiert wurde, zeigte sich nach einer kurzen zeitlichen Verzögerung ein Absinken der Fluoreszenzintensität um 40 % relativ zum Anfangswert (Abbildung 3.10.2).

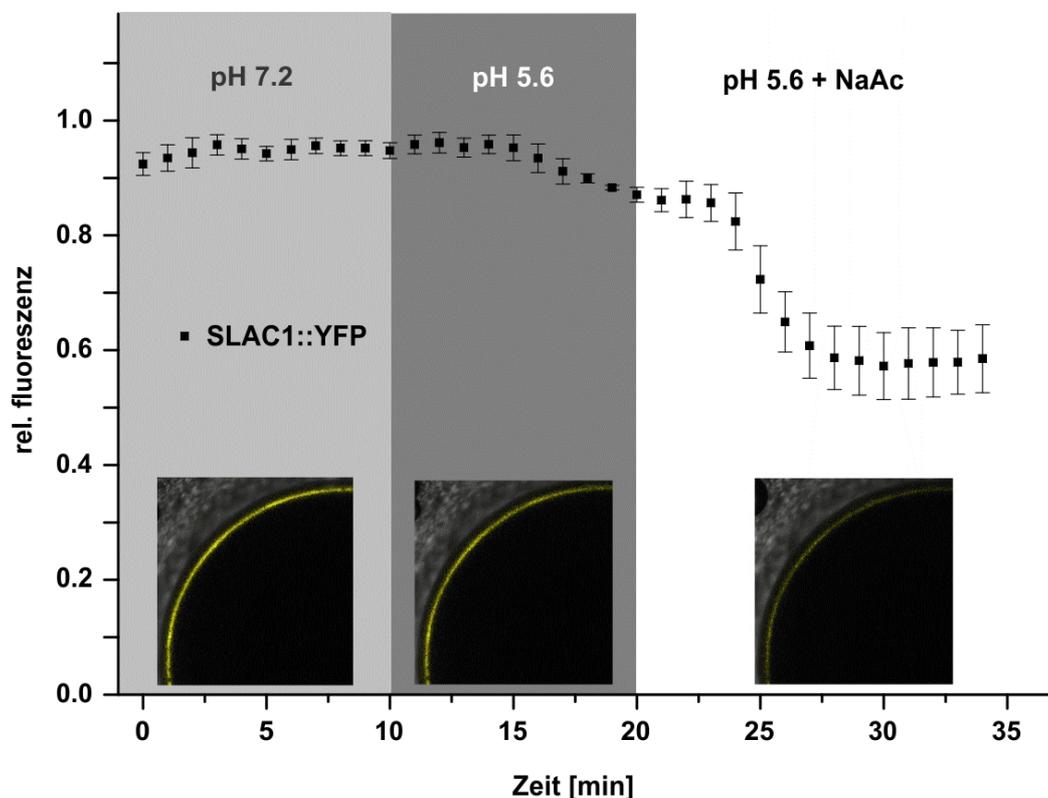


Abbildung 3.10.2: Relative YFP-Fluoreszenz von YFP::SLAC1 exprimierenden *X. laevis* Oozyten verdeutlicht Lokalisation des SLAC1 N-Terminus im Zytosol. Die dargestellten Kurvenpunkte sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\pm SD). Die Fluoreszenzbilder zeigen jeweils die Fluoreszenz von SLAC1::YFP exprimierenden Oozyten zum Ende des jeweiligen Perfusionsintervalls. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 30 Sekunden durch Aufnahme eines Fluoreszenzbildes bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 514 nm bestimmt.

Der Verlauf des Experimentes ist nahezu identisch zu den Experimenten, die mit QUAC1 durchgeführt wurden. Da sich der SLAC1 C-Terminus im Zytosol befindet, und da erst nach

Ansäuerung des Zytosols durch Zugabe von Acetat ein Absinken in der Fluoreszenzintensität stattfindet, wird die zuvor getroffene Aussage, über die Lokalisation des C- und N-Terminus von QUAC1 im Zytosol, bestätigt.

3.11 Einfluss des C- und N- Terminus auf das Verhalten von QUAC1

Zur Überprüfung der Expression des Kanals QUAC1 in Oozyten wurde dieser an das Fluorophor YFP gekoppelt (siehe Abschnitt 3.1). Hierbei wurde YFP sowohl an den N-Terminus von QUAC1 (YFP::QUAC1) als auch an den C-Terminus von QUAC1 (QUAC1::YFP) gekoppelt. Die Fusion von YFP an den N-Terminus von QUAC1 zeigte keine Änderung der elektrischen Eigenschaften im Vergleich zu dem QUAC1 Wildtyp (Abbildung 3.11.1 a; vergleiche Abbildung 3.2.1; 3.3.2; 3.8.2). Interessanterweise sorgte die Fusion von YFP an den C-Terminus von QUAC1 für eine konstitutive spannungsunabhängige Aktivität von QUAC1. Die instantanen Ströme, die nach einer Voraktivierung durch einen Spannungssprung zu +60 mV aufgenommen wurden, wiesen ähnliche Stromstärken auf, wie der WT oder das N-terminal Fusionskonstrukt. QUAC1::YFP exprimierende Oozyten wiesen jedoch keine schnelle Deaktivierungskinetik auf. So waren auch bei stark hyperpolarisierenden Membranpotentialen starke Gleichgewichtsströme zu observieren (Abbildung 3.11.1 b). Eine vergleichende Auswertung der Gleichgewichtsströme von den Konstrukten YFP::QUAC1 und QUAC1::YFP (Abbildung 3.11.1 c) zeigte deutlich, dass diese im Bereich von +60 mV bis zu -50 mV für beide Konstrukte gleich verliefen. Bei Spannungen negativer als -60 mV nahmen die Gleichgewichtsströme beim Konstrukt QUAC1::YFP weiter linear zu, während YFP::QUAC1 exprimierende Oozyten kaum negative Ströme zeigten, wie es für QUAC1 in Chlorid-basierten Medien typisch ist.

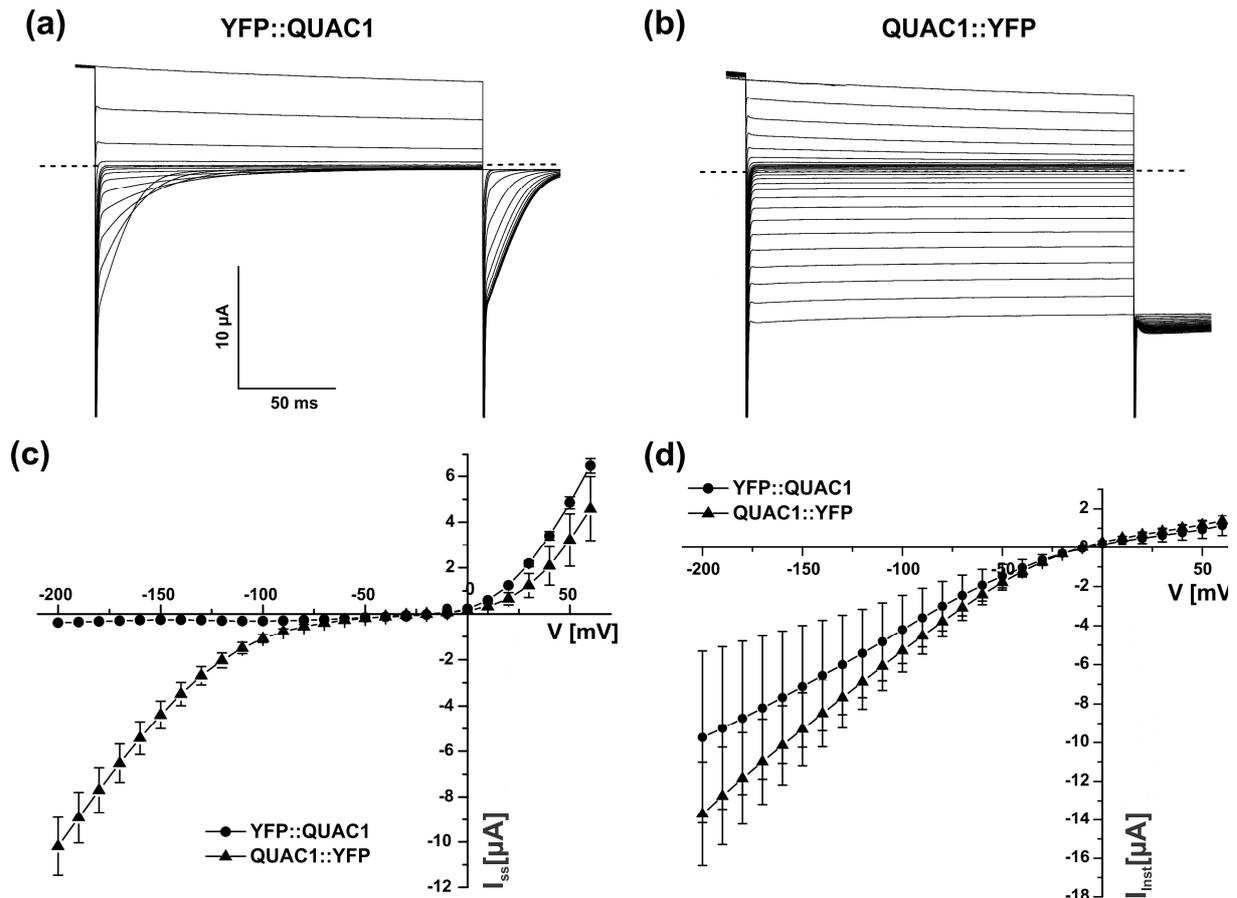


Abbildung 3.11.1: C-terminale Fusion von YFP an QUAC1 ändert die Spannungsabhängigkeit des Kanals. In (a + b) sind beispielhafte Stromantworten von YFP::QUAC1 (a) und QUAC1::YFP (b) abgebildet. (c) zeigt, die aus ähnlichen Messungen wie in a + b gewonnen Gleichgewichtsströme und (d) gibt die dazugehörigen instantanen Ströme wieder. Die Messungen wurden in 25 mM Standardchloridmedium durchgeführt. Die dargestellten Stromantworten in (a + b) wurden nach dem Aktivierungspuls (+60 mV) bei Testspannungen von +60 mV bis – 200 mV in 20 mV schritten aufgezeichnet. Die Datenpunkte geben den Mittelwert \pm Standardfehler wieder. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 4$

Die in Abbildung 3.11.1 gemachten Beobachtungen wurden in 25 mM Chloridmedium durchgeführt. Da für die typische Ausbildung der R-Typ Ströme von QUAC1 Malat im Zytosol präsent sein muss (vergleiche Abschnitte 3.3- 3.5), wurden identische Experimente in Gegenwart von 18 mM intrazellulärem Malat wiederholt. Wie zuvor bei QUAC1 WT konnte bei dem YFP::QUAC1 Konstrukt die typische Ausprägung der R-Typ Ströme verzeichnet werden, welche sich in einer starken Deaktivierung der instantanen Ströme (Abbildung 3.11.2 a) und auch in der Ausprägung einer R-Typ charakteristischen Glockenkurve zeigte (Abbildung 3.11.2 c). Die C-terminale YFP Fusion (QUAC1::YFP) zeigte aber, wie bei den Experimenten mit unbeladenen Oozyten, einen Verlust der R-Typ spezifischen Eigenschaften

und einen linearen Verlauf der Einwärtsströme (Abbildung 3.11.2 b + c). Aufgrund des Verhaltens von QUAC1::YFP - und um sicher zu stellen, dass YFP::QUAC1 nicht doch in seiner Fähigkeit auf Malat zu reagieren gestört war - wurden YFP::QUAC1 exprimierende Oozyten chlorid- und malathaltigen Medien ausgesetzt, um die typische Verschiebung des Peakstroms in Anwesenheit von Malat zu dokumentieren (Abbildung 3.11.2 d). Hierzu wurden mit Malat beladene Oozyten entweder einer 25 mM Chloridlösung oder einer 10 mM Malatlösung ausgesetzt. Im Chloridmedium zeigte YFP::QUAC1 einen Peakstrom von 4,5 μA , welcher bei -120 mV lag.

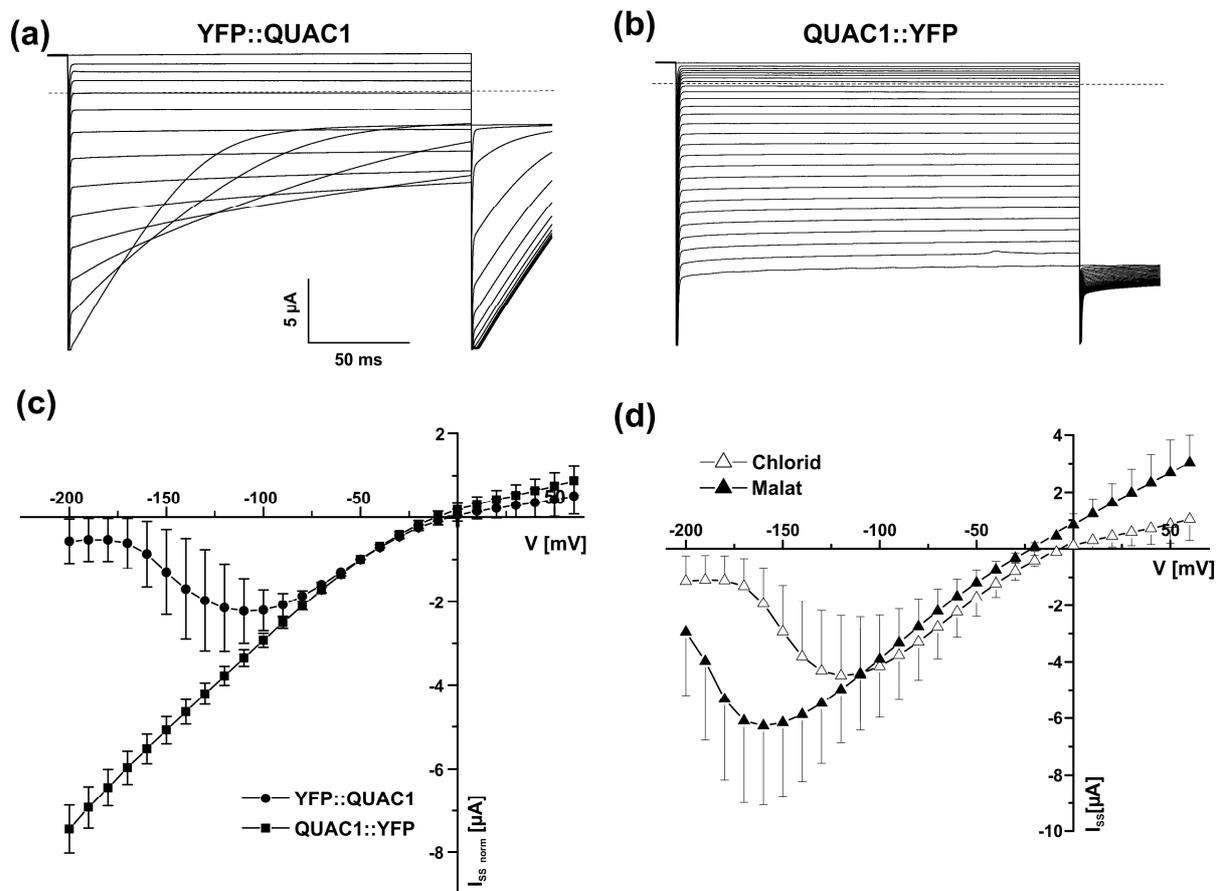


Abbildung 3.11.2: Auswirkungen der N- und C-terminaler Fusion von YFP auf die Gleichgewichtsströme und instantanen Ströme von QUAC1 in Gegenwart von intrazellulärem Malat. Die Oozyten wurden vor den Messungen mit 200 mM Malat beladen, was eine intrazelluläre Konzentration von 18 mM Malat zur Folge hatte. (a + b) zeigen beispielhafte Stromantworten von (a) YFP::QUAC1 und (b) QUAC1::YFP exprimierenden Oozyten. (c) zeigt normierte Gleichgewichtsströme bei einer Membranspannung von -50 mV. In (d) sind die Gleichgewichtsströme von YFP::QUAC1 in Gegenwart von Chlorid oder Malat im Außenmedium abgebildet. Die Messungen in (a – c) wurden in 25 mM Standardchloridmedium durchgeführt. In (d) wurde zusätzlich mit einer 10 mM Malatlösung gearbeitet. Die Datenpunkte geben den Mittelwert \pm Standardfehler wieder. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3 - 5$.

Eine Perfusion mit Malatmedium erhöhte sich der Maximalstrom auf $6,2 \mu\text{A}$ und lag bei einer Spannung von -160 mV (Abbildung 3.11.2 d). Dieses Verhalten entsprach dem Verhalten von QUAC1 WT aus den Abschnitten 3.3 – 5. Aus den Experimenten kann also geschlossen werden, dass eine N-terminale Fusion von YFP an QUAC1, den Kanal nicht in seinen elektrischen Eigenschaften beeinflusst.

In Abbildung 3.11.3 sind die normierten Instantan- und Gleichgewichtsströme von YFP::QUAC1 (Abbildung 3.11.3 a) als auch von QUAC1::YFP (Abbildung 3.11.3 b) im direkten Vergleich zu sehen. Während für YFP::QUAC1 die charakteristischen Kurvenverläufe für die I_{Inst} als auch für die I_{SS} zu verzeichnen sind, ist für die normierten Ströme von QUAC1::YFP besonders gut zu erkennen, wie die instantanen Ströme durch die C-terminale Fusion ihre Glockenform verlieren, und sich dem linearen Verlauf den Gleichgewichtsströme angleichen. Dieser Vergleich verdeutlicht besonders gut den völligen Verlust der Spannungsabhängigkeit von QUAC1, wenn eine C-terminale Fusion mit YFP vorliegt.

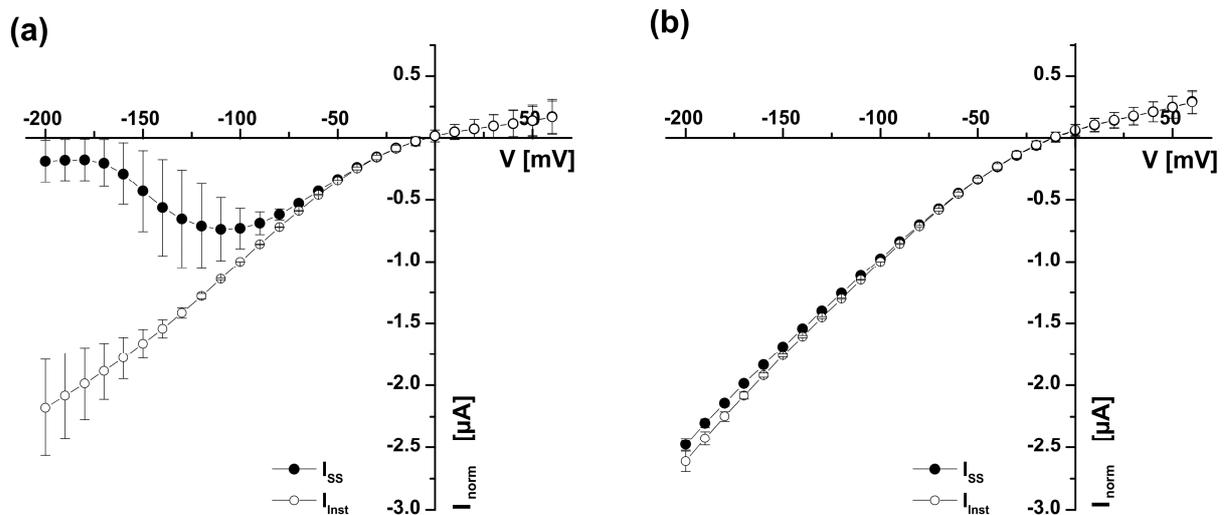


Abbildung 3.11.3: Direkter Vergleich von normierten Strömen zeigt den Verlust der Spannungsabhängigkeit in den Gleichgewichtsströmen von QUAC1::YFP. In (a) sind die normierten I_{SS} und I_{Inst} des Konstruktes YFP::QUAC1 und in (b) die normierten I_{SS} und I_{Inst} des Konstruktes QUAC1::YFP abgebildet. Die Ströme wurden auf den instantanen Strom bei einer Spannung von -100 mV normiert. Die Messungen wurden mit Malat beladenen Oozyten (18 mM Endkonzentration) in 25 mM Standardchloridmedium durchgeführt. Die Datenpunkte geben den Mittelwert \pm Standardfehler wieder. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3 - 4$

3.12 Veränderungen des QUAC1 C-Terminus führen zum Verlust der Kanalfunktion

Die Struktur, Topologie und die Lage von funktionellen Domänen in ALMT Transportproteinen ist weitgehend unbekannt. Die Fusion von YFP an den C-Terminus von QUAC1 (Abschnitt 3.11) lässt vermuten, dass die Funktionalität von QUAC1 bereits durch eine strukturelle Änderung oder durch die Einschränkung der Beweglichkeit des C-Terminus beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass grundlegende funktionelle Domänen des Kanals im C-terminalen Bereich von QUAC1 lokalisiert sein könnten. Um der Funktion des C-Terminus von QUAC1 näher zu kommen, wurden zielgerichtete Mutagenesen und Deletionsmutanten angestrebt. Zum Design der mutierten Kanäle wurde auf die QUAC1 Topologievorhersage von TmConsens (ARAMEMNON) zurückgegriffen. Dieses Modell sagt sechs Transmembranen vorher (TMI AS 48-68, TMII AS 75 – 95, TMIII AS 100 – 120, TMIV AS 127 – 147, TMV 156 – 176, TMVI 188-208) und dass sich sowohl der N- und C-Terminus im Zytosol der Zelle befinden (siehe Abschnitt 3.10). Der lange C-terminale Bereich erstreckte sich laut Modell von AS 209 - 561.

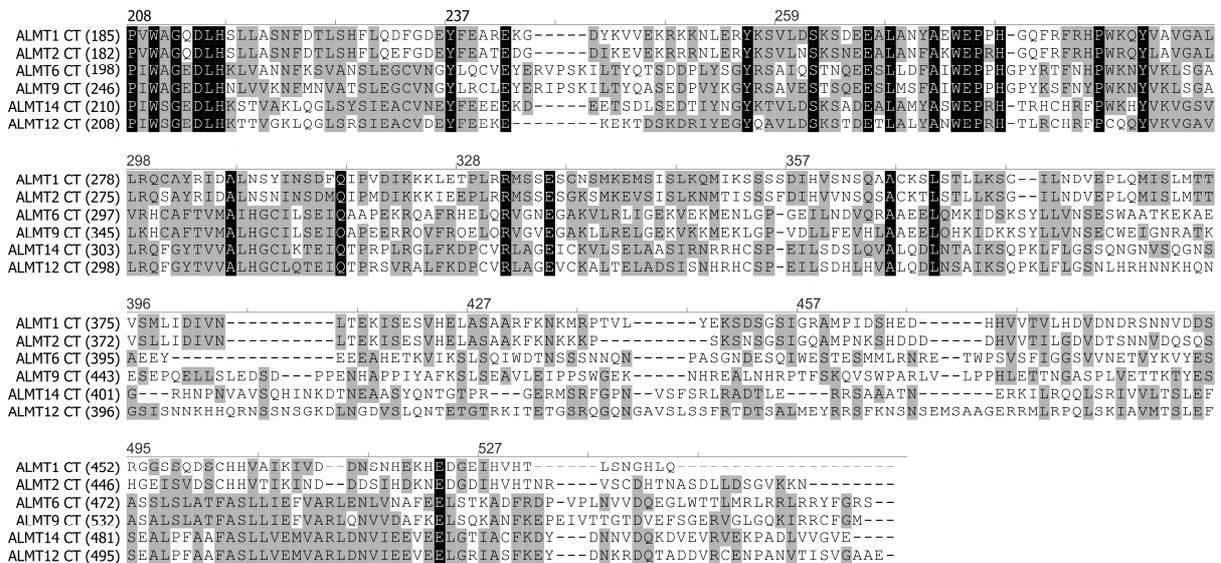


Abbildung 3.12.1: Sequenzvergleich der C-Termimi von AtALMT1, AtALMT2 (Klade I), AtALMT6, AtALMT9 (Klade II), AtALMT14 (Klade III) im Vergleich zu dem C-Terminus von QUAC1 (AtALMT12, Klade III). Schwarzer Hintergrund / weiße Buchstaben = identische AS, grauer Hintergrund / schwarze Buchstaben = hoch konservierte oder Abschnitt von gleichen AS, weißer Hintergrund / schwarze Buchstaben = ungleiche AS, Strich = Lücke. Die Zahlen in den Klammern geben die jeweiligen Start-AS des C-Terminus des betreffenden Gens wieder. Die Zahlen über dem Alignment geben die Positionen der AS im QUAC1 Protein an. Multiple Alignments wurden mit dem blosum62mt2 Algorithmus mit einer gap open penalty von 10 im Programm Vector NTI (Invitrogen, Germany) erstellt.

Ein Sequenzvergleich des C-Terminus von QUAC1 mit den C-Termini von anderen Vertretern der QUAC1/ALMT-Familie enthüllte besonders stark konservierte und sehr variable Bereiche zwischen den Vertretern dieser Familie (Abbildung 3.12.1). Auf Grundlage der *in silico* Untersuchungen wurden Deletions- und Punktmutanten erstellt (Abbildung 3.12.2), mit deren Hilfe die Funktion des C-Terminus besser aufgeklärt und etwaige funktionelle Abschnitte identifiziert werden sollten.

Die Entfernung des gesamten C-Terminus (QUAC1 Δ 218-561, Abbildung 3.12.2) führte zu einem infunktionellen QUAC1 Protein. Auch eine Koexpression des C-Terminus (QUAC1 Δ 2-218) zusammen mit dem N-terminalen Abschnitt von QUAC1 (QUAC1 Δ 218-561) zeigte keine wahrnehmbaren Ströme. Dies zeigte, dass makroskopische Ströme von QUAC1 nur emittiert werden konnten, wenn der C-Terminus vorhanden und direkt mit dem N-Terminus verbunden war. Nachdem eine totale Trunkierung des C-Terminus zur Inaktivität von QUAC1 führte, wurde ein kleiner nicht konservierter Abschnitt innerhalb des C-Terminus von QUAC1 deletiert. Diese Mutante QUAC1 Δ 377-448 zeigte Ströme und Kinetiken, wie sie im Wildtyp vorhanden waren (Abbildung 3.12.2, Tabelle 3.12.1). Von dieser funktionellen Mutation ausgehend wurden weitere Mutanten erstellt, indem schrittweise immer größere Bereiche aus dem C-Terminus herausgenommen wurden, indem man die Deletion in Richtung des N-Terminus verlängerte (QUAC1 Δ 356-448, QUAC1 Δ 323-448, QUAC1 Δ 284-448, QUAC1 Δ 234-448, Abbildung 3.12.2). Jedoch reichte bereits eine Verlängerung des Deletionsbereichs um 20AS (QUAC1 Δ 356-448) aus, um die QUAC1 typischen Ströme vollständig zu verlieren. Bei Expression der weiteren drei Mutanten in Oozyten (QUAC1 Δ 323-448, QUAC1 Δ 284-448, QUAC1 Δ 234-448) konnten ebenfalls keine Ströme aufgezeichnet werden. Nach diesen Ergebnissen wurde der bisher nicht berücksichtigte Rest des C-Terminus (448 - 561) in zwei Teile unterteilt und die Mutanten QUAC1 Δ 448-533 und QUAC1 Δ 533-561 erstellt (Abbildung 3.12.2). Da beide Bereiche ebenfalls nicht besonders stark konserviert waren, bestand Hoffnung hier eine funktionelle Mutation zu finden. Jedoch zeigten auch diese beiden Mutanten keine QUAC1 typischen Stromantworten. Hier sollte besonders hervorgehoben werden, dass selbst die Trunkierung des kurzen variablen Bereichs 533 - 561 ausreichte, die QUAC1 Aktivität zu zerstören. Die N-terminale Deletionsmutante QUAC1 Δ 2-21 hatte dagegen keine Auswirkungen auf die Funktionalität von QUAC1 (Tabelle 3.12.1). Da viele der Deletionsmutanten die Funktion von QUAC1 vollständig zerstörten, wurden im Folgenden kürzere Bereiche im C-Terminus deletiert (QUAC1 Δ 234-284, QUAC1 Δ 284-323, QUAC1 Δ 323-356 und QUAC1 Δ 356-377 (Abbildung 3.12.2)). Jedoch waren auch diese Mutanten

elektrisch still und ließen somit keine Aussagen über eventuelle funktionelle Domänen im QUAC1 C-Terminus zu.

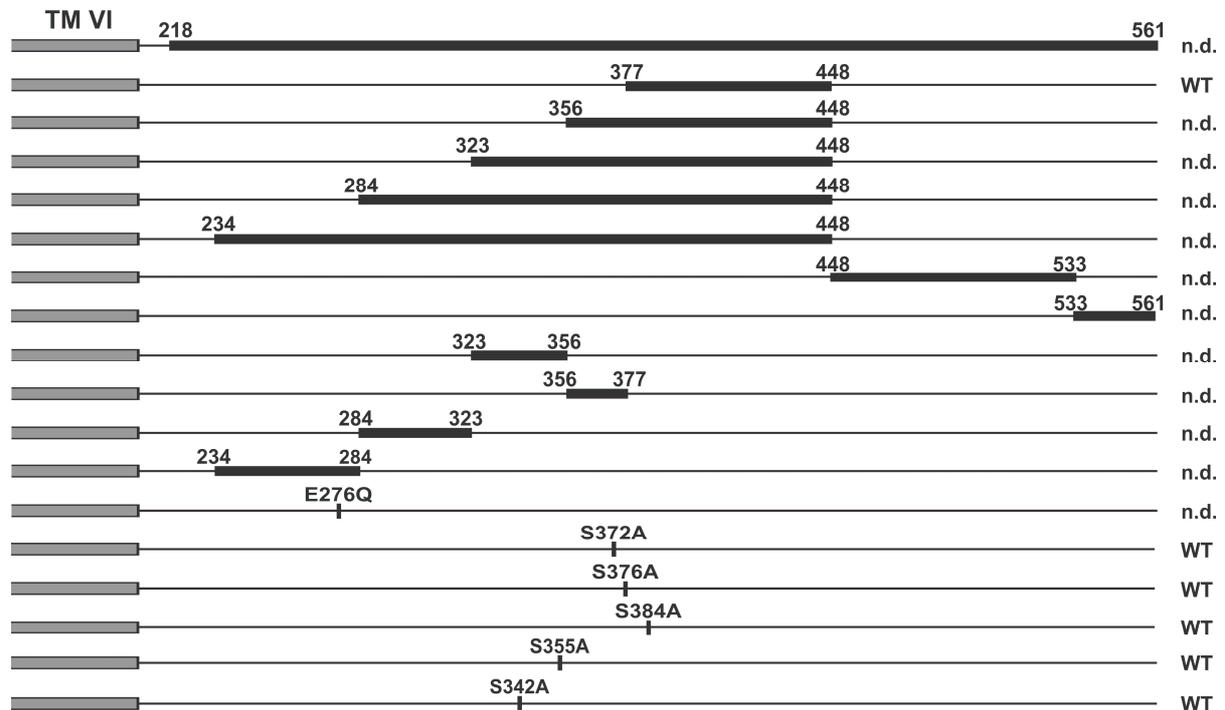


Abbildung 3.12.2: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten und Punktmutationen von QUAC1.

Abgebildet sind die letzte Transmembrane VI (grau) von QUAC1 (AS 188 – 208, nach dem Vorhersagemodell TmConsens (ARAMEMNON)), sowie der C-terminale Teil des Proteins. Die schwarzen Bereiche stellen die aus dem C-Terminus deletierten Abschnitte dar. Die Zahlen geben die jeweilige erste und letzte Aminosäure aus den deletierten Bereichen wieder. Im unteren Teil der Abbildung sind die vorgenommenen Punktmutationen wiedergegeben. Die Position und die Art des Aminosäureaustausches sind angegeben. In der Spalte rechts neben den Illustrationen wird die Stromantwort der Mutanten wiedergegeben, wobei n.d. für nicht detektierbar und WT für Wildtyp ähnliche Ströme steht.

Im Alignment aus Abbildung 3.12.1 fällt besonders auf, dass bei allen verwendeten Mitgliedern der ALMT-Familie, ein identisches/konserviertes WEP-Motiv (QUAC1 AS 275 - 277) im C-Terminus auftaucht. Dreyer *et al.* konnten dies sogar noch stärker verdeutlichen, da in einem Sequenzvergleich von über 400 ALMT Proteinen dieser stark konservierte Bereich beschrieben wurde (Dreyer, Gomez-Porrás *et al.* 2012). Das WEP-Motiv stellt eine wichtige Domäne für die Funktion der ALMTs dar. Punktmutationen an der Aminosäure *Glu* aus dem WEP-Motiv zeigten in TaALMT1 ein Ausbleiben der Aluminium aktivierten Einwärtsströme (Furuichi, Sasaki *et al.* 2010; Ligaba, Dreyer *et al.* 2013). In QUAC1 sorgte ein Austausch der negativ geladenen Glutamat Seitenkette gegen eine ungeladene Seitenkette (QUAC1 E276Q, Tabelle 3.12.1, Abbildung 3.12.2) für eine komplette Unterbindung der Ströme. Da die Struktur

Funktionsanalysen nur Totmutanten bzw. keine Beeinträchtigung von QUAC1 zeigten, konnte daraus nur geschlossen werden, dass der C-Terminus im Ganzen für die Funktion von QUAC1 essentiell ist.

Tabelle 3.12.1: Stromamplituden bei +60 mV und Zeitkonstanten von QUAC1 WT, Deletions-, Punkt- und Phosphorylierungsmutanten. Die Relaxationszeitkonstante τ wurde mit Hilfe einer Exponentialfunktion bestimmt. Nach einem aktivierenden Puls zu +60 mV wurde die Deaktivierungskinetik nach einem Spannungssprung zu -100 mV mit einer Exponentialfunktion beschrieben und so die Zeitkonstante τ bestimmt. Kontrollen entsprachen mit Wasser injizierte Oozyten. Zahlen in eckigen Klammern geben die Anzahl der unabhängigen Versuche an.

QUAC1 und Mutanten	Peakstrom bei +60 mV „Aktivierungshügel“ (Mittelwert \pm SE in μ A)	Zeitkonstante τ bei -100 mV (Mittelwert \pm SE in ms)
WT	3.72 \pm 0.31 [76]	43 \pm 3 [8]
Δ 2-21	1.55 \pm 0.25 [10]	42 \pm 4 [8]
Δ 377-448	3.65 \pm 0.49 [19]	34 \pm 4 [13]
S372A	4.32 \pm 0.42 [8]	21 \pm 5 [6]
S376A	5.61 \pm 0.75 [10]	31 \pm 4 [9]
S384A	5.61 \pm 0.75 [5]	54 \pm 6 [3]
E276Q	0.16 \pm 0.03 [15]	-
Kontrolle	0.29 \pm 0.05 [29]	-

Um auszuschließen, dass die Abwesenheit QUAC1-ähnlicher Ströme nicht von einer verminderten Expression herrührt, wurden die Strom-losen (Deletions-)Mutanten mit YFP oder GFP am C-Terminus fusioniert und mit der Expression des WTs oder den Strom-tragenden Mutanten verglichen. Nach drei Tagen Expression in Oozyten wurde die Fluoreszenz der Konstrukte unter einem konfokalen Laserscanningmikroskop betrachtet. Eine repräsentative Auswahl der Fluoreszenzintensitäten von Mutanten und vom WT ist in Abbildung 3.12.3 dargestellt. Sowohl der QUAC1 WT (GFP::QUAC1), als auch die funktionellen Mutanten (z.B. GFP::QUAC1 Δ 2-21, GFP::QUAC1 Δ 377-448) sowie die nicht funktionellen Mutanten (z.B. GFP::QUAC1 Δ 533-561, GFP::QUAC1 E276Q, YFP::QUAC1 Δ 234-448) zeigten eine Fluoreszenz ähnlicher Intensität, entlang des Oozytenäquators. Somit konnte eine fehlende Expression in Oozyten durch Mutation und Deletionen ausgeschlossen werden.

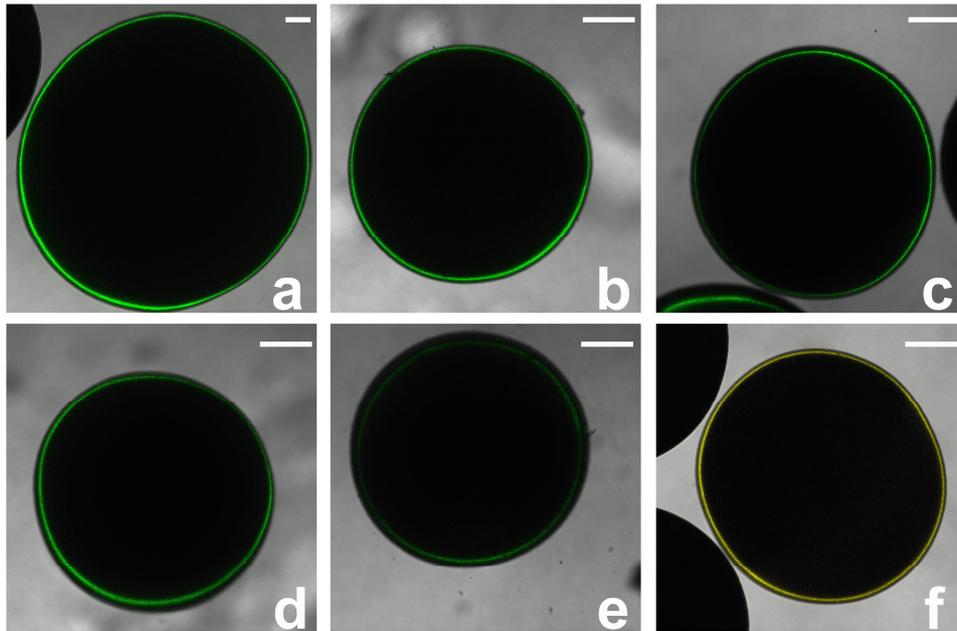


Abbildung 3.12.3: Expressionskontrolle vom QUAC1 WT und ausgewählten Mutanten durch C-terminale Fusionen mit einem Fluoreszenzmarker. Gezeigt sind beispielhaft die Fluoreszenzbilder injizierter Konstrukte: (a) GFP::QUAC1, (b) GFP::QUAC1 Δ 2-21, (c) GFP::QUAC1 Δ 533-561, (d) GFP::QUAC1 Δ 377-448, (e) GFP::QUAC1 E276Q und (f) YFP::QUAC1 Δ 234-448. eGFP wurde bei der Wellenlängen 488 nm angeregt und bei 500 - 555 nm detektiert, YFP wurde bei der Wellenlänge 514 nm angeregt und bei 525 - 600 nm detektiert. Maßstäbe (A)100 μ m, (B-F) 250 μ m.

3.12.1 Phosphorylierungsmutanten ändern nicht die Aktivität von QUAC1

In Abschnitt 3.8 und 3.9 konnte bereits gezeigt werden, dass Kinasen der CPK- und SnrK2-Familie die Aktivität von QUAC1 beeinflussen. Auch Daten von Pineros (Ligaba, Kochian et al. 2009) zeigen, dass der Phosphorylierungsstatus von ALMTs für deren Funktion von Bedeutung ist. So unterband der Kinaseinhibitor Staurosporin die Einwärtsströme von TaALMT1 in einer Konzentrations- und Zeitabhängigen Weise. Die Punktmutation S384A in TaALMT1, welche eine Phosphorylierung an diesem Serin verhindert, besaß zudem in An- und Abwesenheit von Al^{3+} stark verringerte Ströme im Vergleich zum TaALMT1 WT. Auf Grund von Pineros Daten und der CDPK-SnrK Interaktion wurden Anhand des Alignments aus Abbildung 3.12.1 konservierte Serinseitenketten identifiziert, an denen eine Phosphorylierung durch Kinasen stattfinden könnte. Um den Verlust dieser Phosphorylierungsstellen herbeizuführen wurden, wie bei Pineros, die jeweiligen Serine gegen ein Alanin ausgetauscht. Somit wurde eine putative Phosphorylierung durch Oozyten endogene Kinasen unterbunden. Die so erstellten Punktmutanten QUAC1 S372A, QUAC1 S376A, QUAC1 S384A, QUAC1 S342A und QUAC1 S355A (Abbildung 3.12.2) zeigten aber keine Veränderung in ihrem

Peakstrom bei +60 mV und in ihrer Zeitkonstante der Deaktivierungskinetik nach einem Spannungssprung zu -100 mV im Vergleich zum QUAC1 Wildtyp (Tabelle 3.12.1).

4 Diskussion

Bei Landpflanzen ermöglicht die Regulation der Stomaweite den Gasaustausch mit der Umwelt und verhindert zugleich einen exzessiven Verlust von Wasser. Das Schließen der Stomata wird über die schnelle ABA-Signalkaskade gesteuert (Hedrich 2012). Eine exogene Gabe von ABA auf Schließzellen löst R- und S-Typ Ströme aus (Raschke, Shabahang et al. 2003; Hedrich 2012), welche das Membranpotential der Schließzellmembran depolarisieren lassen (Abbildung 1.8.1). Dies wiederum führt zur Aktivierung von spannungsabhängigen K⁺-Auswärtsgleichrichtern und zum Turgor-gesteuerten Stomaschluss (Abbildung 1.8.1). Als Ursprung der S-Typ Ströme wurden die SLAC/SLAH Kanäle identifiziert (Vahisalu, Kollist et al. 2008; Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010; Geiger, Maierhofer et al. 2011; Scherzer, Maierhofer et al. 2012; Maierhofer, Diekmann et al. 2014). Der genetische Ursprung der R-Typ Ströme hingegen war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Mehrere Kandidaten für R-Typ Kanäle wurden als Ursprung dieser Ströme vorgeschlagen (CFTR, CLCs, AtTMEM16a / Abschnitt 1.5.2). Jedoch qualifizierte sich keiner als Ursprung der R-Typ Ströme. Erst die Betrachtung von AtALMT12 brachte einen neuen vielversprechenden R-Typ Kandidaten zu Tage. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Enrico Martinoia konnte gezeigt werden, dass AtALMT12 in der Plasmamembran der Schließzellen lokalisiert ist (Meyer, Mumm et al. 2010). Gaswechsellmessungen an AtALMT12 Verlustmutanten (*almt12-1*, *almt12-2*) aus *Arabidopsis* zeigten höhere Verdunstungsraten bei Hell/Dunkel Transition als der entsprechende WT. Zudem besaßen *almt12-1* und *almt12-2* einen langsameren und unvollständigen Stomaschluss bei ABA-Gabe. Dies wies daraufhin, dass ALMT12 eine Rolle beim ABA- und Licht/Dunkel-abhängigen Stomaschluss besitzt. Diese Ergebnisse deuteten zum ersten Mal darauf hin, dass ALMT12 eine Komponente der bekannten R-Typ Ströme darstellen könnte. Später konnte Patrick Mumm mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zeigen, dass tatsächlich in *almt12-1* Schließzellprotoplasten eine Abnahme der R-Typ Ströme zu verzeichnen ist (Meyer, Mumm et al. 2010)(Abbildung 3.1). Mein Beitrag zu dieser Veröffentlichung war die funktionelle Charakterisierung des ALMT12 Proteins in *Xenopus* Oozyten mithilfe der DEVC-Technik. Die Analysen im heterologen Expressionssystem bestätigten schließlich, dass ALMT12 R-Typ-ähnliche Ströme mit schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken vermittelt.

ALMT12 exprimierende Oozyten zeigten in Chloridmedien charakteristische Ströme, die in Kontrolloozyten nicht zu finden waren. Diese Ströme besaßen bei hyperpolarisierten Membranspannungen eine schnelle Deaktivierungskinetik (Abbildung 3.2.1). Das in dieser

Arbeit verwendete Spannungspuls-Protokoll (Abbildung 2.5.3.1) war an das von Kolb *et al.* beschriebene Protokoll für die Vermessung von R-Typ Kanälen (GCAC1) angelehnt (Kolb, Marten *et al.* 1995). Die in Abbildung 3.2.1 aufgezeichneten Ströme sind stark spannungsabhängig und ähneln sehr stark denen von Kolb beschriebenen Stromkinetiken von GCAC1 aus dem Jahr 1995 ((Kolb, Marten *et al.* 1995), Figure 2). Auch die von Kolb beobachtete Aktivierungskinetik von GCAC1 ähnelt sehr stark der von ALMT12 (vergleiche Kolb 1995 (Figure 1a) mit Abbildung 3.2.2 a). Gleiches gilt für die Kinetiken aus der Arbeit von Zimmermann *et al.* ((Zimmermann, Thomine *et al.* 1994) Figure 2), in welcher ein R-Typ Kanal aus Tabak Protoplasten (TSAC) beschrieben wird. Dies sind starke Hinweise, dass ALMT12/QUAC1 tatsächlich einen Teil der R-Typ Ströme vermittelt. Durch die Versuche *in planta* als auch in Oozyten ergab sich somit ein umfassendes Bild des potentiellen R-Typ Kanals. Deshalb wurde der R-Typ Kanal ALMT12 in QUAC1 (Quick Anion Channel) umbenannt – in Analogie zu den SLAC (Slow Anion Channel) Anionenkanälen des S-Typs.

4.1 Intra- und extrazelluläres Malat offenbart R-Typ Charakteristiken von QUAC1

Malat spielt bei vielen Prozessen in der Pflanze eine wichtige Rolle. So ist Malat ein wichtiges Zwischenprodukt für die Photosynthese bei der CO₂-Fixierung in C₄- und CAM-Pflanzen. Malat ist ebenfalls ein Zwischenprodukt im Zitronensäurezyklus der Mitochondrien. Aus diesem Zyklus gehen viele Grundbausteine für weitere Synthesewege hervor. Malat repräsentiert also eine Verbindung in pflanzlichen Zellen, die ständig bedarfsgerecht synthetisiert bzw. abgebaut wird.

In *Vicia faba* Schließzellen konnte Allaway (1973) zeigen, dass die Malatkonzentration bei sich öffnenden Schließzellen von 38 mM auf 75 mM ansteigt. Malat wird dabei als osmotisch aktives Gegenion zu dem Kaliumstrom verwendet. Unter Chloridmangelbedingungen spielt Malat sogar eine noch entscheidendere Rolle. Unter solchen Bedingungen verdoppelte sich die Malatkonzentration in Schließzellen auf 145 mM (Raschke and Schnabl 1978). Apoplastisches Malat beeinflusst zudem das Öffnungsverhalten von Schließzellen und den damit assoziierten R-Typ Anionenkanälen (Hedrich and Marten 1993; Hedrich, Marten *et al.* 1994; Lee, Choi *et al.* 2008).

Extrazelluläres Malat verschiebt das spannungsabhängige Öffnen von QUAC1 zu negativeren Membranspannungen, so dass der Anionenkanal *in planta* bei physiologischen Membranpotentialen reversibel aktiviert wird. Diese malatinduzierte Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 löst Einwärtsströme (Anionenefflux) aus (Abbildung 3.3.1). Diese Einwärtsströme besaßen eine stark spannungsabhängige schnelle Deaktivierungskinetik (Abbildung 3.3.2, sowie (Mumm, Imes et al. 2013)). Durch diese Spannungsabhängigkeit von QUAC1 entstehen die R-Typ typischen glockenförmigen Ströme (Abbildung 3.3.3 a). Mit zunehmender Malatkonzentration im Außenmedium erhöhten sich die Offenwahrscheinlichkeit und damit die QUAC1-vermittelten Einwärtsströme (Abbildung 3.3.3 a). Diese Eigenschaften von R-Typ Kanälen wurden bereits von Hedrich und Marten im Jahre 1993 ausführlich beschrieben (Hedrich and Marten 1993). So konnte für GCAC1 gezeigt werden, dass extrazelluläres Malat eine transiente Aktivierung der R-Typ Ströme hervorruft. Wie für QUAC1 in *Xenopus* Oozyten, konnte auch für GCAC1 in Protoplasten auf eine externe Malat Applikation hin, sowohl eine Erhöhung als auch eine Verschiebung der Peakströme zu negativeren Spannungen beobachtet werden. Hedrich und Marten führten dies unter anderem auf eine Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit und somit auf eine erhöhte Einzelkanalaktivität zurück (Hedrich and Marten 1993). Auch für QUAC1 konnten gleiche Rückschlüsse gezogen werden, wie in Abbildung 3.3.3 b verdeutlicht wird. Hier ist gut zu erkennen, dass mit steigender externer Malatkonzentration die relative Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Spannungen verschoben wird.

Malat wirkt also als ein Ligand, der zur Aktivierung von QUAC1 beiträgt. Um zu ermitteln, ob Malat auch ein durch QUAC1 permeierendes Anion darstellt, wurde die Malatkonzentration im Außenmedium verändert und gleichzeitig die Anionenströme als Funktion der Membranspannung aufgezeichnet. Mit steigender Malatkonzentration konnte eine Zunahme der Auswärtsströme sowie eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Spannungen beobachtet werden (Abbildung 3.3.3 a). Diese Daten deuten auch daraufhin, dass Malat ein QUAC1 permeierendes Anion darstellt. Um den Beitrag von Malat an den Einwärtsströmen weiter zu belegen, wurden QUAC1 exprimierende Oozyten durch Injektion oder durch spannungsgesteuerte Beladung mit Malat beladen (Abschnitt 3.4). Durch beide Beladungsverfahren erhöhten sich die Einwärtsströme von QUAC1 dramatisch (Abbildung 3.4.2 + 3). Somit zeigt sich, dass Malat nicht nur die Spannungsabhängigkeit von QUAC1 moduliert, sondern ebenfalls als ein permeierendes Ion fungiert. Diese Daten werden zudem durch Experimente zur Verschiebung des Umkehrpotentials mit definierten intra- und extrazellulären Malatkonzentrationen unterstützt (Abschnitt 3.5). Des Weiteren konnte dadurch

gezeigt werden, dass vornehmlich zweifach geladene Malationen ($Z=2$) durch den Kanal transportiert werden (Abbildung 3.5.2.1). Die spannungsabhängige Beladung mit Malat (Abbildung 3.4.3) erklärt zudem die in Abbildung 3.3.3 a zunehmenden negativen Peakströme bei steigender Malatkonzentration. Durch die in Abbildung 3.3.3 a gewählten experimentellen Bedingungen wurden die Oozyten spannungsabhängig mit Malat beladen. So konnte Malat neben der Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 zusätzlich aus den Oozyten permeieren und so zur Erhöhung der Einwärtsströme beitragen.

Für die Modulation von QUAC1 ist eine Interaktion von Malat mit dem Kanal notwendig. Die Interaktion könnte durch eine Malatbindestelle erfolgen. Durch diese allosterische Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die relative Offenwahrscheinlichkeit des Kanals verschiebt. Auch Hedrich und Marten postulieren eine extrazelluläre Malatbindestelle für GCAC1 (Hedrich and Marten 1993), welche die Malataktivierung in GCAC1 erklärt. Die Verschiebung der relativen Offenwahrscheinlichkeit in QUAC1 durch extrazelluläres Malat spricht ebenfalls für eine extrazelluläre Malatbindestelle. Malat bindet dabei nur reversibel an den Kanal und sorgt nicht für eine dauerhafte Aktivierung. Diese Daten werden durch Abbildung 3.3.1 bestärkt. Nach Wechsel von Malat-haltigen zu Malat-freien Medien konnte ein Rückgang der Einwärtsströme beobachtet werden. Das Auswaschen von Malat, bis die Ströme auf das Ausgangsniveau in malatfreien Medien zurückkehrten, konnte bis zu 15 Minuten andauern (vergleiche Abbildung 3.3.2).

Auch wenn QUAC1 durch externes Malat stark aktiviert wird, zeigten Experimente mit intrazellulärem Malat ebenfalls eine Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Mit steigender intrazellulärer Malatkonzentration verschob sich die relative Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Spannungen (Abbildung 3.5.1.1). Die Anwesenheit von extrazellulärem Malat, zusätzlich zu intrazellulärem Malat, sorgte zudem dafür, dass sich $V_{1/2}$ (halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit) um weitere 60 – 70 mV zu negativeren Spannungen verschob (Abbildung 3.5.1.1). Aus diesen Daten ergibt sich die Frage, auf welche Weise internes Malat die Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 beeinflusst? Drei unterschiedliche Hypothesen lassen sich hierzu aufstellen. 1. QUAC1 besitzt intrazellulär eine zusätzliche Bindestelle für Malat. 2. Intrazelluläres Malat gelangt nach Außen und bindet an die äußere Malatbindestelle und aktiviert den Kanal von dort oder 3. Die Malatbindestelle liegt direkt in der Pore und ist von beiden Seiten der Membran zugänglich.

Bisher sind keine veröffentlichten Daten zu finden, die die Identifikation einer Malatbindestelle in QUAC1 zulassen würden. Auch die in dieser Arbeit erstellten Mutanten erbrachten hierzu

keine Ergebnisse, da sie entweder ein Wildtyp-ähnliches Verhalten zeigten oder nicht funktionell waren (Abschnitt 3.12). Somit kann Hypothese 1 weder untermauert noch widerlegt werden. Ein Austreten von Malat aus Malat-injizierten Oozyten, wie in Hypothese 2 vorgeschlagen wird, scheint genauso wahrscheinlich, wie eine von beiden Seiten der Membran zugängliche Malatbindestelle in der Kanalpore. Die Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 verlief additiv, d.h. die Verschiebung der rel. P_O durch intrazelluläres Malat konnte durch eine zusätzliche externe Malatgabe weiter gesteigert werden. Diese Beobachtung kann zum einen auf eine Erhöhung der Malatkonzentration in der Pore zurückgeführt werden oder auf den Ausstrom von Malat gepaart mit der extrazellulär vorhandenen Malatkonzentration. Hypothese 2 und 3 (Vorkommen einer Malatbindestelle) besitzt zudem eine Annahme weniger als Hypothese 1 (Vorkommen von zwei Malatbindestellen), was sie frei nach Ockhams Rasiermesser zu den favorisierten Hypothesen macht.

Hypothese 3 kann zudem durch bereits bekannte Fakten unterstützt werden. Der Anionenkanal SLAH2, ein homolog zu SLAC1, zeichnet sich durch eine starke Nitratselektivität aus. Zudem wird die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals durch die externe Nitratkonzentration verändert (Maierhofer, Lind et al. 2014). Dieses Verhalten ähnelt dem von QUAC1 und Malat. Maierhofer und Kollegen (Maierhofer, Lind et al. 2014) konnten das Verhalten des Kanals durch zielgerichtete Punktmutationen beeinflussen. Hierzu modellierten sie die Struktur von SLAH2 mit Hilfe von HiTehA. HiTehA ist ein entfernt verwandtes Bakterienprotein aus der SLAH-Familie, dessen Kristallstruktur bekannt ist (Chen, Hu et al. 2010). So zeigte sich, dass die Mutation von Serin 228 zu Valin (S228V) die Selektivität des Kanals veränderte. Der Kanal verlor seine Nitratspezifität und leitete zusätzlich Chlorid, und glich somit dem Verhalten von SLAC1. Wie aus dem erstellten Modell von SLAH2 hervorging, lag die mutierte Position innerhalb der Kanalpore. Neben seiner Nitratspezifität verlor der Kanal gleichzeitig auch seine Nitrataktivierung, was darauf hindeutet, dass die Nitratbindestelle ebenfalls in der Pore vorhanden ist. Ebenso ging die Nitrataktivierung von SLAH2 durch die Mutation F231A verloren. Das dabei mutierte Phenylalanin befindet sich ebenfalls in der Pore des Kanals. Diese Daten lassen annehmen, dass eine Malatbindestelle in der Pore (Hypothese 3) wohl die wahrscheinlichste Malatwahrnehmung von QUAC1 ist.

Malat zeigt auch bei anderen Vertretern der ALMT-Familie einen regulierenden Effekt. Dies wurde erst kürzlich an dem Kanal AtALMT9 beschrieben. AtALMT9 ist ein vakuolärer Malat- und Chlorid-leitender Kanal (Kovermann, Meyer et al. 2007; De Angeli, Zhang et al. 2013).

Zytosolisches Malat ist in der Lage die Offenwahrscheinlichkeit dieses ALMT Kanals zu beeinflussen. Die hierfür notwendige Konzentration zur Kanalaktivierung befinden sich in natürlich vorkommenden physiologischen Bereichen (≤ 1 mM) (De Angeli, Zhang et al. 2013). Zudem zeigen isolierte Vakuolen aus den ALMT9 k.o.-Linien *almt9-1* und *almt9-2* geringere Malat-aktivierte Chloridströme als Kontrollen. *almt9-1* und *almt9-2* Pflanzen sind zudem nicht in der Lage ihre Stomata so schnell und weit zu öffnen wie der entsprechende Wildtyp. Dies verdeutlicht die bedeutende Rolle von ALMT9 bei der Stomaöffnung.

Im Zusammenhang mit der QUAC1-Lokalisation in Schließzellen, ergibt sich durch die Permeation von Malat durch QUAC1 ein feed-forward Mechanismus. Schließzellen besitzen stark hyperpolarisierte Membranpotentiale ≤ -180 mV. Mit steigender externer Malatkonzentration verschiebt sich die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals hin zu hyperpolarisierten Potentialen, wodurch wiederum vermehrt Malat ausströmt und der Kanal weiter aktiviert wird. Dadurch erfolgt zusammen mit den S-Typ Kanälen eine Depolarisation der Membran, welche schließlich zum Stomaschluss führt (vergleiche Abbildung 1.8.1).

Damit konnte gezeigt werden, dass QUAC1/ALMT12 neben AtALMT9 ein Vertreter der ALMT-Familie ist, der für die Regulation der Stomaweite eine wichtige Rolle spielt. ALMT9 wird für die Stomaöffnung (De Angeli, Zhang et al. 2013) und QUAC1/ALMT12 für den Stomaschluss benötigt (Meyer, Mumm et al. 2010; Imes, Mumm et al. 2013). An beiden Kanälen wird zusätzlich die zentrale Bedeutung von Malat bei der Regulation in der ALMT-Familie sowie bei der Regulation der Stomata sichtbar.

4.2 QUAC1 ist ein Chlorid leitender Kanal

In malatfreien Chlorid-basierten Medien waren kaum Einwärtsströme zu detektieren. Jedoch konnte bei depolarisierenden Spannungspulsen Auswärtsströme aufgezeichnet werden. Versuche mit verschiedenen Chloridkonzentrationen im Außenmedium offenbarten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Auswärtsströme (Anioneneinstrom) (Abbildung 3.2.2 + 3). Durch die Verschiebung des Umkehrpotentials und die konzentrationsabhängige Stromzunahme, konnte gezeigt werden, dass QUAC1 ein Chlorid-leitender Kanal ist. Die Permeation von Chlorid wurde auch für andere Mitgliedern der ALMT-Familie demonstriert (Ligaba, Maron et al. 2012; De Angeli, Zhang et al. 2013). Hierbei zeigen ZmALMT1 (Pineros, Cancado et al. 2008) und ZmALMT2 (Ligaba, Maron et al. 2012) elektrische Eigenschaften, welche QUAC1 stark ähnelten. In Stromspannungsdiagrammen von ZmALMT1 und ZmALMT2 konnte beobachtet werden, dass mit Erhöhung der extrazellulären

Chloridkonzentration eine Erhöhung der Auswärtsströme einhergeht (vergleiche (Pineros, Cancado et al. 2008) oder Figure 4 aus (Ligaba, Maron et al. 2012) mit Abbildung 3.2.3).

Die Permeation von Chlorid ist ein Charakteristikum, welches bereits für R-Typ Kanäle gezeigt wurde (Hedrich and Marten 1993; Zimmermann, Thomine et al. 1994; Kolb, Marten et al. 1995; Raschke, Shabahang et al. 2003). Jedoch zeigten R-Typ Kanäle eine typische Glockenform in Stromspannungsdiagrammen, welche bei QUAC1 in Chlorid-basierten Medien nicht beobachtet wurde. So wurde für den in Tabakprotoplasten vorkommenden R-Typ Kanal TSAC (Tobacco Suspension Anion Channel) in Patch-Clamp Experimenten eine Chlorid-Leitfähigkeit demonstriert. Durch Austausch von Chlorid gegen Glutamat in der Pipettenlösung verschwanden die glockenförmigen R-Typ Ströme von TSAC (Zimmermann, Thomine et al. 1994). Für GCAC1 konnten Marten und Hedrich eine Zunahme der glockenförmigen Einwärtsströme mit steigender externer Chloridkonzentration nachweisen (Hedrich, Marten et al. 1994). Ein Ausbleiben der R-Typ typischen Glockenform von QUAC1-exprimierenden Oozyten in Chlorid-basierten Medien kann durch das Fehlen von Malat als aktivierende Komponente erklärt werden (Abschnitt 3.3; Abschnitt 4.1).

4.3 Weitere Anionen können QUAC1 ebenfalls permeieren und modulieren

Wie aus Abbildung 3.6.1 zu erkennen ist, erhöhte eine Injektion von Sulfat die negativen Peakströme (Einwärtsströme) von QUAC1 dramatisch. Diese QUAC1 Eigenschaft ist ein weiteres Charakteristikum für R-Typ Kanäle (Roberts 2006), welches mit der Hilfe von Patch-Clamp Untersuchungen an *Arabidopsis* Hypocotyl-Protoplasten beschrieben wurde (Frachisse, Thomine et al. 1999). Frachisse *et al.* tauschten die chloridhaltige Pipettenlösung gegen die äquivalente Menge an Sulfat aus, und dies führte zu einer starken Erhöhung der R-Typ Peakströme (Einwärtsströme). Ebenfalls konnten Frachisse und Kollegen eine Modulation der R-Typ Ströme durch Sulfat zeigen. Die Erhöhung der Peakströme durch Sulfat, wurde durch die Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit zu hyperpolarisierten Spannungen bedingt. Ein ähnliches Verhalten ist auch für QUAC1 in Abbildung 3.6.1 zu erkennen. Injektion von Sulfat verschiebt die Peakströme zu hyperpolarisierten Membranspannungen. Die zuvor beschriebene Verschiebung der Peakströme durch Malat war in einer Änderung der relativen Offenwahrscheinlichkeit begründet (Abschnitt 3.3 - 3.5). Ein ähnlicher Mechanismus kann für Sulfat postuliert werden. Somit ist Sulfat ebenfalls ein permeierendes Ion als auch ein Ligand. Eine Interaktion von Sulfat an einer potentiellen Malatbindestelle könnte diesen Effekt erklären. Für Malat wird angenommen, dass es als zweifach geladenes Anion den Kanal passiert (Abschnitt 3.5.2). Zudem liegen bei dem pH-Wert der Messlösung (pH = 5,6) 76% des Malats

als zweifach negatives Anion vor. Da Sulfat bei diesen Bedingungen ebenfalls als zweifach negatives Ion vorliegt, ist eine Interaktion aufgrund der Ladung möglich. Zumal bei den Messungen aus Abbildung 3.6.1 unter Malat-aktivierten Bedingungen gearbeitet wurde, in welchen die Malatkonzentration nicht in einem gesättigten Bereich lag. Das heißt, in einem Bereich indem keine weitere Verschiebung des Peakstroms durch Malat mehr stattfinden konnte. Somit hatte Sulfat unter diesen Bedingungen einen additiven Effekt auf die Verschiebung der Peakströme. Neben dem Binden von Sulfat an die Malatbindestelle könnten diese Beobachtung aber auch durch eine separate Bindestelle für Sulfat erklärt werden, welche die Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 beeinflusst. Um diese Fragestellung endgültig zu klären, müssen jedoch weitere Experimente folgen, in welchen mit Malatkonzentrationen gearbeitet wird die im sättigenden Bereich für die Aktivierung des Kanals liegen.

In der Literatur findet man bereits Überlegungen für mehrere Bindestellen von Ionen an R-Typ Kanälen. So zum Beispiel für den Kanal GCAC1 in der Arbeit von Marten und Hedrich (Hedrich and Marten 1993). In dieser Arbeit verschob Malat die Peakströme von GCAC1 zu negativen Spannungen. Zudem bestand ein reziproker Zusammenhang zwischen der externen Chloridkonzentration und den Peakströmen von GCAC1. Die Autoren postulierten deshalb zwei Bindestellen an GCAC1: Eine, die die Offenwahrscheinlichkeit steuert (durch Malat) und eine andere, die die Leitfähigkeit beeinflusst (durch Chlorid).

Zudem wurde für GCAC1 gezeigt, dass auch weitere Anionen die relative Offenwahrscheinlichkeit des Kanals beeinflussen (Dietrich and Hedrich 1998). Für einige dieser Anionen zeigte sich, dass sie einen starken Effekt auf die relative Offenwahrscheinlichkeit nehmen, aber selbst nicht stark permeabel sind. Besonders Propionat (Salz der Propionsäure) zeigte einen besonders starken Effekt beim Verschieben der Offenwahrscheinlichkeit. Dies ist ein interessanter Befund, da Propionsäure ebenfalls wie Malat eine organische Säure ist. Es hat den Anschein, dass die Carboxyl-Gruppe der organischen Säuren in Verbindung mit ein bis zwei weiteren C-Atomen für die Regulation von GCAC1, als auch QUAC1, verantwortlich sein könnte. Eine Regulation über organische Säuren und somit über dieses Motiv konnte bereits innerhalb der ALMT-Familie beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, reguliert zytosolisches Malat die Offenwahrscheinlichkeit von AtALMT9 (De Angeli, Zhang et al. 2013). Daneben sind auch weitere organische Dicarbonsäuren in der Lage die Offenwahrscheinlichkeit von ALMTs zu beeinflussen. Experimente mit ALMT9 zeigten, dass z.B. Fumarat den Kanal stärker aktiviert als Malat (De Angeli, Zhang et al. 2013). Diese Eigenschaft scheint stark mit der Struktur der Säuren zusammenzuhängen (siehe

Abbildung 1.6.3.1). QUAC1 wurde auch durch Fumarat stark aktiviert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an einer stärkeren Permeabilität der Fumarat-Ionen liegen, oder daran, dass durch Fumarat die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst wurde. Die organische Säure Citrat hingegen blockiert AtALMT9 (Zhang, Baetz et al. 2013), und aktiviert den Kanal ZmALMT2. In ZmALMT2 exprimierenden Oozyten führte intra- und extrazelluläres Citrat zu erhöhten Einwärtsströmen (Ligaba, Maron et al. 2012). Eine Injektion von mehr als 1,5 mM Citrat in Oozyten erbrachte dabei vermehrt Leckströme, sowie eine gesteigerten Mortalität (Ligaba, Maron et al. 2012). Das unterschiedliche Verhalten von AtALMT9 und ZmALMT1 lässt eine komplexe Interaktion zwischen ALMTs und organischen Säuren vermuten. Dieser Sachverhalt sollte auch für QUAC1 untersucht werden, da eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den aktivierenden Säuren Malat und Fumarat sowie Citrat besteht.

Abschließend sollte hervorgehoben werden, dass in Oozyten die Kontrolle der zytosolischen Zusammensetzung nicht gegeben ist. Deshalb sind für eine genaue Bestimmung der Selektivität und Permeabilität von QUAC1 Patch-Clamp Versuche unabdingbar, da hier sowohl das externe als auch das interne Milieu genau bestimmt werden kann.

4.4 QUAC1 repräsentiert nur die Malat-sensitive Komponente der R-Typ Ströme in Schließzellen

Auch wenn viele Parallelen im elektrischen Verhalten von QUAC1 in Oozyten und den R-Typ Strömen in Schließzellprotoplasten zu ziehen sind, waren R-Typ Ströme in Schließzellprotoplasten von *almt12-1* Verlustmutanten weiterhin detektierbar (Meyer, Mumm et al. 2010). Dies weist darauf hin, dass QUAC1 nicht der alleinige Ursprung der R-Typ Ströme sein kann. Der Verlust von AtALMT12 in den k.o.-Pflanzen reduzierte die in Schließzellprotoplasten gemessenen R-Typ Ströme um ein Drittel (Abbildung 3.1). Da die R-Typ Ströme nicht vollständig verschwanden, muss es weitere R-Typ Kanäle geben, die die beobachtete Stromantwort vermitteln. Der phylogenetische Stammbaum der ALMTs offenbart, dass sich neben QUAC1/AtALMT12 auch die beiden Proteine AtALMT13 und AtALMT14 in der Klade 3 befinden (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). AtALMT13 und AtALMT14 zeigen zudem wie QUAC1 eine Lokalisation in der Plasmamembran von Schließzellen (Meyer, Mumm et al. 2010; Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Aufgrund der Homologie zu QUAC1 und derselben Lokalisation kommen die beiden Vertreter als weitere Bestandteile der R-Typ Ströme in Frage. Um diese Vermutung eindeutig zu beweisen, müssen zukünftig DEVC-Experimente mit ALMT13 und 14 durchgeführt und *almt12/13/14* tripple k.o.-Mutanten

generiert werden, um durch einen vollständigen Verlust der R-Typ Ströme die genetische Herkunft der R-Typ Kanäle zu beweisen.

Wie die Arbeit von Zhang und Kollegen (Zhang, Baetz et al. 2013) an ALMT9 zeigte, setzt sich der funktionierende Kanal aus Dimeren bzw. Tetrameren des ALMT9 Proteins zusammen. Von Kaliumkanälen der Shaker-Familie ist ähnliches bekannt (Dreyer and Uozumi 2011; Sharma, Dreyer et al. 2013). Hier konnte sogar gezeigt werden, dass Untereinheiten von verschiedenen Kaliumkanälen eine funktionale Kanalpore bilden können. Wenn neben ALMT12/QUAC1 auch ALMT13 und ALMT14 an der R-Typ Antwort beteiligt sind, wäre es interessant zu wissen, ob auch hier unterschiedliche Untereinheiten der ALMT-Proteine zu funktionierenden Kanälen assemblieren.

4.5 QUAC1 zeigt keine Aktivierung durch Aluminium

Anders als z.B. TaALMT1 aus Weizen (*Triticum aestivum*) (Sasaki, Yamamoto et al. 2004; Pineros, Cancado et al. 2008; Zhang, Ryan et al. 2008) oder das Homolog AtALMT1 aus *A. thaliana* (Kobayashi, Hoekenga et al. 2007), zeigte QUAC1 keine Reaktion auf die externe Gabe von Aluminiumionen. Wie in Abbildung 3.7.1 deutlich zu sehen ist, bestehen keine Unterschiede in den Stromverläufen in An- oder Abwesenheit von Aluminiumionen im Außenmedium. Auch ist kein Unterschied in den Maxima der Ströme zu erkennen. Um auszuschließen, dass ein Effekt von Aluminium erst auftritt, wenn der Kanal bereits durch Malat aktiviert wurde bzw. dass eine synergistische Beziehung zwischen Malat und Aluminium zu dem Kanal besteht, wurde Aluminium dem Badmedium zugegeben - bei gleichzeitiger intrazellulärer Gabe von Malat (Abbildung 3.7.1 a + b). Jedoch zeigte auch dieser Versuchsaufbau keinen aktivierenden oder inhibierenden Effekt von Aluminium auf QUAC1. Malat ist in der Lage Aluminiumionen zu chelatieren (siehe Abschnitt 1.6). Da bei Malat injizierten Oozyten (Abbildung 3.7.1 b) das Austreten von Malat nicht auszuschließen war, wurde die Konzentration von Aluminium in den Außenlösungen mit 1 mM Al³⁺ sehr hoch gewählt. Hierdurch sollte dem chelatierten Aluminium entgegengewirkt werden. In ähnlichen Studien wurden Konzentrationen von 100 µM Al³⁺ erfolgreich verwendet, um die Aktivierung von ALMTs durch Aluminium zu zeigen (Hoekenga, Maron et al. 2006). Eine standardmäßige Verwendung von Lanthanchlorid (ebenfalls ein dreiwertiges Metallion) in den Lösungen zeigte auch keine Aktivierung des Kanals. Dies wurde in Vorversuchen mit und ohne Lanthan-haltigen Lösungen erprobt. Verschiedene Daten aus der Literatur zeigen ebenfalls, dass Lanthan-haltigen Lösungen Mitglieder der ALMT-Familie nicht aktivieren (Ligaba, Katsuhara et al. 2006; Kobayashi, Hoekenga et al. 2007; Zhang, Ryan et al. 2008).

Diese Ergebnisse machten eine Zuordnung von QUAC1 zu den Mitgliedern der ALMT-Familie möglich, die nicht Aluminium aktiviert sind, wie z.B. ZmALMT1 (Pineros, Cancado et al. 2008). Eine Aktivierung des Kanals durch Aluminiumionen wäre auch fragwürdig, da durch die Lokalisation von QUAC1 in der Plasmamembran der Schließzellen (Meyer, Mumm et al. 2010), selten ein Kontakt mit Al^{3+} entsteht. Im Gegensatz dazu ist für Wurzel-lokalisierte ALMTs wie z.B. AtALMT1 (Hoekenga, Maron et al. 2006; Kobayashi, Hoekenga et al. 2007) ein Al^{3+} gesteuerter Mechanismus sinnvoll.

Diese Beobachtung wurde zusätzlich durch eine phylogenetische Gruppierung von QUAC1 zu Klade 3 der ALMTs unterstützt. Sie zeigen also eine große genetische/strukturelle Distanz zu den Al^{3+} sensitiven ALMTs, darunter AtALMT1, TaALMT1 und BnALMT1, die in Klade 1 eingruppiert wurden. Wie Ligaba *et al.* (Ligaba, Dreyer et al. 2013) erst kürzlich zeigten, besitzen die Mitglieder der Klade 1 ein vereinendes N-terminales Aminosäuremotiv, welches mit der Al^{3+} -Perzeption assoziiert sein könnte.

Das hoch konservierte WEP-Motiv, welches mit der Al^{3+} -Perzeption in Verbindung gebracht wurde (Furuichi, Sasaki et al. 2010), scheint jedoch nicht für diese Funktion zuständig zu sein. Vielmehr resultiert die Al^{3+} Insensivität der Mutanten im WEP-Motiv, die Furuichi *et al.* beschrieben, durch eine Störung der allgemeinen strukturellen Integrität des TaALMT1 Moleküls. Ligaba *et al.* (Ligaba, Dreyer et al. 2013) zeigten, dass Mutationen in anderen hoch konservierten Bereichen von TaALMT1 zu einer vergleichbaren Reduktion in der Al^{3+} -Sensitivität führten. Wie bereits erwähnt zeigen Erkenntnisse von Ligaba und Dreyer, dass die Perzeption von Aluminium wohl mit einem AS-Motiv im N-Terminus assoziiert ist, welches nur bei Aluminium sensitiven ALMTs der Klade 1 vorkommt (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Somit scheint die Al^{3+} -Wahrnehmung im N-Terminus stattzufinden.

Wie die phylogenetischen Arbeiten von Dreyer *et al.* (Dreyer, Gomez-Porras et al. 2012) belegen, spalteten sich die ALMTs der Klade 2/5 als erstes von den anderen Mitgliedern der ALMTs ab. Anschließend folgten die ALMTs der Klade 3. Da QUAC1 ein Vertreter der Klade 3 ist, ist es interessant zu spekulieren ob QUAC1 seine Aluminiumaktivierbarkeit verloren hat oder ob die Wurzel-exprimierten ALMTs der Klade 1 die Aluminiumperzeption erst nach der Aufspaltung erworben haben. Zur Klärung dieser Frage, sollten zukünftig ALMTs verschiedener Klade aus evolutionär distinkten Pflanzen kloniert und funktionell untersucht werden, um herauszufinden, wann sich in der Entwicklung der Landpflanzen die Al^{3+} -Sensitivität entwickelte.

4.6 Topologie wirft weiterhin Rätsel auf

Motoda *et al.*, veröffentlichten 2009 das erste Topologie-Modell für TaALMT1. Durch Versuche mit Antikörpern, welche an spezifischen Bereichen vor und nach den vorhergesagten Transmembranen von TaALMT1 banden, zeigten sie, dass sich C- und N-Terminus von TaALMT1 extrazellulär befinden (vergleiche Abschnitt 1.6.5 / Abbildung 4.7.1 a). Es wird vermutet, dass die Aluminiumperzeption der ALMTs durch eine extrazelluläre Domäne vermittelt wird (Yamaguchi and Kasamo 2001). Dies wurde durch die Aktivierung von TaALMT1 mit extrazellulären Al^{3+} -Ionen veranschaulicht (Sasaki, Yamamoto *et al.* 2004; Pineros, Cancado *et al.* 2008). Furuichi *et al.* (Furuichi, Sasaki *et al.* 2010) zeigten, dass bestimmte Punktmutationen in TaALMT1 zu einer verminderten Al^{3+} -Antwort von TaALMT1 führten. Hierbei trat besonders die Mutation E284Q hervor, welche Teil des hoch konservierten WEP-Motivs der ALMTs ist (Dreyer, Gomez-Porrás *et al.* 2012). Furuichi *et al.* legten Motodas Modell zugrunde, um ihre Daten zu interpretieren. Daraus ergab sich, dass sich die Mutation E284Q und somit das WEP-Motiv in einer extrazellulären Schleife befindet (Abbildung 4.7.1 a). Aufgrund der gestörten Aluminiumwahrnehmung von E284Q, schlossen die Autoren darauf, dass diese Aminosäure ein Teil der Aluminiumbindestelle der ALMTs ist. Somit findet Motodas Modell zunächst unterstützende Daten, um das Verhalten der ALMTs zu erklären.

Auch Ligaba *et al.* legten Motodas Modell für ihre Arbeit aus dem Jahr (2009) zugrunde. Ligaba *et al.* suchten unter Berücksichtigung des Phosphorylierungsmotives der Protein Kinase C nach möglichen Phosphorylierungspositionen in TaALMT1. Bei Erstellen von Punktmutationen an sechs putativen Phosphorylierungspositionen zeigte die Punktmutation S384A einen besonders starken Effekt auf die Kanalaktivität. Mutation S384A führte in TaALMT1 zu einer starken Abnahme der Al^{3+} -induzierten Ströme. Die Autoren argumentierten und zeigten mit Hilfe von Kinaseinhibitoren, wie beispielsweise Staurosporin, dass durch die Mutation eine Phosphorylierung am Kanal nicht mehr zustande kommen konnte und somit keine Aktivierung des Kanals mehr stattfand. Durch Verwenden des von Motoda *et al.* vorgeschlagenen Topologiemodells befand sich die Position S384A auf der apoplastischen Seite der Zelle. Durch die Lokalisation von Ser384 außerhalb der Zelle, ist der Zugang durch zytosolische Kinasen nur schwer möglich. Auch wenn in der Arbeit diskutiert wird, dass es Kinasen gibt, die außerhalb der Zelle phosphorylieren können, bleibt dies jedoch fragwürdig und zeigt erste Probleme von Motodas Modell.

Auch eine extrazelluläre Lokalisation des WEP-Motivs, wie es durch Motodas Modell (Abbildung 4.7.1 a) vorgeschlagen wird, ist nicht zwingend notwendig für die

Aluminiumperzeption. Wie durch Ligaba gezeigt werden konnte, ist das WEP-Motiv der ALMTs zwar essentiell für deren Funktion, scheint aber nicht an der Aluminiumwahrnehmung beteiligt zu sein (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Vielmehr führt das Mutieren von stark konservierten Bereichen der ALMTs zu deren Infunktionalität (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Gleiche Erfahrungen konnten auch in dieser Arbeit gemacht werden. Die Punktmutation E276Q in QUAC1, welche der Mutation E284Q in TaALMT1 entspricht, führte in dieser Arbeit ebenso zur Infunktionalität von QUAC1 (Abbildung 3.12.2 / Tabelle 3.12.1).

Da die bisherigen Arbeiten zur Struktur und Topologie von ALMT-Anionenkanälen mehr Fragen als Antworten aufwarfen und noch kein schlüssiges Bild von der Lokalisation der einzelnen funktionellen Domänen zu erkennen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Topologie von QUAC1 mit einer alternativen Methode in Oozyten untersucht.

4.7 pH-sensitive YFP Fluoreszenz gibt Hinweise auf die Orientierung des C- und N-Terminus

Aufgrund der pH-sensitiven Fluoreszenz von YFP (Young, Wightman et al. 2010) konnten Rückschlüsse auf die Lage des C- und N-Terminus von QUAC1 gezogen werden (Mumm, Imes et al. 2013). Eine Änderung des extrazellulären pHs von 7,2 zu 5,6 zeigte bei den beiden Fusionsproteinen QUAC1::YFP und YFP::QUAC1 keine Abnahme in der Fluoreszenz. Gleichzeitig trat aber eine Abnahme in der Fluoreszenz auf, wenn der intrazelluläre pH durch Natriumacetat zu sauren Bedingungen verschoben wurde (Abbildung 3.10.1; ab Minute 20). Gleiche Ergebnisse wurden mit dem Fusionsprotein SLAC1::YFP erzielt (Abbildung 3.10.2). Für SLAC1 konnte ein sehr genaues Modell zur Topologie des Kanals erstellt werden, welches auf der Kristallstruktur des bakteriellen Homologs HiTehA beruht. Die intrazelluläre Lokalisation des C- und N-Terminus gilt somit als gesichert (Chen, Hu et al. 2010).

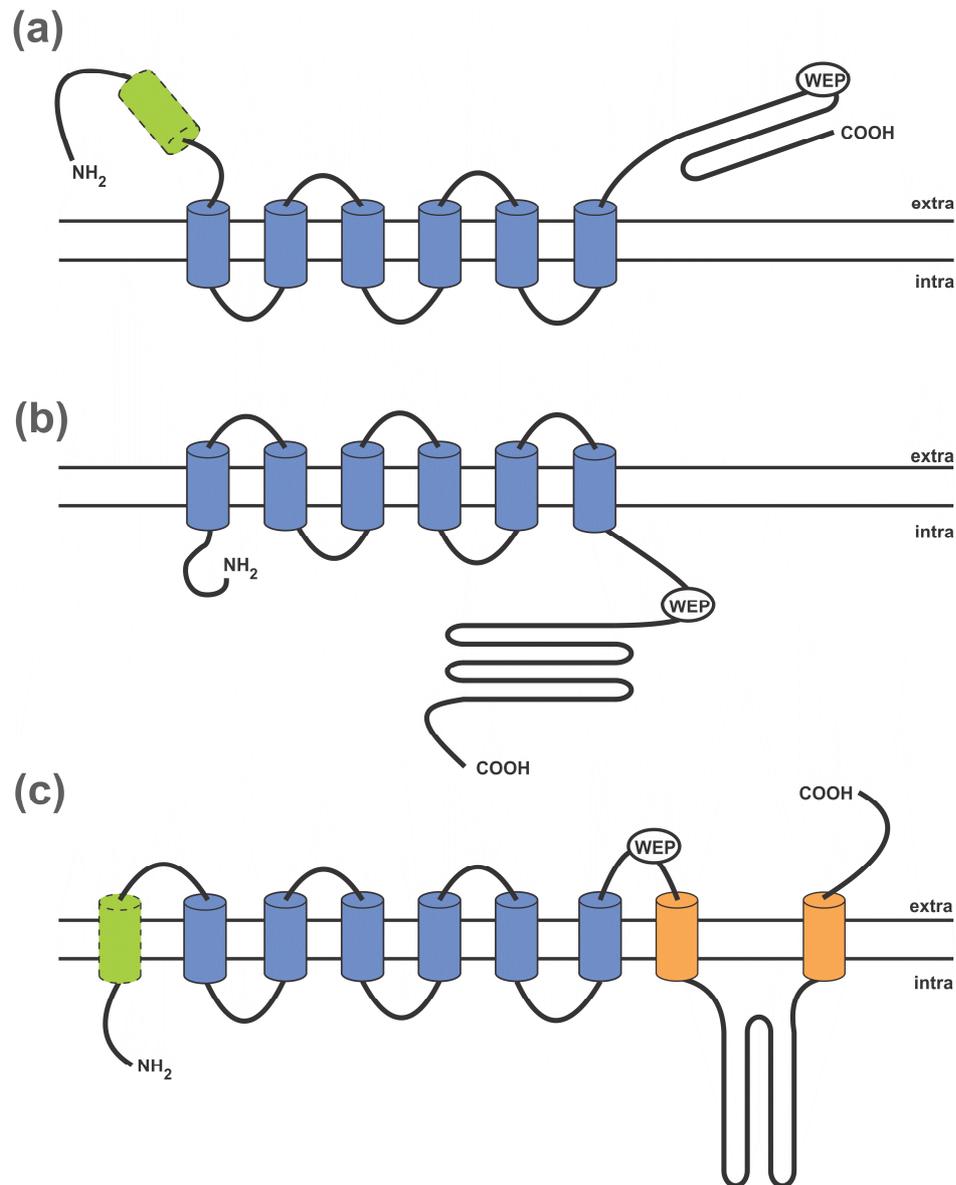


Abbildung 4.7.1: Unterschiedliche Modelle zu der Topologie der ALMTs. Sechs Transmembranen (TM) (blau) werden in allen Modellen durch Hydrophobizitätsstudien für ALMTs vorhergesagt. (a) Das durch Motoda *et al.* (2007) vorgeschlagene Modell zeichnet sich durch eine extrazelluläre Lokalisation des N- und C-Terminus aus. Zudem wird eine α -helikale Struktur (grün) im N-Terminus angenommen, welche eine weitere putative TM darstellt. Das konservierte WEP-Motiv befindet sich ebenfalls extrazellulär. (b) Durch die Daten dieser Arbeit erstelltes Modell zur Topologie von QUAC1. WEP-Motiv, N- Terminus als auch der 351 AS umfassende C-Terminus sind intrazellulär Lokalisiert. (c) Modell der Topologie der ALMTs von Dreyer *et al.* (2012). Zusätzlich zu den sechs bekannten Transmembranen (blau) wird eine potentielle Transmembran im N-Terminus vorhergesagt (grün): Zudem werden zwei weitere Transmembranen (orange) im C-Terminus vorhergesagt. Das WEP-Motiv befindet sich in diesem Modell extrazellulär zwischen TM7 und TM8. Die für die Funktion von TaALMT1 wichtige Phosphorylierungsstelle S384 (Ligaba, Kochian *et al.* 2009) ist in dem großen intrazellulären Loop zwischen TM8 und TM9 lokalisiert.

Vergleicht man nun die Daten aus Abbildung 3.10.1 und Abbildung 3.10.2 miteinander, so konnte in dieser Arbeit eindeutig eine Lokalisation des N- und C-Terminus von QUAC1 im Zytosol der Oozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.7.1 b). Dies steht im Widerspruch zu den veröffentlichten Daten von Motoda *et al.* (2007) zur Topologie von TaALMT1 (siehe Abschnitt 4.6). Durch Versuche mit Antikörpern, welche an spezifischen Bereichen vor und nach den vorhergesagten Transmembranen von TaALMT1 banden, zeigten Motoda und Kollegen, dass sich C- und N-Terminus von TaALMT1 extrazellulär befinden (vergleiche Abschnitt 1.6.5 / Abbildung 4.7.1 a).

Eine Erklärung zu den Unterschieden des Modells von Motoda (Abbildung 4.7.1 a) und dem hier vorgestellten Modell (Abbildung 4.7.1 b) könnte im Ursprung der ALMTs liegen. QUAC1/AtALMT12 und TaALMT1 gehören unterschiedlichen Kladen der ALMT-Familie an. TaALMT1 gruppiert sich in Klade 1, in welcher die Aluminium-aktivierten ALMTs zu finden sind (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012; Ligaba, Dreyer et al. 2013). QUAC1 hingegen befindet sich in Klade 3 zusammen mit AtALMT13 und AtALMT14 (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012). Diese drei ALMTs aus *Arabidopsis* sind unter anderem stark in der Plasmamembran der Schließzellen exprimiert. Der einzige bisher charakterisierte Vertreter der Klade 3 ist QUAC1. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist QUAC1 nicht Al³⁺-sensitiv. Strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Kladen könnten somit die widersprüchlichen Topologie-Modelle erklären. Allerdings sprechen Hydrophobizitätsanalysen gegen eine unterschiedliche Topologie der Mitglieder der Klade 1 und 3. Zudem zeigte sich in der Arbeit von Dreyer *et al.* (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012), dass der C-Terminus der ALMTs, über mehrere Pflanzenfamilien hinweg, eine starke Strukturierung und Konservierung aufweist. Diese ist auch in TaALMT1 und QUAC1 zu erkennen. Die Daten von Dreyer *et al.* (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012) lassen aufgrund von Hydrophobizitätsstudien zwei weitere potentielle Transmembranen im C-Terminus der ALMTs vermuten (Abbildung 4.7.1 c). Im Gegensatz zu Motodas Modell entsteht dadurch aus dem langen C-Terminus, ein C-Terminus der zum Teil intra- als auch extrazelluläre Bereiche aufweist. Dadurch ergibt sich, dass Ser384 aus TaALMT1 (Ligaba, Kochian et al. 2009) auf der intrazellulären Seite der Membran lokalisiert ist (vergleiche Abbildung 4.7.1 b/c). Damit ist Ser384 leicht für intrazelluläre Kinasen wie OST1 zugänglich, welche einen starken Effekt auf QUAC1 zeigte (Abschnitt 3.8).

Interessanterweise würden beide von Motoda benutzten Antikörper zum Nachweis des C-Terminus auch in dem Modell von Dreyer ein extrazelluläres Signal zeigen. Der erste Peptidantikörper würde in Dreyers Modell an eine Peptidsequenz (NNFGGKDFPQMH)

zwischen TM7 und TM8 jedoch vor dem WEP-Motiv binden (Abbildung 4.7.1 c). Der andere von Motoda verwendete Antikörper wies ein eingebrachtes His-Tag Motiv am Ende des C-Terminus von TaALMT1 nach und würde somit auch in Dreyers Modell extrazellulär lokalisiert sein. Beide Antikörper sind dadurch nicht in der Lage den intrazellulären Bereich aus Dreyers Modell nachzuweisen. Jedoch soll in diesem Zusammenhang nicht verschwiegen werden, dass TM8 und TM9 aus Dreyers Modell bisher noch nicht experimentell nachgewiesen wurden, sondern nur bioinformatisch vorhergesagt wurden.

Durch die Bestimmung der Lage des N- und C-Terminus durch die pH-Sensitivität von YFP, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, können keine Rückschlüsse auf weitere eventuell vorhandene TMs im C-Terminus von QUAC1 gezogen werden. Es soll auch nicht unerwähnt bleiben, dass die C-terminale Fusion von YFP an QUAC1 zu einer Beeinflussung der Funktion des Anionenkanals geführt hat. Dieses Fusionsprotein lokalisiert zwar genauso wie YFP::QUAC1 in der Plasmamembran der Oozyten (Abbildung 3.1.1 / Abbildung 3.10.1), zeigt aber eine veränderte Kinetik im Vergleich zum QUAC1 WT (Abbildung 3.11.1).

Um die Topologie von ALMTs im Allgemeinen und von QUAC1 im Speziellen endgültig zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei bietet sich der Ansatz mit Antikörpern von Motoda *et al.* (Motoda, Sasaki *et al.* 2007) an. Bei einer Wiederholung dieses Ansatzes sollten aber die Topologie-Vorhersagen von Dreyer *et al.* (Dreyer, Gomez-Porrás *et al.* 2012) berücksichtigt werden. Hierbei sollte besonderes Augenmerk auf den Nachweis des intrazellulären Bereichs zwischen den potentiellen Transmembranen TM8 und TM9 gelegt werden. Möglicherweise unterscheiden sich auch die einzelnen phylogenetischen Kladen strukturell stark voneinander. Mithilfe von Kristallisationsstudien und Struktur-Funktions-Untersuchungen von Vertretern jeder Klade könnten die Topologie und funktionelle Domänen, wie z.B. der Al³⁺-, bzw. Malat-Sensor identifiziert werden.

4.8 C-terminale Veränderungen beeinträchtigen die Funktionalität des Kanals.

Eine Fusion von YFP an den C-Terminus von QUAC1 führte zu einer Veränderung des spannungsabhängigen Öffnungsverhaltens. Der Kanal wurde völlig spannungsunabhängig, verlor seine Eigenschaft zu deaktivieren und wurde so in einen konstitutiv offenen Zustand überführt (Abbildungen 3.11.1 - 3). Die Fusion eines YFPs an den N-Terminus des Kanals hingegen beeinflusste ihn nicht, und der Kanal zeigte weiterhin ein Verhalten welches dem der R-Typ Kanäle entsprach. Durch die Modulation des C-Terminus wurde zwar die

Spannungsabhängigkeit des Kanals beeinflusst, aber nicht die Fähigkeit Anionen zu leiten. Dies wurde beim Vergleich der N- und C-terminalen Fusionsproteine (YFP::QUAC1 und QUAC1::YFP) deutlich, die identische instantane Ströme zeigten (Abbildungen 3.11.1 d und Abbildungen 3.11.3).

Für Anionenkanäle der CLC- und SLAC/SLAH-Familie zeigte sich, dass die Porenregion im Bereich der transmembrandurchspannenden TMs zu finden ist (Chen, Hu et al. 2010). Für QUAC1 und andere Vertreter der ALMTs befinden sich die Transmembranen in der N-terminalen Hälfte der Proteine (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Verwendung von Citrat als Kanalblocker von AtALMT9 im Zusammenspiel mit Punktmutationen im N-terminalen Bereich von AtALMT9, bestätigen die Lokalisation der Kanalpore im Transmembranbereich des Proteins (Zhang, Baetz et al. 2013). Die Punktmutation K193A tritt dabei besonders hervor. Eine Interaktion und Hemmung durch Citrat mit AtALMT9 ist in dieser Mutante nicht mehr zu beobachten, wie durch Kick-Out Experimente gezeigt wurde (Zhang, Baetz et al. 2013). Citrat funktioniert als „open Channel Blocker“. Eine direkte Interaktion mit der Porenregion des Kanals ist deswegen von Nöten. Ist der Kanalblock, wie im Fall der Mutante K193A gestört, ist dies ein Hinweis auf die Lokalisation der Porenregion des Proteins.

Aus diesen veröffentlichten Daten lässt sich zusammen mit den Ergebnissen der YFP-Fusionsversuche von QUAC1 ableiten, dass die Funktionalität der Porenregion von QUAC1 nicht direkt durch die Fusion betroffen war, der C-Terminus jedoch an der Regulation des Kanals beteiligt ist.

Von Kaliumkanälen ist eine Inhibition des Kanals durch den N-Terminus bekannt. Diese Inhibition ist in der Literatur als „Ball and Chain“ Model oder N-terminale Inaktivierung bekannt. Hierbei blockiert der N-Terminus die Kanalpore und verhindert so einen Ionenstrom trotz geöffneter Kanalpore (Aldrich 2001; Zhou, Morais-Cabral et al. 2001).

Auch von CFTR ist die Inhibition der Kanalpore durch eine Komponente des Kanals bekannt. Diese als R-Domäne bezeichnete Struktur befindet sich zwischen den beiden NBD-Domänen (Nucleotid Binding Domain) des Kanals (Ostedgaard, Baldursson et al. 2001). Wenn die R-Domäne nicht phosphoryliert ist, ist eine Inhibition des CFTR Kanals zu beobachten (Ostedgaard, Baldursson et al. 2001). Deletion der R-Domäne führte auch zu konstitutiv aktiven Kanälen (Ostedgaard, Baldursson et al. 2001). Erklärungsansätze für die Regulation der R-Domäne sind unter anderem, dass diese im nicht phosphorylierten Zustand eine Interaktion der NBD-Domänen mit ATP unterbindet bzw. deren Funktion beim Öffnen des Kanals behindert.

Man geht davon aus, dass durch Phosphorylierung der R-Domäne eine Konformationsänderung stattfindet, wodurch der inhibierende Effekt verloren geht. Zudem wurde gezeigt, dass die phosphorylierte R-Domäne eine Interaktion von ATP mit den NDB-Domänen fördert (Ostedgaard, Baldursson et al. 2001).

Wie durch diese beiden Beispiele zu erkennen ist, spielen Strukturen im N- und C-Terminus aktive Rollen bei der Inhibition von Kanälen. Eine ähnliche Funktion könnte auch der C-Terminus von QUAC1 wahrnehmen. Der inhibierende Effekt des C-Terminus, welcher bei dem nativen QUAC1 Protein zu beobachten war, könnte bei dem Fusionsprodukt QUAC1::YFP verloren gegangen sein. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition der Kanalpore mit dem C-Terminus durch die YFP Fusion gestört wurde.

Komplette Deletion des C-Terminus (QUAC1 Δ 218-561, Abbildung 3.12.2) zeigte jedoch nicht einen konstitutiv offenen Kanal, sondern einen infunktionellen. Dieses Ergebnis deckt sich zum Teil mit denen in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. So zeigten Furuichi *et al.* (Furuichi, Sasaki et al. 2010), dass die Deletion der C-terminalen Hälfte von TaALMT1 (Δ 220-459), wie bei QUAC1, zu einem infunktionellen Kanal führte. Neuere Daten von Ligaba (Ligaba, Dreyer et al. 2013) wiesen jedoch darauf hin, dass diese Deletionsmutante basale Ströme vermittelt, die denen des WT's entsprechen. Allerdings zeigte diese keine durch Al^{3+} (im Außenmedium) hervorgerufene Erhöhung der Ströme.

Da die Entfernung des gesamten C-Terminus in dieser Arbeit zur Infunktionalität führte, wurden Sequenzvergleiche von C-Termini anderer ALMTs (Abbildung 3.12.1) angefertigt. Bereiche, die in ALMTs stark konserviert oder für QUAC1 einzigartig waren, wurden deletiert, um deren Auswirkung auf den Kanal zu untersuchen. Fast alle hergestellten Mutanten waren jedoch infunktionell. Die Deletion des für QUAC1 einzigartigen Abschnitts 377 - 448 zeigte ein dem WT ähnliches Verhalten (Tabelle 3.12.1). Neben der Deletion 377 - 448 zeigten nur die Deletion eines kleinen N-terminalen Abschnitts, sowie einige Phosphorylierungsmutanten ein dem WT ähnliches Verhalten (Tabelle 3.12.1/ Abbildung 3.12.2). Selbst die Mutation einer einzigen Aminosäure (E276Q) erzeugte einen funktionsuntüchtigen Kanal (Tabelle 3.12.1/ Abbildung 3.12.2). Diese Daten zeigen eindeutig, dass für die Funktion des Kanals ein intakter C-Terminus vorhanden sein muss. Selbst kleinste Änderungen (E276Q) können zur Inaktivität des Kanals führen. Die Daten legen somit nahe, dass QUAC1 einen stark strukturierten C-Terminus besitzt.

Für die Mutante E276Q war bekannt, dass sie Teil des hoch konservierten WEP-Motives in den ALMTs ist. Vorherige Arbeiten in TaALMT1 zeigten, dass die äquivalente Mutation (E284Q) zu einem aluminiumsensitiven Kanal führte (Furuichi, Sasaki et al. 2010). AtALMT1/QUAC1 reagiert jedoch nicht auf Aluminiumionen (Abschnitt 3.7). Aus diesem Grund war es sehr interessant zu verfolgen, welche Auswirkung diese Mutation auf den Kanal hat. Der komplette Verlust der QUAC1-Aktivität durch die Mutation war sehr überraschend (Abbildung 3.12.2, Tabelle 3.12.1). E276Q muss somit zur strukturellen Integrität des Kanals beitragen. Die Arbeit von Ligaba unterstützt dies (Ligaba, Dreyer et al. 2013). Auch hier zeigte die Mutation des WEP-Motivs eine erhebliche Beeinträchtigung der Kanalaktivität von TaALMT1. Zudem haben die Autoren auch weitere stark konservierte Bereiche der ALMTs mutiert, und zeigten vergleichbar starke Effekte dieser Mutanten (E274Q, D423N). Ligabas Arbeit (Ligaba, Dreyer et al. 2013) verdeutlicht zudem auch wie wichtig die strukturelle Integrität des C-Terminus für die Funktion der ALMTs ist. Punktmutationen in konservierten Bereichen reichten aus, um die Kanalaktivität stark zu beeinträchtigen. Diese deckt sich mit denen in dieser Arbeit gesammelten Beobachtungen zu den Deletionsmutanten.

Ein Ausbleiben der typischen QUAC1 Ströme in den Deletions- und Punktmutanten durch gestörte Expression bzw. einer gestörten Lokalisation des Proteins in der Zellmembran konnte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 3.12.3) ausgeschlossen werden. Wie können jedoch die hier gezeigten Beobachtungen an den Deletionsmutanten von QUAC1 erklärt werden?

Nach den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen veröffentlichten Dreyer und Kollegen (Dreyer, Gomez-Porras et al. 2012) eine Arbeit, in der unter anderem eine starke Strukturierung der ALMT C-Termini vorgeschlagen wird. Diese Strukturierung wurde durch umfassende Homologievergleiche erkannt. Dreyer *et al.* teilten den C-Terminus in 10 Zonen ein, von welchen fünf Zonen sehr stark über viele Pflanzenarten konserviert sind. Es zeigte sich, dass der für QUAC1 einzigartige Abschnitt 377 – 448 in einem nicht stark konservierten Bereich eines Transmembranloops lokalisiert ist. Eine Deletion in diesem Loop scheint somit nicht zur Beeinträchtigung des Kanals zu führen. Alle weiteren als infunktionell beschriebene Mutanten beinhalteten mindestens einen stark konservierten Bereich. Die infunktionellen Deletionsmutanten lassen sich somit alle durch eine Störung der Struktur des C-Terminus erklären, welche auf der Mutation bzw. Deletion von konservierten Bereichen beruht.

Diese Erkenntnisse sollten in Zukunft durch weitere Versuche vertieft werden. Eine Spezies-übergreifende Suche in Trockenstress toleranten oder intoleranten Pflanzen, mit Fokus auf

QUAC1 und weiteren ALMTs der Schließzelle, könnte beispielweise natürlich vorkommende Polymorphismen (SNPs) im C-Terminus von QUAC1 aufzeigen. Diese könnten dann mit gerichteter Mutagenese im Hintergrund des *Arabidopsis* QUAC1 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten überprüft werden. Zudem zeigten Ingo Dreyer *et al.* eine starke Strukturierung des C-Terminus in allen bekannten ALMT-Proteinen. Anhand dieses Modells sollten gezielt neue Mutanten und Chimären zwischen unterschiedlichen ALMTs erstellt werden. Eine elektrophysiologische Analyse dieser Mutanten/Chimären könnte zu weitreichenden Erkenntnissen von Struktur-Funktionsbeziehungen in den ALMT-Typ Anionenkanälen führen. Eine umfassende Klärung der Struktur von QUAC1 kann nur durch eine Kombination aus der Röntgenstrukturanalyse an einem QUAC1 Proteinkristall und Mutantanalysen gewonnen werden. Jedoch ist die Kristallisation von Membranproteinen nach wie vor sehr schwierig.

4.9 QUAC1 wird über Kinasen und Phosphatasen der schnellen ABA-Signalkaskade reguliert

Der schnelle Stomaschluss nach Gabe von ABA kann entweder in An- oder Abwesenheit von erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen erfolgen (Mcainsh, Brownlee *et al.* 1990; Mcainsh, Brownlee *et al.* 1992; Levchenko, Konrad *et al.* 2005; Marten, Konrad *et al.* 2007; Stange, Hedrich *et al.* 2010). Sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Calciumspikes wurden S-Typ Anionenströme beobachtet. Dies lässt auf einen Ca^{2+} -abhängigen und einen Ca^{2+} -unabhängigen Signalweg schließen welcher die S-Typ Kanäle aktiviert (Roelfsema and Hedrich 2010; Hedrich 2012). Die Kalziumunabhängige Aktivierung erfolgt über die Kinasen der SnRK2-Klasse. So zeigten Scherzer und Geiger eindeutig, dass der Kanal SLAC1 durch die Kinase OST1 ABA-abhängig aktiviert wird (Geiger, Scherzer *et al.* 2009). In OST1 Verlustmutanten bleibt nach ABA-Stimulierung SLAC1 still und der Stomaschluss bleibt aus. Die kalziumabhängige Aktivierung wird durch die Kinasen der CDPK-Familie erreicht. Hierbei konnten ebenfalls Scherzer und Geiger zeigen, dass die CDPKs CPK21 und CPK23 den Kanal SLAC1 durch Phosphorylierung aktivieren (Geiger, Scherzer *et al.* 2010). Zudem belegen Ergebnisse zu Homologen von SLAC1, dass diese ebenfalls durch CDPKS aktiviert werden können. So vermittelt SLAH3 nur Ströme in Anwesenheit von CPK3, CPK6 und CPK21 (Geiger, Maierhofer *et al.* 2011; Scherzer, Maierhofer *et al.* 2012) bzw. CPK2 und CPK20 (Gutermuth, Lassig *et al.* 2013). Für beide Kanäle ist zudem bekannt, dass eine Inaktivierung der Kanäle durch die Phosphatase ABI1 erfolgt (Geiger, Scherzer *et al.* 2009; Geiger, Scherzer *et al.* 2010; Geiger, Maierhofer *et al.* 2011; Demir, Hortrich *et al.* 2013).

Dieses als ABA-Signalkaskade beschriebene System, ist ein anerkanntes Modell in der Pflanzenphysiologie (Hirayama and Shinozaki 2007; Umezawa, Sugiyama et al. 2009; Geiger, Maierhofer et al. 2011; Brandt, Brodsky et al. 2012). Bisher war jedoch nicht bekannt, welchen genetischen Ursprung die R-Typ Ströme in Schließzellen haben. Somit konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden ob bzw. wie R-Typ Anionenkanäle in diesen Signalweg integriert sind. Hinweise auf eine parallele Steuerung der S- und R-Typ Anionenkanäle durch die gleiche ABA-Signalkaskade ergab eine Kooperation mit Patrick Mumm und Irene Marten. Durch Zugabe von ABA auf *Arabidopsis* Schließzellprotoplasten ließen sich die R-Typ Ströme in Patch-Clamp Experimenten erhöhen (Imes, Mumm et al. 2013). Ähnliche Daten konnten Raschke *et al.* bereits im Jahr (2003) für *Vicia faba* Schließzellen zeigen. Zudem konnten Raschke *et al.* eine Erhöhung der R-Typ Ströme nicht nur durch ABA-Gabe, sondern auch durch die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erreichen. Somit scheint auch eine Aktivierung der R-Typ Ströme auf kalziumabhängige und -unabhängige Weise möglich. Patch-Clamp Experimente mit den beiden ABA-insensitiven *Arabidopsis* Mutanten *abi1-1* und *ost1-2* (Imes, Mumm et al. 2013) (Abbildung 3.8.6) zeigten, dass trotz ABA-Gabe eine Abnahme der R-Typ Ströme in den Mutanten zu beobachten ist. Somit konnte eine Regulation der R-Typ Ströme durch die ABA-Signalkaskade demonstriert werden. Wie die Daten dieser Arbeit weiterhin belegen (Abschnitten 3.2 - 3.6), handelt es sich bei QUAC1 um eine Komponente des R-Typ Anionenkanals, so dass im heterologen Expressionssystem der Oozyten durch die teilweise Rekonstitution des ABA-Signalwegs geprüft werden konnte, ob und wie QUAC1 in den ABA-Signalweg eingebunden ist.

4.9.1 Koexpression von OST1 und QUAC1 steigert Ein- und Auswärtsströme von QUAC1

In Abbildung 3.8.1 ist die Interaktion von QUAC1 mit OST1 durch BIFC Fluoreszenz ($\text{OST1}::\text{YFP}^{\text{CT}}$ mit $\text{YFP}^{\text{NT}}::\text{QUAC}$) dargestellt, was eine Regulation durch den kalziumunabhängigen ABA-Signalweg vermuten lässt. Expression von QUAC1 alleine zeigte eine Grundaktivität des Kanals in Chlorid- als auch in Malat- basierten Medien (Abbildung 3.8.2 a + d; vergleiche auch Abschnitte 3.2 - 3.5). Elektrophysiologische Untersuchungen der Koexpression von QUAC1 und OST1 in Oozyten ergaben eine Erhöhung der Grundaktivität des Kanals (Abbildung 3.8.2 b + e; Abbildung 3.8.3 a + c). Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Einwärts- als auch die Auswärtsströme in Anwesenheit von OST1 stark zunahmen. Die Steigerung der Ströme war in den Steady-State-Strömen (Abbildung 3.8.3 a + c) zu beobachten. Der aktivierende Effekt von Malat auf den Kanal wurde durch die Koexpression mit OST1 noch verstärkt (Abbildung 3.8.3 c), was sich besonders in der fünffach stärkeren Ausprägung des glockenförmigen Stroms zeigte. Analysen der relativen Offenwahrscheinlichkeit offenbarten,

dass die Koexpression von QUAC1 und OST1 eine Verschiebung des Spannungs-abhängigen Öffnens des Kanals zu negativeren Membranpotentialen zur Folge hatte. Hierdurch ist eine leichtere Aktivierung des Kanals in der Schließzellmembran unter physiologischen Membranpotentialen möglich. Dieser Sachverhalt ähnelt den vorher beschriebenen Malateffekten (Abschnitte 3.3 - 3.5), als auch den Daten von Marten und Hedrich für den R-Typ bei Gabe von Malat (Hedrich and Marten 1993). All diese Daten zeigen den aktivierenden Einfluss von OST1 auf QUAC1 und somit kann von einer Regulation durch den ABA-Signalweg ausgegangen werden.

4.9.2 ABI1 unterbindet den aktivierenden Effekt von OST1 auf QUAC1

Gleichzeitige Expression von QUAC1 mit OST1 und ABI1 ergaben eine Hemmung der Kanalaktivität. BIFC Experimente zeigten, dass die vorher etablierte Interaktion von OST1::YFP^{CT} mit YFP^{NT}::QUAC1 (Abbildung 3.8.1 und Abbildung 3.8.4 b) in Anwesenheit von ABI1 unterbunden wurde (Abbildung 3.8.4 c). Elektrophysiologische Messungen von QUAC1 und OST1 in Anwesenheit von ABI1 demonstrierten den inhibierenden Effekt von ABI auf das Kanal-Kinase-System (Abbildung 3.8.5). Die gut zu beobachtende Glockenform der R-Typ Ströme war in Anwesenheit von ABI1 nicht zu verzeichnen. Dies verdeutlicht die Unterbindung des aktivierenden Effekts von OST1 auf QUAC1. Ähnliche Effekte konnten bereits für SLAC1, als auch für SLAH3, in Anwesenheit von ABI1 gemacht werden (Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010; Geiger, Maierhofer et al. 2011; Demir, Horntrich et al. 2013). Da bei den für QUAC1 durchgeführten Experimenten zugleich keine Grundaktivität des Kanals mehr zu verzeichnen war (vergleiche Abschnitt 3.2 - 3.5), liegt die Vermutung nahe, dass eine durch endogene Oozyten-Kinasen vorhandene Phosphorylierung ebenfalls nicht stattfinden konnte. Untersuchungen an Schließzellprotoplasten von *abil-1* und *ost1-2* Mutanten unterstützen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen (Imes, Mumm et al. 2013).

4.9.3 Phosphorylierungsposition in QUAC1 weiterhin ungewiss

Da QUAC1 unter anderem durch die Kinasen OST1 aktiviert wurde, wurde versucht genaueren Aufschluss über die Phosphorylierungsposition zu erhalten. Hierzu wurden Punktmutationen an konservierten Serinen erstellt (S372A, S376A, S384A, S342A, S355A) (Abbildung 3.12.2), welche eine Phosphorylierung von QUAC1 durch Kinasen ausschließen sollten. Ligaba *et al.* (2009) wählten einen ähnlichen Ansatz um die Phosphorylierungsposition in TaALMt1 zu bestimmen. Unter Berücksichtigung des Phosphorylierungsmotives der Protein Kinase C erstellten sie sechs Punktmutanten an möglichen Phosphorylierungspositionen von TaALMT1.

Die Punktmutation S384A in TaALMT1 führte dabei zu einer starken Abnahme der beobachteten Ströme. Die Autoren zeigten, dass durch die Mutation eine Phosphorylierung am Kanal nicht mehr zustande kam, und somit keine Aktivierung des Kanals mehr stattfand. Im Gegensatz dazu zeigten die Punktmutationen in QUAC1 keinen Effekt auf die Kanalaktivität. Die untersuchten Punktmutanten waren in ihrem elektrischen Verhalten nicht vom QUAC1 Wildtyp zu unterscheiden (Tabelle 3.12.1). Somit konnte die Phosphorylierungsposition in QUAC1 nicht bestimmt werden. Eine ausbleibende Phosphorylierung hemmt den Kanal jedoch, dies ist durch die zuvor erwähnten ABI1 Experimente zu erkennen (Abbildung 3.8.5). Expression von ABI1 zusammen mit QUAC1 und OST1 unterdrückte die typische R-Typ Glockenkurve in den Stromspannungsdiagrammen. Diese R-Typ Glockenform konnte in Anwesenheit von QUAC1 alleine oder zusammen mit OST1 beobachtet werden. Dies deutet an, dass QUAC1 in Oozyten durch endogene Kinasen voraktiviert wird und dass ABI1 sowohl OST1 als auch endogene Kinasen hemmt und gleichzeitig die Phosphorylierung am QUAC1 Kanalprotein aufhebt.

4.9.4 Kinasen des Kalziumunabhängigen ABA-Signalweges (CDPKs) interagieren und aktivieren QUAC1

Neben der Aktivierung durch den kalziumunabhängigen ABA-Signalweg, ist QUAC1 auch in den kalziumabhängigen ABA-Signalweg integriert. In Analogie zu den OST1-Interaktionsstudien dieser Arbeit, als auch den Arbeiten von Scherzer und Geiger (Geiger, Scherzer et al. 2009; Geiger, Scherzer et al. 2010) wurden BIFC Versuche mit CDPKs durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sämtliche untersuchten CDPKs (CPK2, CPK20, CPK34) mit QUAC1 interagieren (Abbildung 3.9.1). Aufgrund der Fluoreszenzintensität scheint die Interaktion mit CPK34 am stärksten zu sein. Elektrophysiologische Experimente mit den CDPKs zeigten des Weiteren starke Ähnlichkeiten zu den OST1 Experimenten. In Chlorid-basierten Medien ist eine Erhöhung der Auswärtsströme zu beobachten, aber jedoch keine Erhöhung der Einwärtsströme, wie es in Anwesenheit von OST1 gezeigt werden konnte. In Malatmedien zeigt QUAC1 in Gegenwart von CPK2 und CPK20 erhöhte Ströme, auch wenn sich die Reaktion auf die beiden CDPKs leicht voneinander unterschied (Abbildung 3.9.2). Dies zeichnete sich durch die starke Ausprägung der R-Typ Glockenform, als auch einer Erhöhung der Peakmaxima im Vergleich zu den Kontrollen aus. Beide CDPKs führten dabei zu einer Verdopplung der Peakmaxima. Auch eine Verschiebung der Peakmaxima hin zu negativeren Spannungen war zu beobachten. Diese Daten ähnelten stark dem Verhalten des Kanals in Anwesenheit von OST1. In den OST1 Versuchen wurde deutlich, dass sich die Verschiebung der Peakmaxima in einer Verschiebung der relativen Offenwahrscheinlichkeit widerspiegelt.

Deshalb ist anzunehmen, dass die getesteten CDPKs den gleichen Effekt wie OST1 auf den Kanal haben. Da die Maxima jedoch nicht gleich stark von beiden CDPKs verschoben werden, ist weiterhin zu vermuten, dass unterschiedliche CDPKs unterschiedliche Phosphorylierungsstellen oder unterschiedlich starke Phosphorylierungsaktivitäten besitzen. Obwohl CPK34 das stärkste Fluoreszenzsignal zeigte, erkennt man in den Stromspannungsdiagrammen keine Erhöhung der Kanalaktivität (Abbildung 3.9.2), sondern eine Abnahme der Ströme im Vergleich zu den Kontrollen. Der sich in Malat-haltigen Medien ausbildende Peakstrom war nur noch schwach zu erkennen, ebenso wie der glockenförmige Verlauf der Ströme. Die Daten aus Abbildung 3.9.1 zeigen jedoch eine Interaktion zwischen QUAC1 und CPK34. Somit scheint zwar eine Interaktion zwischen beiden Proteinen stattzufinden, welche jedoch nicht in der Phosphorylierung, und somit in der Aktivierung, von QUAC1 endet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass unterschiedlichen CDPKs mit QUAC1 interagieren können, aber nicht alle CDPKs aktivieren QUAC1. Um dies zu bestätigen müssen in Zukunft weitere Bindungs- und Phosphorylierungsstudien erfolgen.

Die Familie der *Arabidopsis* CDPKs umfasst 34 Mitglieder und es ist davon auszugehen, dass diese unterschiedliche Funktionen erfüllen (siehe Abschnitt 1.7.4). Somit können unterschiedliche CDPKs verschiedene Effekte (aktivierend / hemmend) auf das gleiche Protein haben. Geiger *et al.* zeigen in ihrer Arbeit (Geiger, Scherzer *et al.* 2010), dass die CDPKs CPK21 und CPK23 den SLAC1 Kanal aktivieren. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass CPK31 keinen Effekt auf den Kanal ausübte und dieser bei Koexpression keine Ströme vermitteln konnte. Zudem zeigten neueste Daten, dass CPK3 und CPK6 sowohl SLAC1 als auch SLAH3 aktivieren können (Brandt, Brodsky *et al.* 2012; Scherzer, Maierhofer *et al.* 2012). SLAH3 konnte ebenfalls durch CPK21 und CPK23 aktiviert werden, jedoch nicht durch OST1 (Geiger, Maierhofer *et al.* 2011). In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit von Gutermuth *et al.* (Gutermuth, Lassig *et al.* 2013) wurde gezeigt, dass neben SLAH3 und ALMT12/QUAC1 auch CDPKs CPK2, CPK20 und CPK34 in Pollenschläuche exprimiert vorlagen. TEVC Experimente in Oozyten zeigten eine Aktivierung von SLAH3 durch CPK2 und CPK20, wohingegen CPK34 keinen Effekt auf SLAH3 hatte. Dieser Sachverhalt bestätigt die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen zur QUAC1-Expression in Oozyten. Es ist durchaus denkbar, dass QUAC1 zusammen mit SLAH3 am Wachstum von Pollenschläuche beteiligt ist. Übergeordnet wird das Wachstum wiederum durch CDPKs gesteuert, da in Pollenschläuchen ein starker Kalziumgradient herrscht. Dadurch werden die unterschiedlichen Kinasen in unterschiedlichen Abschnitten der Pollenschläuche unterschiedlich stark aktiviert und aktivieren verschieden stark ihre Ziele.

Für das vakuolär lokalisierte Mitglied der ALMT-Familie - ALMT6 - bewirkte eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Badmedium eine starke Zunahme der Ströme (Meyer, Scholz-Starke et al. 2011). Es blieb jedoch unklar, ob diese Aktivierung direkt durch die Ca^{2+} -Ionen erfolgte, zumal ALMT6 keine bekannte Kalziumbindestelle aufweist, oder ob Kalzium als Second-Messenger fungierte und noch verbliebene zytosolische oder in der Membran verankerte Proteine aktivierte. Eine Erhöhung des Kalziumspiegels könnte z.B. zu einer Aktivierung von membrangebundenen kalziumabhängigen CIPKs und/oder CDPKs führen, welche den Kanal wiederum phosphorylierten und ihn so aktivierten. Weitere Hinweise zur Regulation der ALMT-Familie durch CDPKs liefern CPK3 und CPK6. Beide Kinasen könnten ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von QUAC1 bzw. von Komponenten der R-Typ Ströme spielen. Die Arbeit von Mori und Murata (Mori, Murata et al. 2006) zeigt, dass die doppel-knock-out Pflanzen *cpk3-1cpk6-1* in *Arabidopsis* eine Abnahme der R-Typ Strömen aufweisen. Diese Abnahme in den Strömen war signifikant aber deutlich geringer als für die gleichzeitig observierten S-Typ Ströme. Später konnte eine klare Regulation von SLAC1 durch CPK3 und CPK6 gezeigt werden. Die Regulation der R-Typ Kanalaktivität durch CPK3 und CPK6 wurde aber bisher nicht abschließend untersucht.

4.9.5 QUAC1 Homologe in anderen Pflanzen werden vermutlich auch durch die ABA-Signalkaskade angesteuert.

Wie durch die Arbeit von Dreyer (Dreyer, Gomez-Porrás et al. 2012) gezeigt wurde, gibt es in allen dort untersuchten Pflanzenarten Homologe zu den ALMTs aus der QUAC1 Unterfamilie. In *Dionea muscipula* konnte das Homolog DmQUAC1 von Jennifer Böhm kloniert werden. Basierend auf der Aminosäuresequenz besitzt DmQUAC1 67% Ähnlichkeit zu AtQUAC1 (Imes, Mumm et al. 2013). DmQUAC1 zeigte wie AtQUAC1 eine OST1 abhängige Aktivierung, sowie eine schnelle Deaktivierung bei hyperpolarisierten Membranspannungen (Imes, Mumm et al. 2013). Zudem verschiebt externes Malat die relative Offenwahrscheinlichkeit von DmQUAC1, wie es auch für AtQUAC1 gezeigt wurde (Imes, Mumm et al. 2013). Somit ist neben QUAC1 noch ein weiterer Vertreter der ALMT/QUAC-Familie bekannt, der durch die Kinase OST1 angesteuert wird.

4.9.6 QUAC1/SLAC1/SLAH3 werden gleichzeitig durch die ABA-Signalkaskade reguliert und bewirken so den Stomaschluss

In Analogie zu SLAC1 und SLAH3, ist QUAC1 in die schnelle ABA-Signalkaskade eingebunden. Durch die parallele Regulation werden die R-Typ Kanäle (QUAC1) und die S-Typ Kanäle (SLAC/SLAH) bei Trockenstress gleichzeitig angesprochen und können so zu

einem schnellen Stomaschluss beitragen. Gleichzeitig erklärt dieser Sachverhalt, dass OST1 k.o.-Pflanzen (*ost1-2*) einen stärkeren Phänotyp (offene Stomata) aufweisen als SLAC1 oder QUAC1 k.o.-Pflanzen (Negi, Matsuda et al. 2008; Imes, Mumm et al. 2013). Die aus dieser Doktorarbeit resultierenden Einblicke in die Regulation von R-Typ Anionenkanälen wurden in das ABA-Signalling-Modell zur ABA-abhängigen Aktivierung von Anionenkanälen in Abbildung 4.9.6.1 eingebunden.

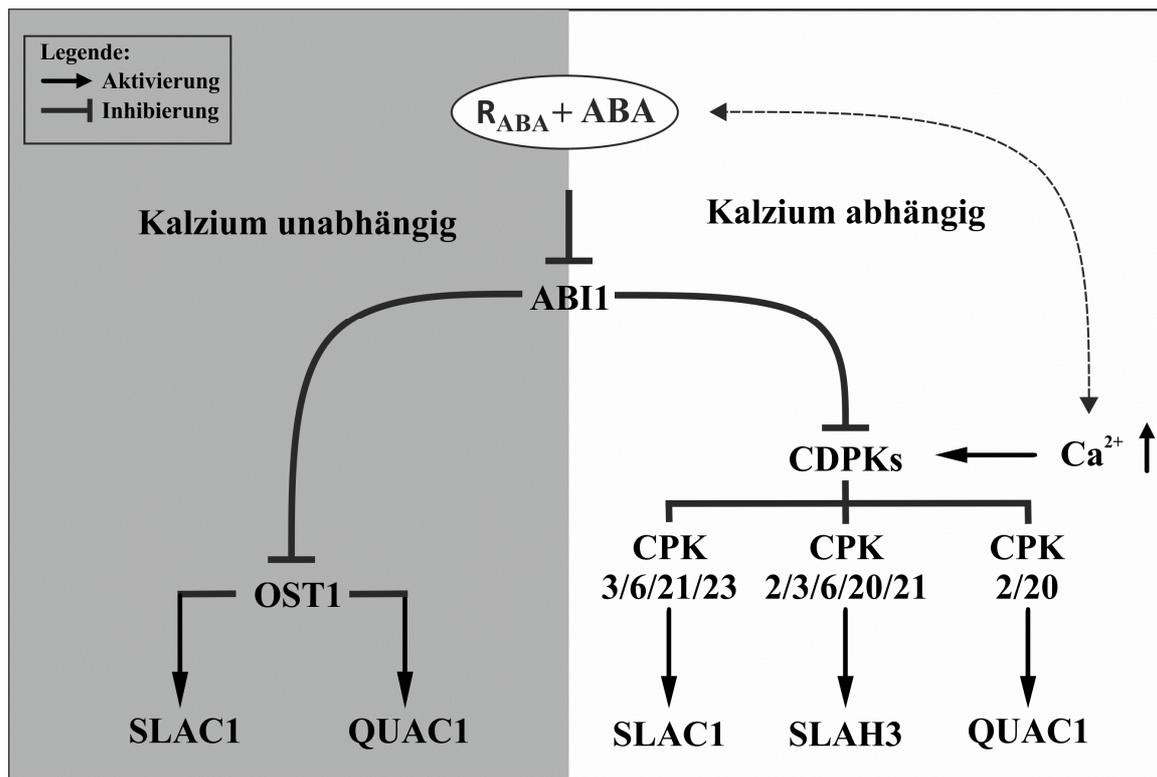


Abbildung 4.9.6.1: Modell zur Aktivierung der S-TYP (SLAC/SLAH) und R-Typ (QUAC1) Kanäle durch die schnelle ABA-Signalkaskade. Die Aktivierung der Kanäle kann kalziumunabhängig (linke Seite in grau) oder kalziumabhängig (rechte Seite in weiß) erfolgen. ABA wird durch den ABA-Rezeptor PYR/PYL/RCAR wahrgenommen (im Modell als R_{ABA} dargestellt). Dies führt zur Inaktivierung der PP2C Phosphatase ABI1, welche in Abwesenheit von ABA die Funktion der Kinasen der SnRK-Familie unterbindet. In Anwesenheit von ABA ist OST1 in der Lage SLAC1 und QUAC1 zu phosphorylieren/aktivieren. Analog dazu sind die Kinasen der CDPKs (CPK2/3/6/20/21/23) ebenfalls in der Lage SLAC1, SLAH3 und QUAC1 bei erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen zu aktivieren. Durch die Aktivierung der Kanäle kommt es zum Stomaschluss.

5 Zusammenfassung

Zum Gasaustausch mit Ihrer Umgebung besitzen höhere Pflanzen stomatäre Komplexe. Die Turgor-getriebenen Atmungsöffnungen in der Epidermis der Blätter werden von zwei Schließzellen umsäumt. Um bei Trockenheit einen exzessiven Verlust von Wasser zu verhindern, synthetisieren/importieren Schließzellen das Stresshormon ABA (Abszinsäure), das über eine schnelle ABA-Signalkaskade plasmamembrangebundene Ionenkanäle steuert. Dabei wird der Stomaschluss durch die Aktivität von R-(rapid) und S-(slow)Typ Anionenkanälen initiiert. Obwohl die R- und S-Typ Anionenströme in Schließzellen seit Jahrzehnten bekannt waren, konnte erst kürzlich das Gen identifiziert werden, das für den S-Typ Anionenkanal (SLAC1, Slow activating Anion Channel 1) kodiert. Daraufhin wurde schnell der Zusammenhang zwischen dem Stresshormon ABA, der ABA-Signalkette und der Aktivität des SLAC1 Anionenkanals im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten als auch in Schließzellprotoplasten aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass ABA durch einen zytosolischen Rezeptor/Phosphatasekomplex (RCAR1/ABI1) erkannt wird und die Aktivität von kalziumabhängigen Kinasen (CPK-Familie) sowie kalziumunabhängigen Kinasen der SnRK2-Familie (OST1) steuert. In Anwesenheit von ABA phosphorylieren diese Kinasen SLAC1 und sorgen so für die Aktivierung von Anionenströmen und damit für die Initiierung des Stomaschlusses.

Die genetische Herkunft der ABA-induzierten R-Typ Ströme in Schließzellen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht bekannt. R-Typ Ströme zeichnen sich durch eine strikte Spannungsabhängigkeit und sehr schnellen Aktivierungs- sowie Deaktivierungskinetiken aus. Die Charakterisierung von Verlustmutanten des Schließzell-exprimierten Gens ALMT12 (Aluminium-aktivierter Malattransporter 12) konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Martinoia (Zürich) erste Hinweise auf die Beteiligung dieses Gens an der Stomabewegung demonstrieren. Anschließende Patch-Clamp Untersuchungen an Schließzellprotoplasten aus Wildtyppflanzen und ALMT12-Verlustmutanten zeigten, dass ALMT12 für die Malat-aktivierte R-Typ Anionenstromkomponente verantwortlich ist. Deshalb wurde der Anionenkanal QUAC1 (Quickly activating Anion Channel 1) benannt - in Anlehnung an die Benennung des Anionenkanals SLAC1. Mit der Identifizierung von QUAC1 *in planta* war es nun meine Aufgabe, die elektrischen Eigenschaften von ALMT12/QUAC1 und dessen Aktivitätskontrolle durch die ABA-Signalkaskade im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten zu untersuchen.

Protein-Protein Interaktionsstudien mit der Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenz-Technik, sowie die Beobachtung von markant erhöhten QUAC1 Anionenströmen in Anwesenheit der SnRK2 Kinase OST1 und den Calcium-abhängigen Kinasen CPK2 und CPK20, ließen den Schluss zu, dass QUAC1, ebenso wie SLAC1, unter der Kontrolle des schnellen ABA-Signalwegs steht. Eine zusätzliche Expression des negativen Regulators ABI1 unterdrückte die aktivierenden Eigenschaften der QUAC1-aktivierenden Kinasen, was die Hypothese der Koregulation von S- und R-Typ Anionenkanälen durch die gleiche ABA-Signalkaskade weiter unterstützt.

Zur weiteren Aufklärung der elektrischen Eigenschaften von QUAC1 wurden tiefgreifende elektrophysiologische Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Technik durchgeführt. Durch die Wahl von geschickten Spannungsprotokollen konnte sowohl die schnelle Aktivierungskinetik als auch die schnelle Deaktivierungskinetik von QUAC1 bestimmt und quantifiziert werden. Diese Stromantworten waren sehr ähnlich zu den R-Typ Strömen, die man von Patch-Clamp Untersuchungen an Schließzellprotoplasten kannte, was ein weiteres Indiz dafür war, dass es sich bei QUAC1 tatsächlich um eine Komponente des R-Typ Kanals aus Schließzellen handelt. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Spannungsabhängigkeit und der Selektivität von QUAC1 charakterisierten das Protein als einen Depolarisations-aktivierten Anionenkanal mit einer starken Präferenz für Dicarbonsäuren wie Malat und Fumarat. Zudem konnte auch eine Leitfähigkeit für Sulfat und Chlorid nachgewiesen werden. Interessanterweise erwies sich Malat nicht nur als ein permeierendes Ion, sondern auch als ein regulierendes Ion, welches das spannungsabhängige Schalten von QUAC1 maßgeblich beeinflusst. Extrazelluläres Malat verschob die Offenwahrscheinlichkeit von QUAC1 sehr stark zu negativeren Membranspannungen, so dass der Anionenkanal bereits bei typischen Ruhespannungen von Schließzellen (ca. -150 mV) aktiviert werden konnte. Eine Beladung von QUAC1-exprimierender Oozyten mit Malat bewirkte zum einen höhere Anioneneffluxströme, aber auch eine Verschiebung der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit zu negativeren Membranpotentialen.

Struktur-Funktionsanalysen sollten die umstrittene Topologie von ALMT-ähnlichen Proteinen beleuchten und die molekulare Herkunft der Phosphorylierungsaktivierung aufzeigen, sowie die Malatabhängigkeit und die starke Spannungsabhängigkeit von QUAC1 aufklären. Es zeigte sich jedoch schnell, dass Punktmutationen und Deletionen im C-Terminus von QUAC1 sehr häufig zu nicht-funktionellen Mutanten führten. Diese Tatsache weist darauf hin, dass es sich um einen hoch-strukturierten und funktionell sehr wichtigen Bereich des Anionenkanals

handelt. Auch die Topologie des Anionenkanalproteins wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sowohl die Lage des N- und C-Terminus (extrazellulär oder intrazellulär), als auch die Anzahl der membrandurchspannenden Domänen war nicht abschließend geklärt. Deshalb wurde in einem Fluoreszenz-basiertem Ansatz die Lage der Termini bestimmt. Im Rahmen meiner Arbeit konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass sich beide Termini im Zytosol der Zelle befinden. Auf Grundlage von Modellen aus der Literatur und meiner Topologiebestimmungen konnte schließlich ein erweitertes Modell zur Struktur von QUAC1 entwickelt werden. Dieses Modell kann in Zukunft als Ausgangspunkt für weiterführende Struktur-Funktionsanalysen dienen.

Diese Arbeit hat somit gezeigt, dass das Gen QUAC1 tatsächlich eine Komponente der R-Typ Ströme in Schließzellen kodiert. Ebenso wie SLAC1 steht der Malat-induzierte Anionenkanal QUAC1 unter der Kontrolle der schnellen ABA-Signalkaskade. In Zukunft bleibt zu klären, welche weiteren Gene für die R-Typ Kanalproteine in Schließzellen kodieren und welche strukturelle Grundlage für die besonderen Eigenschaften von QUAC1 hinsichtlich seiner schnellen Kinetiken, seiner Selektivität und Aktivierbarkeit durch Malat.

6 Summary

Higher plants are able to exchange gases with their environment. This gas exchange is accomplished by the stomatal complex, which consist of two turgor-driven guard cells (GC) that surround a pore in the epidermis. Under drought conditions, guard cells produce and import the plant stress hormone abscisic acid (ABA). ABA is able to activate plasma membrane localized ion channels via the fast ABA-signal cascade, which leads to a closure of the stoma and thus minimizes the loss of water. The stomatal closure is initialized by the R-(rapid) and S-(slow) type anion channels. Although R- and S-type anion channels in guard cells have been known for over a decade, the gene which decodes the S-type anion channel SLAC1 (Slow activating Anion Channel 1) has only recently been identified. Consequently, the relationship between the plant hormone ABA, the ABA-signal-transduction-chain, and the activity of SLAC1 could be clarified in rapid succession in the heterologous expression system of *X. laevis* oocytes as well as in GC-protoplasts. It could be shown that ABA is recognized by a cytosolic receptor/phosphatase complex (RCAR/ABI1). This complex in turn regulates the activity of calcium dependent kinases of the CPK-family as well as the calcium independent kinases of the SnRK2-family (OST1). In the presence of ABA, these kinases activate SLAC1 by phosphorylation, and by this activate anion currents across the plasma membrane, ultimately leading to closure of the stomates.

The genetic origin of the ABA induced R-type currents in guard cells was unknown at the beginning of this thesis. R-type currents are characterized by strong voltage-dependent behavior and fast activation- and deactivation-kinetics. In cooperation with the workgroup of Martinoia (Zürich), knock-out plants missing the guard cell gen ALMT12 (Aluminum activated Malate Transporter 12) were characterized. This work delivered the first hints that ALMT12 is involved in the stomatal movement. Subsequent patch-clamp studies on GC-protoplasts from WT and ALMT12 knock-out mutants revealed that ALMT12 is responsible for the malate-activated component of the R-type anion currents. Therefore, the anion-channel was named QUAC1 (Quick activating Anion Channel) in dependence on the naming of SLAC1. With the identification of QUAC1 *in planta* it was my duty to research the electrical properties of ALMT12/QUAC1 as well as the activation by the ABA-signal-transduction-chain in the heterologous expression system of *X. laevis* oocytes.

Protein-protein interaction studies via bimolecular fluorescence complementation (BIFC) as well as significantly higher QUAC1 anion currents in the presence of the SnRK2 kinase OST1 and the calcium-dependent-kinases CPK2 and CPK20 led to the conclusion that QUAC1 is under the control of the fast ABA signaling pathway, as it was shown before for SLAC1. Furthermore expression of the negative regulator ABI1 inhibited the activating properties of the QUAC1-activating kinases. These findings support further the hypotheses of the simultaneous regulation of S- and R-type anion channels by the ABA-signaling pathway.

To further elucidate the electrical properties of QUAC1, electrophysiological investigations were performed with the two-electrode-voltage-clamp technique (TEVC). In this way, the fast activation and deactivation of QUAC1 could be identified and quantified by carefully chosen voltage-clamp protocols. These current responses of QUAC1 closely resembled the R-type currents known from former patch-clamp studies from GC-protoplasts. This further supported the conclusion that QUAC1 is indeed a component of the R-type channels of guard cells. Additional investigations of the voltage-dependence and selectivity of QUAC1 characterized the protein as a depolarization-activated anion channel with strong preference for bicarbonate acids like malate and fumarate. Furthermore, a conductance for sulfate and chloride could also be shown. Interestingly, malate was not only able to permeate the channel, it was also able to alter the voltage-dependence of QUAC1. External malate strongly shifted the open probability of QUAC1 to negative membrane voltages. By this shift the anion channel could be activated at typical guard cell membrane potentials (approx. 150 mV). Loading of QUAC1 expressing oocytes with malate produced enhanced anion efflux currents and shift the voltage-dependent open probability to negative membrane potentials.

Structure function analysis were performed to clarify the controversial topology of ALMT like proteins and the molecular origin of the phosphorylation activation. Furthermore, this should elucidate the origin of the malate dependence and the strong voltage dependence of QUAC1. It soon became evident that point mutations and deletions in the C-terminus of QUAC1 very often lead to nonfunctional mutants. This points toward a highly structured and functionally important region of the anion channel. In addition, the topology of the anion-channel-protein is controversially debated in literature. Neither the position of the C- and N-terminus (intra- or extracellular) nor the number of transmembrane domains has been conclusively established. Due to this, the position of the C- and N-termini were localized by a fluorescence based experiment. As part of this work, it could be shown explicitly that both termini reside in the cytosol of the cell. Based on models from the literature and my own topology studies, an

enhanced structure model for QUAC1 could be generated. This model will serve as a starting point for future structure function analysis.

This work has thus shown that the gene QUAC1 indeed encodes a component of the R-type currents in guard cells. Like SLAC1, the malate-induced anion channel QUAC1 is under the control of the fast ABA-signal-cascade. Future works must establish which further genes encode R-type channel proteins and which structural attributes are responsible for the special traits of QUAC1: its fast kinetics, its selectivity and its activation by malate.

7 Anhang

7.1 Eidesstattliche 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 der vorliegenden noch in einer ähnlichen Fassung in anderen Prüfungsverfahren oder an anderen Fakultäten vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht

Würzburg, den.....

Dennis Imes

7.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Bereitstellung einer interessanten Thematik und der Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich freue mich über das Vertrauen, das mir entgegen gebracht wurde, auf dem Feld der R-Typ Kanäle zu forschen, einem Gebiet an dem Herr Hedrich stark interessiert ist und persönlich schon vor 20 Jahren arbeitete.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Zweitgutachtertätigkeit dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Dietmar Geiger für die Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit bedanken. Dietmar, es ist unglaublich mit welcher Geduld, Hingabe und Freundlichkeit du das alles schulterst.

Vielen Dank meiner Arbeitsgruppe (Sönke, Tobi, Jenny, Anke, Carmen, Cristof, Nadine), die mit ihrer Art mein Leben reicher gemacht hat und stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Botanik1 und für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank geht an die Biologisch-Technischen-Assistentinnen und die Angestellten der Werkstatt. Wie so oft sind es die kleinen (oder auch großen) Dinge mit denen einem weitergeholfen wurde.

Vielen Dank Jo-Ana, für so vieles, ich fang besser nicht an aufzuzählen. Ach ja noch was: Tuuut!

Ich danke meiner Mutter, die immer für mich da ist, egal wie die Umstände sein mögen.

Abschließend möchte ich noch eins sagen: In einer Doktorarbeit lernt man vieles. Neben den fachlichen Kompetenzen, erwirbt man nebenbei auch Eigenschaften im Umgang mit Menschen. Egal ob diese nun freundlich, mürrisch oder sonst wie geartet sind. Man erwirbt auch eine Menge Durchhaltevermögen, Organisationstalent und wohl noch mehr Frustrtoleranz. Bevor man jedoch zurückblicken kann, und sich über diese Fähigkeiten freut, braucht man Freunde. Ich glaube kein Doktorrand wäre jemals an diesem Punkt, wenn er nicht Menschen hätte, auf die man sich verlassen kann. Deswegen möchte ich hier nochmals allen meinen Freunden Danken. Egal wie sie mich unterstütz haben, sei es z.B. durch Aufmunterungen, Korrekturen, nörgelndes oder interessiertes Nachfragen, mir ein zu Hause zu geben oder eben einen kräftigen Tritt in den Hintern. Ich nenne keine Namen, wen ich zu meinen Freunden zähle, der weiß dies. Doppelnennung in der Danksagung sind möglich. Danke.

7.3 Primerliste

Tabelle 7.3.1: Verwendete Primer zur Herstellung von QUAC1 WT DNA und beschriebenen Mutanten.

Name	Sequenz
IVT fwd	CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C
IVT rev	GAT TAC GCC AAG CTA TTT AGG TG
ALMT12 fwd	GGC TTA AUA TGT CCA ATA AGG TTC ACG TAG GG
ALMT12 rev	GGT TTA AUT CAT TCC GCG GCA CCC ACA CTG
ALMT12 rev OS	GGT TTA AUC CTT CCG CAC CCA CAC TGA TC
ALMT12 E276Q user fwd	ATT GGC AAC CUA GAC ACA CTC TAC GTT GTC ATA GAT T
ALMT12 E276Q user rev	AGG TTG CCA AUT TGC ATA TAA TGC AAG TGT TTC
ALMT12 S372A user fwd	AAT GCC GCU ATC AAG TCT CAG CCT
ALMT12 S372A user rev	AGC GGC ATU AAG ATC TTG AAG TGC CAC GT
ALMT12 S376A user fwd	AAG GCT CAG CCU AAA CTC TTC CTT G
ALMT12 S376A user rev	AGG CTG AGC CTU GAT AGC GGA ATT AAG ATC TTG AAG
ALMT12 S384A user fwd	AGC TAA CCT CCA UCG TCA CAA TAA TAA A
ALMT12 S384A user rev	ATG GAG GTT AGC UCC AAG GAA GAG TTT AGG CTG AGA
ALMT12 d218-561 user rev	GGT TTA AUT TAC TTG TGT AGA TCT TCA CCA GAC C
ALMT12 446 fwd neu	AGC TTT AGG ACU GAC ACG TCA GC
ALMT12 d347-446 (377-448) user fwd	ATC AAG TCU TCA AGC TTT AGG ACT GAC ACG TC
ALMT12 d347-446 (377-448) user rev	AGA CTT GAU AGC GGA ATT AAG ATC
ALMT12 356 user rev	AGT CCT AAA GCU CGG TGA ACA ATG ACG GTG G
ALMT12 323 user rev	AGT CCT AAA GCU GCG AAC GGA TCT TGG AGT TTG
ALMT12 284 user rev	AGT CCT AAA GCU ATG ACA ACG TAG AGT GTG TCT TGG
ALMT12 234 user rev	AGT CCT AAA GCU CAC ACA TGC TTC TAT AGA GCG AG
ALMT12 d2-21 user fwd	GGC TTA AUA TGG TTC TCG AAC CTT CTG AAA AGA
ALMT12 448-533 fwd	AAC AAG CGA GAU CAG ACG GC
ALMT12 d533-561 user rev	GGT TTA AUT TAA TAC TCC TTA AAA CTT GCG ATC CTT C
ALMT12 d323-356 user fwd	AGA TTC TAU CCG ATC ATC TCC AC
ALMT12 d323-356 user rev	ATA GAA TCU CGC GAA CGG ATC TTG GAG TTT G
ALMT12 284-323 user rev	ATG ACA ACG UAG AGT GTG TCT TGG
ALMT12 284-323 user fwd	ACG TTG TCA UGA TGA GTA CTT TGA GGA GAA AGA G
ALMT12 234-284 user rev	ACA CAT GCU TCT ATA GAG CGA GAG
ALMT12 234-284 user fwd	AGC ATG TGU GAG ATT TCC ATG TCA ACA ATA TGT TAA

7.4 Lebenslauf

7.5 Publikationen

- D. Imes**, P. Mumm, J. Bohm, K. A. Al-Rasheid, I. Marten, D. Geiger, R. Hedrich (2013). "Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells." Plant J **74**(3): 372-382.
- P. Mumm, **D. Imes**, E. Martinoia, K. A. Al-Rasheid, D. Geiger, I. Marten, R. Hedrich (2013). "C-terminus-mediated voltage gating of Arabidopsis guard cell anion channel QUAC1." Mol Plant **6**(5): 1550-1563.
- S. Meyer, P. Mumm, **D. Imes**, A. Endler, B. Weder, K. A. Al-Rasheid, D. Geiger, I. Marten, E. Martinoia, R. Hedrich (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. 63.
- V. L Sukhorukov., **D. Imes**, M. W. Woellhaf, J. Andronic, M. Kiesel, R. Shirakashi, U. Zimmermann, H. Zimmermann (2009). "Pore size of swelling-activated channels for organic osmolytes in Jurkat lymphocytes, probed by differential polymer exclusion." Biochim Biophys Acta **1788**(9): 1841-1850. ^

Teilnahme an Konferenzen

- „Deutsche Botanikertagung“, Berlin, Deutschland; 18.-23. September 2011 (Poster): Dennis Imes, Patrick Mumm, Dietmar Geiger, Irene Marten, Rainer Hedrich (2011) “Guard cell anion channel QUAC1 – Identification and biophysical characterization”

7.6 Literaturliste

- Ache, P., D. Becker, et al. (2000). "GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel." FEBS Lett 486(2): 93-98.
- Albrecht, V., O. Ritz, et al. (2001). "The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases." Embo Journal 20(5): 1051-1063.
- Albrecht, V., S. Weinl, et al. (2003). "The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses." Plant Journal 36(4): 457-470.
- Aldrich, R. W. (2001). "Fifty years of inactivation." Nature 411(6838): 643-644.
- Alhazred, A. (738). Necronomicon, The Great Old Ones. ³
- Allaway, W. G. (1973). "Accumulation of Malate in Guard Cells of *Vicia-Faba* during Stomatal Opening." Planta 110(1): 63-70.
- Assmann, S. M., L. Simoncini, et al. (1985). "Blue-Light Activates Electrogenic Ion Pumping in Guard-Cell Protoplasts of *Vicia-Faba*." Nature 318(6043): 285-287.
- Barbier-Brygoo, H., A. De Angeli, et al. (2011). "Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks." Annu Rev Plant Biol 62: 25-51.
- Barbier-Brygoo, H., M. Vinauger, et al. (2000). "Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role." Biochim Biophys Acta 1465(1-2): 199-218.
- Barish, M. E. (1983). "A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte." J Physiol 342: 309-325.
- Batistic, O. and J. Kudla (2004). "Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network." Planta 219(6): 915-924.

³ Ya, Ya, Cthulhu fhtagn! Ya, Ya, cthulhu fhtagn!

- Batistic, O. and J. Kudla (2012). "Analysis of calcium signaling pathways in plants." Biochim Biophys Acta 1820(8): 1283-1293.
- Becker, D., I. Dreyer, et al. (1996). "Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1." Proc Natl Acad Sci U S A 93(15): 8123-8128.
- Becker, D., C. Zeilinger, et al. (1993). "Identification and Biochemical-Characterization of the Plasma-Membrane H⁺-Atpase in Guard-Cells of Vicia-Faba L." Planta 190(1): 44-50.
- Bergmann, D. C. and F. D. Sack (2007). "Stomatal development." Annu Rev Plant Biol 58: 163-181.
- Blatt, M. R. (1990). "Potassium Channel Currents in Intact Stomatal Guard-Cells - Rapid Enhancement by Abscisic-Acid." Planta 180(3): 445-455.
- Blatt, M. R. and F. Armstrong (1993). "K⁺ Channels of Stomatal Guard-Cells - Abscisic-Acid-Evoked Control of the Outward Rectifier Mediated by Cytoplasmic Ph." Planta 191(3): 330-341.
- Brandt, B., D. E. Brodsky, et al. (2012). "Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action." Proc Natl Acad Sci U S A 109(26): 10593-10598.
- Chandran, V., E. J. Stollar, et al. (2006). "Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition." J Mol Biol 357(2): 400-410.
- Chen, Y. H., L. Hu, et al. (2010). "Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves." Nature 467(7319): 1074-1080.
- Cheng, S. H., M. R. Willmann, et al. (2002). "Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family." Plant Physiol 129(2): 469-485.
- Cheong, Y. H., K. N. Kim, et al. (2003). "CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis." Plant Cell 15(8): 1833-1845.
- Cheong, Y. H., G. K. Pandey, et al. (2007). "Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis." Plant J 52(2): 223-239.

- Cheong, Y. H., G. K. Pandey, et al. (2007). "Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis." Plant Journal 52(2): 223-239.
- Christmann, A., E. W. Weiler, et al. (2007). "A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage." Plant Journal 52(1): 167-174.
- Ciais, P., A. S. Denning, et al. (1997). "A three-dimensional synthesis study of delta O-18 in atmospheric CO₂. 1. Surface fluxes." Journal of Geophysical Research-Atmospheres 102(D5): 5857-5872.
- Colcombet, J., S. Thomine, et al. (2001). "Nucleotides provide a voltage-sensitive gate for the rapid anion channel of arabidopsis hypocotyl cells." J Biol Chem 276(39): 36139-36145.
- Cole, K. S. (1949). "Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane." Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 253-258.
- Cutler, S. R., P. L. Rodriguez, et al. (2010). "Abscisic acid: emergence of a core signaling network." Annu Rev Plant Biol 61: 651-679.
- D'Angelo, C., S. Weinl, et al. (2006). "Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis." Plant J 48(6): 857-872.
- De Angeli, A., D. Monachello, et al. (2009). "Review. CLC-mediated anion transport in plant cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364(1514): 195-201.
- De Angeli, A., J. Zhang, et al. (2013). "AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in Arabidopsis." Nat Commun 4: 1804.
- Demichel.Dw and P. J. H. Sharpe (1973). "Analysis of Mechanics of Guard Cell Motion." Journal of Theoretical Biology 41(1): 77-&.
- Demir, F., C. Horntrich, et al. (2013). "Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3." Proc Natl Acad Sci U S A 110(20): 8296-8301.
- Dietrich, P. and R. Hedrich (1994). "Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a Guard Cell Anion Channel." Planta 195(2): 301-304.

- Dietrich, P. and R. Hedrich (1998). "Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel." Plant Journal 15(4): 479-487.
- Dietrich, P., D. Sanders, et al. (2001). "The role of ion channels in light-dependent stomatal opening." Journal of Experimental Botany 52(363): 1959-1967.
- Dietrich, P., D. Sanders, et al. (2001). "The role of ion channels in light-dependent stomatal opening." J Exp Bot 52(363): 1959-1967.
- Dreyer, I., S. Antunes, et al. (1997). "Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately." Biophys J 72(5): 2143-2150.
- Dreyer, I., J. L. Gomez-Porras, et al. (2012). "Molecular Evolution of Slow and Quick Anion Channels (SLACs and QUACs/ALMTs)." Front Plant Sci 3: 263.
- Dreyer, I. and N. Uozumi (2011). "Potassium channels in plant cells." FEBS J 278(22): 4293-4303.
- Edwards, D. (1993). "Cells and Tissues in the Vegetative Sporophytes of Early Land Plants." New Phytologist 125(2): 225-247.
- Endo, A., Y. Sawada, et al. (2008). "Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells." Plant Physiology 147(4): 1984-1993.
- Felle, H. H., S. Hanstein, et al. (2000). "Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness." Plant Journal 24(3): 297-304.
- Finkel, A. G. and P. W. Gage (1985). "Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes." Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW, eds. Voltage and patch clamping with microelectrodes. Baltimore, USA: Williams and Wilkins Co.: 47-94.
- Finkelstein, R. (2013). "Abscisic Acid synthesis and response." Arabidopsis Book 11: e0166.
- Finkelstein, R., W. Reeves, et al. (2008). "Molecular aspects of seed dormancy." Annu Rev Plant Biol 59: 387-415.
- Fischer, R. A. (1972). "Aspects of Potassium Accumulation by Stomata of *Vicia-Faba*." Australian Journal of Biological Sciences 25(6): 1107-1123.

- Foskett, J. K. (1998). "ClC and CFTR chloride channel gating." Annu Rev Physiol 60: 689-717.
- Frachisse, J. M., S. Thomine, et al. (1999). "Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of Arabidopsis hypocotyl cells." Plant Physiol 121(1): 253-262.
- Franks, P. J., T. N. Buckley, et al. (2001). "Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe." Plant Physiology 125(4): 1577-1584.
- Franks, P. J., I. R. Cowan, et al. (1998). "A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe." Plant Cell and Environment 21(1): 94-100.
- Frayse, L. C., B. Wells, et al. (2005). "Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells." Biology of the Cell 97(7): 519-534.
- Fujita, Y., K. Nakashima, et al. (2009). "Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis." Plant Cell Physiol 50(12): 2123-2132.
- Furuichi, T., T. Sasaki, et al. (2010). "An extracellular hydrophilic carboxy-terminal domain regulates the activity of TaALMT1, the aluminum-activated malate transport protein of wheat." Plant J 64(1): 47-55.
- Gao, Y., Q. Zeng, et al. (2007). "Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis." Plant J 52(6): 1001-1013.
- Geiger, D., T. Maierhofer, et al. (2011). "Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1." Sci Signal 4(173): ra32.
- Geiger, D., S. Scherzer, et al. (2010). "Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities." Proc Natl Acad Sci U S A 107(17): 8023-8028.
- Geiger, D., S. Scherzer, et al. (2009). "Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair." Proc Natl Acad Sci U S A 106(50): 21425-21430.

- Gruber, B. D., P. R. Ryan, et al. (2010). "HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions." J Exp Bot 61(5): 1455-1467.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, et al. (1971). "Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells." Nature 233(5316): 177-&.
- Gutermuth, T., R. Lassig, et al. (2013). "Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20." Plant Cell 25(11): 4525-4543.
- Halford, N. G., S. Hey, et al. (2003). "Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase." J Exp Bot 54(382): 467-475.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein Kinases .6. The Eukaryotic Protein-Kinase Superfamily - Kinase (Catalytic) Domain-Structure and Classification." Faseb Journal 9(8): 576-596.
- Hanks, S. K. and A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol 200: 38-62.
- Harper, J. F., J. F. Huang, et al. (1994). "Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain." Biochemistry 33(23): 7267-7277.
- Hartzell, C., I. Putzier, et al. (2005). "CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS." Annual Review of Physiology 67(1): 719-758.
- Hedrich, R. (2012). "Ion channels in plants." Physiol Rev 92(4): 1777-1811.
- Hedrich, R., H. Busch, et al. (1990). "Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells." EMBO J 9(12): 3889-3892.
- Hedrich, R. and I. Marten (1993). "Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells." EMBO J 12(3): 897-901.
- Hedrich, R., I. Marten, et al. (1994). "Malate-Sensitive Anion Channels Enable Guard-Cells to Sense Changes in the Ambient Co₂ Concentration." Plant Journal 6(5): 741-748.

- Hedrich, R., S. Neimanis, et al. (2001). "Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply." Planta 213(4): 594-601.
- Hetherington, A. M. and F. I. Woodward (2003). "The role of stomata in sensing and driving environmental change." Nature 424(6951): 901-908.
- Hirayama, T. and K. Shinozaki (2007). "Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA." Trends in Plant Science 12(8): 343-351.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, et al. (1949). "Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid." Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 129-150.
- Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, et al. (1952). "Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo." Journal of Physiology-London 116(4): 424-448.
- Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid." J Physiol 108(1): 37-77.
- Hoekenga, O. A., L. G. Maron, et al. (2006). "AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A 103(25): 9738-9743.
- Hosy, E., A. Vavasseur, et al. (2003). "The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration." Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5549-5554.
- Hrabak, E. M., C. W. Chan, et al. (2003). "The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases." Plant Physiol 132(2): 666-680.
- Hrabak, E. M., C. W. M. Chan, et al. (2003). "The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases." Plant Physiology 132(2): 666-680.
- Humble, G. D. and K. Raschke (1971). "Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport: Evidence from Electron Probe Analysis." Plant Physiol 48(4): 447-453.
- Imes, D., P. Mumm, et al. (2013). "Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells." Plant J 74(3): 372-382.

- Jentsch, T. J., I. Neagoe, et al. (2005). "CLC chloride channels and transporters." Curr Opin Neurobiol 15(3): 319-325.
- Jentsch, T. J., M. Poët, et al. (2005). "PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF CLC CI-CHANNELS GLEANED FROM HUMAN GENETIC DISEASE AND MOUSE MODELS." Annual Review of Physiology 67(1): 779-807.
- Jentsch, T. J., K. Steinmeyer, et al. (1990). "Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*." Nature 348(6301): 510-514.
- Kagawa, T., T. Sakai, et al. (2001). "Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response." Science 291(5511): 2138-2141.
- Kaldenhoff, R. and M. Fischer (2006). "Aquaporins in plants." Acta Physiol (Oxf) 187(1-2): 169-176.
- Kaldenhoff, R., A. Kolling, et al. (1993). "A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein." Plant Mol Biol 23(6): 1187-1198.
- Kammerloher, W., U. Fischer, et al. (1994). "Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system." Plant J 6(2): 187-199.
- Kang, J., J. U. Hwang, et al. (2010). "PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid." Proc Natl Acad Sci U S A 107(5): 2355-2360.
- Keller, B. U., R. Hedrich, et al. (1989). "Voltage-Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells." Nature 341(6241): 450-453.
- Kim, T. H., M. Bohmer, et al. (2010). "Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling." Annual Review of Plant Biology, Vol 61 61: 561-591.
- Kinoshita, T., M. Doi, et al. (2001). "Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening." Nature 414(6864): 656-660.
- Kinoshita, T. and K. Shimazaki (1999). "Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells." EMBO J 18(20): 5548-5558.

- Kobayashi, Y., O. A. Hoekenga, et al. (2007). "Characterization of AtALMT1 expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis." Plant Physiol 145(3): 843-852.
- Kolb, H. A., I. Marten, et al. (1995). "Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells." J Membr Biol 146(3): 273-282.
- Kollmeier, M., P. Dietrich, et al. (2001). "Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar." Plant Physiol 126(1): 397-410.
- Koornneef, M., G. Reuling, et al. (1984). "The Isolation and Characterization of Abscisic-Acid Insensitive Mutants of Arabidopsis-Thaliana." Physiologia Plantarum 61(3): 377-383.
- Kovermann, P., S. Meyer, et al. (2007). "The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family." Plant J 52(6): 1169-1180.
- Kudla, J., Q. Xu, et al. (1999). "Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(8): 4718-4723.
- Kuromori, T. and K. Shinozaki (2010). "ABA transport factors found in Arabidopsis ABC transporters." Plant Signal Behav 5(9): 1124-1126.
- Kwak, J. M., Y. Murata, et al. (2001). "Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in arabidopsis." Plant Physiol 127(2): 473-485.
- Lasceve, G., J. Leymarie, et al. (1999). "Arabidopsis contains at least four independent blue-light-activated signal transduction pathways." Plant Physiol 120(2): 605-614.
- Lee, M., Y. Choi, et al. (2008). "The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂." Nat Cell Biol 10(10): 1217-1223.
- Leonhardt, N., A. Vavasseur, et al. (1999). "ATP binding cassette modulators control abscisic acid-regulated slow anion channels in guard cells." Plant Cell 11(6): 1141-1151.
- Leran, S., K. Varala, et al. (2014). "A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants." Trends Plant Sci 19(1): 5-9.

- Leung, J., M. Bouvierdurand, et al. (1994). "Arabidopsis Aba Response Gene *Abi1* - Features of a Calcium-Modulated Protein Phosphatase." Science 264(5164): 1448-1452.
- Leung, J., S. Merlot, et al. (1997). "The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction." Plant Cell 9(5): 759-771.
- Levchenko, V., K. R. Konrad, et al. (2005). "Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals." Proc Natl Acad Sci U S A 102(11): 4203-4208.
- Li, L., B. G. Kim, et al. (2006). "A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A 103(33): 12625-12630.
- Ligaba, A., I. Dreyer, et al. (2013). "Functional, structural and phylogenetic analysis of domains underlying the Al sensitivity of the aluminum-activated malate/anion transporter, *TaALMT1*." Plant J 76(5): 766-780.
- Ligaba, A., M. Katsuhara, et al. (2006). "The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells." Plant Physiol 142(3): 1294-1303.
- Ligaba, A., L. Kochian, et al. (2009). "Phosphorylation at S384 regulates the activity of the *TaALMT1* malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat." Plant J 60(3): 411-423.
- Ligaba, A., L. Maron, et al. (2012). "Maize *ZmALMT2* is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux." Plant Cell Environ 35(7): 1185-1200.
- Lisal, J. and M. Maduke (2008). "The *ClC-0* chloride channel is a 'broken' Cl⁻/H⁺ antiporter." Nat Struct Mol Biol 15(8): 805-810.
- Liu, X., Y. Yue, et al. (2007). "A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid." Science 315(5819): 1712-1716.
- Luan, S. (2003). "Protein phosphatases in plants." Annu Rev Plant Biol 54: 63-92.
- Luan, S. (2009). "The CBL-CIPK network in plant calcium signaling." Trends in Plant Science 14(1): 37-42.

- Ma, S. Y. and W. H. Wu (2007). "AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses." Plant Molecular Biology 65(4): 511-518.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, et al. (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science 324(5930): 1064-1068.
- MacRobbie, E. A. (1998). "Signal transduction and ion channels in guard cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353(1374): 1475-1488.
- MacRobbie, E. A. C. (1987). Ionic relations of guard cells. Stomatal Function - Zeiger, E., Farquhar, Gd, Cowan, Jr, University Press: 125-162.
- MacRobbie, E. A. C. (2006). "Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(4): 1135-1140.
- Maierhofer, T., M. Diekmann, et al. (2014). "Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid." Sci Signal 7(342): ra86.
- Maierhofer, T., C. Lind, et al. (2014). "A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective." Plant Cell 26(6): 2554-2567.
- Marmont, G. (1949). "Studies on the Axon Membrane .1. A New Method." Journal of Cellular and Comparative Physiology 34(3): 351-382.
- Marten, H., R. Hedrich, et al. (2007). "Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner." Plant J 50(1): 29-39.
- Marten, H., K. R. Konrad, et al. (2007). "Ca²⁺-dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*." Plant Physiol 143(1): 28-37.
- Marten, H., K. R. Konrad, et al. (2007). "Ca²⁺-dependent and -independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*." Plant Physiology 143(1): 28-37.
- Marten, I., C. Zeilinger, et al. (1992). "Identification and modulation of a voltage-dependent anion channel in the plasma membrane of guard cells by high-affinity ligands." EMBO J 11(10): 3569-3575.

- Martinoia, E., M. Maeshima, et al. (2007). "Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism." Journal of Experimental Botany 58(1): 83-102.
- Mcainsh, M. R., C. Brownlee, et al. (1990). "Abscisic Acid-Induced Elevation of Guard-Cell Cytosolic Ca²⁺ Precedes Stomatal Closure." Nature 343(6254): 186-188.
- McAInsh, M. R., C. Brownlee, et al. (1992). "Visualizing Changes in Cytosolic-Free Ca²⁺ during the Response of Stomatal Guard Cells to Abscisic Acid." Plant Cell 4(9): 1113-1122.
- Mehta, A. (2005). "CFTR: more than just a chloride channel." Pediatr Pulmonol 39(4): 292-298.
- Melotto, M., W. Underwood, et al. (2006). "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion." Cell 126(5): 969-980.
- Merlot, S., N. Leonhardt, et al. (2007). "Constitutive activation of a plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure." EMBO J 26(13): 3216-3226.
- Merlot, S., A. C. Mustilli, et al. (2002). "Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation." Plant J 30(5): 601-609.
- Meyer, K., M. P. Leube, et al. (1994). "A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana." Science 264(5164): 1452-1455.
- Meyer, S., P. Mumm, et al. (2010). "AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells." Plant J 63(6): 1054-1062.
- Meyer, S., P. Mumm, et al. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. 63.
- Meyer, S., P. Mumm, et al. (2010). "AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells." Plant J.
- Meyer, S., J. Scholz-Starke, et al. (2011). "Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation." Plant J 67(2): 247-257.
- Miledi, R. (1982). "A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes." Proc R Soc Lond B Biol Sci 215(1201): 491-497.

- Miller, C. (2006). "ClC chloride channels viewed through a transporter lens." Nature 440(7083): 484-489.
- Miller, C. and M. M. White (1980). "A VOLTAGE-DEPENDENT CHLORIDE CONDUCTANCE CHANNEL FROM TORPEDO ELECTROPLAX MEMBRANE*." Annals of the New York Academy of Sciences 341(1): 534-551.
- Mori, I. C., Y. Murata, et al. (2006). "CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure." PLoS Biol 4(10): e327.
- Motoda, H., T. Sasaki, et al. (2007). "The Membrane Topology of ALMT1, an Aluminum-Activated Malate Transport Protein in Wheat (*Triticum aestivum*)." Plant Signal Behav 2(6): 467-472.
- Muller, A. H. and M. Hansson (2009). "The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor." Plant Physiol 150(1): 157-166.
- Mumm, P., D. Imes, et al. (2013). "C-terminus-mediated voltage gating of Arabidopsis guard cell anion channel QUAC1." Mol Plant 6(5): 1550-1563.
- Mustilli, A. C., S. Merlot, et al. (2002). "Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production." Plant Cell 14(12): 3089-3099.
- Nakamura, R. L., W. L. McKendree, Jr., et al. (1995). "Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells." Plant Physiol 109(2): 371-374.
- Nakashima, K., Y. Fujita, et al. (2009). "Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy." Plant Cell Physiol 50(7): 1345-1363.
- Negi, J., O. Matsuda, et al. (2008). "CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells." Nature 452(7186): 483-486.
- Nishimura, N., K. Hitomi, et al. (2009). "Structural Mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1." Science 326(5958): 1373-1379.
- Nishimura, N., T. Yoshida, et al. (2007). "ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed." Plant J 50(6): 935-949.

- Nour-Eldin, H. H., T. G. Andersen, et al. (2012). "NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds." Nature 488(7412): 531-534.
- Ostedgaard, L. S., O. Baldursson, et al. (2001). "Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain." J Biol Chem 276(11): 7689-7692.
- Outlaw, W. H. and O. H. Lowry (1977). "Organic-Acid and Potassium Accumulation in Guard Cells during Stomatal Opening." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(10): 4434-4438.
- Pandey, G. K., Y. H. Cheong, et al. (2004). "The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis." Plant Cell 16(7): 1912-1924.
- Park, S. Y., P. Fung, et al. (2009). "Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." Science 324(5930): 1068-1071.
- Peer, W. A., J. J. Blakeslee, et al. (2011). "Seven things we think we know about auxin transport." Mol Plant 4(3): 487-504.
- Pei, Z. M., K. Kuchitsu, et al. (1997). "Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and abi1 and abi2 mutants." Plant Cell 9(3): 409-423.
- Pei, Z. M., Y. Murata, et al. (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells." Nature 406(6797): 731-734.
- Pineros, M. A., G. M. Cancado, et al. (2008). "Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus* Oocytes: functional and structural implications." Plant Physiol 147(4): 2131-2146.
- Pineros, M. A., G. M. Cancado, et al. (2008). "Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 - an anion-selective transporter." Plant J 53(2): 352-367.
- Pineros, M. A. and L. V. Kochian (2001). "A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al(3⁺)-induced anion channels." Plant Physiol 125(1): 292-305.

- Raschke, K. and H. Schnabl (1978). "Availability of Chloride Affects Balance between Potassium-Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of *Vicia-Faba* L." Plant Physiology 62(1): 84-87.
- Raschke, K., M. Shabahang, et al. (2003). "The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂." Planta 217(4): 639-650.
- Risk, J. M., C. L. Day, et al. (2009). "Reevaluation of abscisic acid-binding assays shows that G-Protein-Coupled Receptor2 does not bind abscisic Acid." Plant Physiol 150(1): 6-11.
- Roberts, S. K. (2006). "Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots." New Phytol 169(4): 647-666.
- Rodriguez, P. L., G. Benning, et al. (1998). "ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." FEBS Lett 421(3): 185-190.
- Roelfsema, M. R. and R. Hedrich (2010). "Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements." Plant Cell Environ 33(3): 305-321.
- Roelfsema, M. R., V. Levchenko, et al. (2004). "ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels." Plant J 37(4): 578-588.
- Roelfsema, M. R. and H. B. Prins (1998). "The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification." Planta 205(1): 100-112.
- Roelfsema, M. R., R. Steinmeyer, et al. (2001). "Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane." Plant J 26(1): 1-13.
- Roelfsema, M. R. G. and R. Hedrich (2005). "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." New Phytologist 167(3): 665-691.
- Roelfsema, M. R. G., M. Staal, et al. (1998). "Blue light-induced apoplastic acidification of *Arabidopsis thaliana* guard cells: Inhibition by ABA is mediated through protein phosphatases." Physiologia Plantarum 103(4): 466-474.

- Rubio, S., A. Rodrigues, et al. (2009). "Triple Loss of Function of Protein Phosphatases Type 2C Leads to Partial Constitutive Response to Endogenous Abscisic Acid." Plant Physiology 150(3): 1345-1355.
- Saez, A., N. Apostolova, et al. (2004). "Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling." Plant J 37(3): 354-369.
- Saez, A., N. Robert, et al. (2006). "Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1." Plant Physiol 141(4): 1389-1399.
- Sakai, T., T. Kagawa, et al. (2001). "Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation." Proc Natl Acad Sci U S A 98(12): 6969-6974.
- Sanchez-Fernandez, R., T. G. E. Davies, et al. (2001). "The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory." Journal of Biological Chemistry 276(32): 30231-30244.
- Santiago, J., F. Dupeux, et al. (2009). "The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid." Nature 462(7273): 665-U143.
- Sarda, X., D. Tusch, et al. (1997). "Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells." Plant J 12(5): 1103-1111.
- Sasaki, T., Y. Yamamoto, et al. (2004). "A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter." Plant Journal 37(5): 645-653.
- Sasaki, T., Y. Yamamoto, et al. (2004). "A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter." Plant J 37(5): 645-653.
- Sato, A., Y. Sato, et al. (2009). "Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase." Biochem J 424(3): 439-448.
- Sauter, A., W. J. Davies, et al. (2001). "The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot." J Exp Bot 52(363): 1991-1997.
- Savchenko, G., C. Wiese, et al. (2000). "pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves." Planta 211(2): 246-255.

- Schachtman, D. P., J. I. Schroeder, et al. (1992). "Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA." Science 258(5088): 1654-1658.
- Scherzer, S. (2012). Biophysikalische Analyse und Rekonstitution des schnellen ABA-Signaltransduktionsweges aus Arabidopsis thaliana, University of Wuerzburg.
- Scherzer, S., T. Maierhofer, et al. (2012). "Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels." Mol Plant 5(6): 1409-1412.
- Schroeder, B. C., T. Cheng, et al. (2008). "Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit." Cell 134(6): 1019-1029.
- Schroeder, J. I. and S. Hagiwara (1989). "Cytosolic Calcium Regulates Ion Channels in the Plasma-Membrane of Vicia-Faba Guard-Cells." Nature 338(6214): 427-430.
- Sharma, T., I. Dreyer, et al. (2013). "The role of K(+) channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant Arabidopsis thaliana." Front Plant Sci 4: 224.
- Sharp, R. E. and M. E. LeNoble (2002). "ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress." J Exp Bot 53(366): 33-37.
- Sheen, J. (1996). "Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants." Science 274(5294): 1900-1902.
- Shen, Y. Y., X. F. Wang, et al. (2006). "The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor." Nature 443(7113): 823-826.
- Shimazaki, K., M. Iino, et al. (1986). "Blue Light-Dependent Proton Extrusion by Guard-Cell Protoplasts of Vicia-Faba." Nature 319(6051): 324-326.
- Shoemaker, E. M. and Srivastava, L. M. (1973). "Mechanics of Stomatal Opening in Corn (Zea-Mays L) Leaves." Journal of Theoretical Biology 42(2): 219-&.
- Shope, J. C., D. B. DeWald, et al. (2003). "Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization." Plant Physiol 133(3): 1314-1321.
- Shope, J. C. and K. A. Mott (2006). "Membrane trafficking and osmotically induced volume changes in guard cells." J Exp Bot 57(15): 4123-4131.

- Smith, F. A. and J. A. Raven (1979). "INTRACELLULAR PH AND ITS REGULATION." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 30: 289-311.
- Stange, A., R. Hedrich, et al. (2010). "Ca(2+)-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization." Plant J 62(2): 265-276.
- Stange, A., R. Hedrich, et al. (2010). "Ca(2+)-dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization." Plant Journal 62(2): 265-276.
- Stoelzle, S., T. Kagawa, et al. (2003). "Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1456-1461.
- Sutter, J. U., C. Sieben, et al. (2007). "Abscisic acid triggers the endocytosis of the arabidopsis KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane." Curr Biol 17(16): 1396-1402.
- Szyroki, A., N. Ivashikina, et al. (2001). "KAT1 is not essential for stomatal opening." Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2917-2921.
- Thomine, S., S. Zimmermann, et al. (1995). "ATP-Dependent Regulation of an Anion Channel at the Plasma Membrane of Protoplasts from Epidermal Cells of Arabidopsis Hypocotyls." Plant Cell 7(12): 2091-2100.
- Umezawa, T., K. Nakashima, et al. (2010). "Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport." Plant Cell Physiol 51(11): 1821-1839.
- Umezawa, T., N. Sugiyama, et al. (2009). "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(41): 17588-17593.
- Vahisalu, T., H. Kollist, et al. (2008). "SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling." Nature 452(7186): 487-491.
- Viaene, T., K. Landberg, et al. (2014). "Directional Auxin Transport Mechanisms in Early Diverging Land Plants." Curr Biol 24(23): 2786-2791.

- Vlad, F., S. Rubio, et al. (2009). "Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in Arabidopsis." Plant Cell 21(10): 3170-3184.
- Wille, A. C. and W. J. Lucas (1984). "Ultrastructural and Histochemical-Studies on Guard-Cells." Planta 160(2): 129-142.
- Willmer, C. M. and M. D. Fricker (1996). "Stomata." 2nd Ed. Chapman and Hall.
- Xu, J., H. D. Li, et al. (2006). "A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis." Cell 125(7): 1347-1360.
- Yamaguchi, M. and K. Kasamo (2001). "Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells." Plant Cell Physiol 42(5): 516-523.
- Yamaguchi, M., T. Sasaki, et al. (2005). "Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1)." Plant Cell Physiol 46(5): 812-816.
- Yeats, T. H. and J. K. Rose (2013). "The formation and function of plant cuticles." Plant Physiol 163(1): 5-20.
- Yoshida, R., T. Hobo, et al. (2002). "ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology 43(12): 1473-1483.
- Yoshida, R., T. Umezawa, et al. (2006). "The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis." Journal of Biological Chemistry 281(8): 5310-5318.
- Young, B., R. Wightman, et al. (2010). "pH-sensitivity of YFP provides an intracellular indicator of programmed cell death." Plant Methods 6: 27.
- Zhang, J., U. Baetz, et al. (2013). "Identification of a probable pore-forming domain in the multimeric vacuolar anion channel AtALMT9." Plant Physiol 163(2): 830-843.
- Zhang, J., E. Martinoia, et al. (2014). "Cytosolic nucleotides block and regulate the Arabidopsis vacuolar anion channel AtALMT9." J Biol Chem 289(37): 25581-25589.

- Zhang, W. H., P. R. Ryan, et al. (2008). "Characterization of the TaALMT1 protein as an Al³⁺-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells." Plant Cell Physiol 49(9): 1316-1330.
- Zhang, X., H. Wang, et al. (2004). "Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts." Plant Physiol 136(4): 4150-4158.
- Zhou, M., J. H. Morais-Cabral, et al. (2001). "Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors." Nature 411(6838): 657-661.
- Zhu, S. Y., X. C. Yu, et al. (2007). "Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*." Plant Cell 19(10): 3019-3036.
- Zifarelli, G. and M. Pusch (2010). "CLC transport proteins in plants." Febs Letters 584(10): 2122-2127.
- Zimmermann, S., S. Thomine, et al. (1994). "An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin." The Plant Journal 6(5): 707-716.