

Lokalisation, Funktion und Regulation pflanzlicher Tandem-Poren-Kaliumkanäle in *Arabidopsis thaliana*

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Andreas Latz

aus Neukirchen bei heilig Blut

Würzburg 2007

Eingereicht am: 24.05.2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Eidesstattliche Erklärung

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

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 24.05.2007

.....
Andreas Latz

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik an der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Hedrich im Zeitraum von Januar 2003 bis Januar 2007 angefertigt.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die interessante Themenstellung, für vielfältige Diskussionen und Anregungen sowie für die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn PD Dr. Dirk Becker für seine sehr gute und geduldige Betreuung, für seine ständige Hilfsbereitschaft und für den großzügigen Freiraum für mich und meine Arbeit aussprechen.

Ganz herzlich möchte ich mich ausnahmslos bei der gesamten Arbeitsgruppe Hedrich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Kollegialität bedanken. Mit einschließen möchte ich dabei auch alle ehemaligen Mitarbeiter sowie die Werkstatt, den Garten, unseren Sekretär Matthias Dziony, unseren Systemadministrator Dr. Christian Wiese und Marlene Barecca. Ein besonderes Augenmerk möchte ich hierbei auf Kerstin Neuwinger und Julia Schwarz legen für die zeitintensive Hilfe bei der Auszählung der Keimungsversuche.

Mirko Heckmann vom MSZ in Würzburg möchte ich für die Durchführung der SPR Analysen und für die Einführung in die Techniken der Proteinaufreinigung danken.

Joachim Nickel und Thomas Müller von der physiologischen Chemie II in Würzburg möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die radioaktiven Untersuchungen und die Arbeit am Strukturmodell von TPK4 danken.

Adam Bertl aus Karlsruhe möchte ich für die funktionellen Analysen von TPK1 in Hefevakuolen danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Natalya Ivashikina für die funktionellen Messungen von TPK4 in infiltrierten Tabakblättern.

Sean Chapman und Karl Oparka vom Scottish Crop Research Institute in Dundee möchte ich für die Einführung in die Agro-Infiltrationstechnik und für die Bereitstellung von *Nicotiana benthamiana* Samen danken.

Allen, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

Meiner Frau Tina Latz möchte ich für die verständnisvolle Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für den liebevollen Beistand während meiner Ausbildung.

Dem SFB 478 möchte ich für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit danken.

Lebenslauf

Name: Andreas Latz
Geburtsdatum: 27. September 1974
Geburtsort: Neukirchen bei heilig Blut
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung an Schulen und Universitäten:

1981-1985: Besuch der Grundschule Hegelschule in Nürnberg
1985-1994: Besuch des Platengymnasiums in Ansbach
Juni 1994: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1995: Wehersatzdienst im St. Ludwig Altenheim in Ansbach
Oktober 1996: Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Würzburg
Oktober 2001 bis
Oktober 2002: Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Hedrich mit dem Thema "**Zellbiologische Untersuchungen zur Expression und Lokalisation pflanzlicher Ionenkanäle.**" am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Dezember 2002: Studienabschluss: Diplom
Januar 2003: Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation; seitdem wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Hedrich

Publikationen:

1. Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., **Latz, A.**, Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. and Hedrich, R. (2004) **AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 15621-15626
2. Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, R.M., **Latz, A.**, Lacombe, B., Hedrich, R., Dietrich, P., and Becker, D. (2005) **AtGLR3.4 represents an *Arabidopsis* glutamate-, touch-, and cold-sensitive receptor gene.** *Planta*, Oct;222(3):418-27.
3. Arend, M., Stinzinger, A., Wind, C., Langer, K., **Latz, A.**, Becker, D., Ache, P., Fromm, J., and Hedrich, R. (2005) **Cellular- and subcellular localization of ion channels and electrical properties of wood producing cells.** *Planta*, Dec;223(1):140-8.
4. **Latz, A.**, Ivashikina, N., Ache, P., Becker, D., Hedrich, R. (2006) **In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca²⁺-sensitive inward rectifying K⁺ channel,** *Planta in press.*
5. **Latz, A.**, Bertl, A., Hekman, M., Fischer, A., Rapp, U, Dunkel, M., Müller, T., Becker, D. and Hedrich, R. (2006) **The Ca²⁺-regulated *Arabidopsis* Vacuole Two-Pore-K⁺ channel TPK1 is activated by 14-3-3 proteins in a phosphospecific manner.** *The Plant Journal*, submitted.
6. **Latz, A.**, Becker, D., Hedrich, R. (2007) **The *Arabidopsis* Vacuole Two-Pore-K⁺-channel TPK1 under salt stress is activated in CDPK dependent manner;** in preparation

Posterpräsentationen:

- Braunschweig 2004: Diana Schmidt, **Andreas Latz**, Camilla Voelker, Bernd Müller-Röber, Rainer Hedrich, Katrin Czempinski und Dirk Becker: **Molekulare Analyse der Tandem-Poren-Kanäle in *Arabidopsis thaliana***
- Dabringhausen 2004: Dirk Becker, Dietmar Geiger, Marcel Dunkel, Andrea Roller, Adam Bertl, **Andreas Latz**, Petra Dietrich, Armando Carpaneto, Rainer Hedrich: **Molekulare und funktionelle Analyse der Tandem-Poren-Kanäle in *Arabidopsis thaliana***
- SFB 478 Würzburg 2005: Dirk Becker, Rob Roelfsema, **Andreas Latz**, Marcel Dunkel, Rainer Hedrich: **Targeting und Regulation der Tandem-Poren-Kanäle in *Arabidopsis thaliana***

Vorträge

- Evaluation Würzburg 2004: **Latz, A.**, Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R
Tandem-Poren K⁺-Kanäle. **Eine neue Klasse von
Vakuolen-lokalisierten Kanälen**
- SFB 478 Bad Brückenau 2006: **Latz, A.**, Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R.
Regulation of TPK1

Auslandsaufenthalte während der Doktorarbeit

Februar 2004: Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee bei Prof. Dr.
Karl Oparka

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pflanzliche Kaliumkanäle	1
1.2. Pflanzliche 14-3-3-Proteine	7
1.3. Pflanzliche Proteinkinasen	10
1.4. Pflanzliche Proteinphosphatasen	14
1.5. Pflanzliche Stresssignalverarbeitung	17
1.6. Aufgabenstellung	19
2. Material und Methoden	23
2.1. Verfahren mit DNA	23
2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.1.2. Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA	25
2.1.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	27
2.1.4. DNA-Elution aus Agarosegelen	28
2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.1.6. Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	29
2.1.7. DNA-Ligation	29
2.1.7.1. DNA-Ligation durch Directional-TOPO®-Cloning	29
2.1.7.2. DNA-Ligation durch die T4-DNA-Ligase	30
2.1.7.3. Gateway Klonierung	31
2.1.8. Transformation von Bakterienzellen	32
2.1.9. DNA-Minipräparation	33
2.1.10. DNA-Midipräparation	34
2.1.11. DNA-Sequenzierung	35
2.1.12. Quantitative RT-PCR	35
2.1.13. Mutagenesen	36
2.2. Klonierungs- und Expressionssysteme	37
2.2.1. <i>E. coli</i>	37
2.2.1.1. Transformation, Selektion und Aufzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.1.2. Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> durch IPTG	39
2.2.1.3. Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine aus <i>E. coli</i> - Zellen ...	39
2.2.2. Agro-Infiltration in <i>Nicotiana benthamiana</i>	40
2.2.2.1. Transformation, Selektion und Aufzucht von <i>A. tumefaciens</i>	41
2.2.2.2. Infiltration von Agrobakterien in <i>Nicotiana benthamiana</i>	42
2.2.2.3. Aufreinigung von pflanzlichen Proteinen	43
2.3. Proteinanalytik	44
2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
2.3.2. SDS-Page	45
2.3.3. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	47
2.3.4. Westernblot	47
2.3.5. Affinitätsaufreinigung von Proteinen	49
2.3.6. Pull-down	50
2.3.7. „surface-plasmon-resonance“	50
2.3.8. Proteinphosphorylierung	51
2.3.9. Proteindephosphorylierung	51
2.3.10. Calcium-binding-assay	52
2.4. Zellbiologische Methoden	52
2.4.1. „particle-inflow-gun“ PIG	52
2.4.2. Konvokales Laser-Scanning-Mikroskop	54

2.5. Keimungs-Assay.....	54
2.6. Stresstest an adulten <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen.....	55
3. Ergebnisse	57
3.1. Targeting und Lokalisation der TPK-Familie.....	57
3.1.1. Klonierung und Fusion der TPKs mit GFP sowie Mutagenesen bzw. Deletionen.....	58
3.1.2. Subzelluläre Lokalisation der Wildtyp TPKs.....	58
3.1.3. Einfluss des 14-3-3 Bindemotivs auf das Targeting	59
3.1.4. C- und N- Terminale Chimären und Einfluss dieser Proteindomänen auf das Targeting.....	61
3.1.5. Koexpression von TPK1 und TPK3.....	63
3.1.6. Zusammenfassung Targeting und Lokalisation der TPK-Familie	64
3.2. Transfektion von <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Agro-Infiltration mit TPK4-Konstrukten	64
3.2.1. Analyse der TPK4 Expression nach Infiltration in <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels quantitativer RT-PCR und Westernblot	66
3.2.2. Elektrophysiologische Eigenschaften von TPK4 in <i>Nicotiana benthamiana</i> Mesophyllprotoplasten	68
3.2.3. Zusammenfassung: Transfektion von <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Agro-Infiltration mit TPK4-Konstrukten	69
3.3. Funktion und Regulation von TPK1	70
3.3.1. Aktivierung von TPK1 durch Ca ²⁺	72
3.3.1.1. Calcium-Bindungs-Test.....	72
3.3.1.2. Aktivierung von TPK1 durch Calcium in Hefevakuolen.....	73
3.3.2. Interaktion von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen	74
3.3.2.1. Koloalisation von TPK1 mit 14-3-3 Proteinen.....	75
3.3.2.2. „Pull-down“ von 14-3-3-Proteinen mit TPK1	76
3.3.2.3. „Surface Plasmon Resonance“ (SPR) von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen.....	78
3.3.2.4. Aktivierung von TPK1 durch 14-3-3 Proteine in Hefevakuolen	79
3.3.3. Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1	80
3.3.3.1. Kinase-Assay mit einem pflanzlichen Proteinextrakt	80
3.3.3.2. Kinase-Assay mit aufgereinigten Kinasen der CDPK-Familie.....	81
3.3.3.3. Calciumabhängigkeit der Phosphorylierung von TPK1 durch CDPKs ..	82
3.3.3.4. Koloalisation von TPK1 mit CPK3 und CPK29.....	83
3.3.3.5. Expressionsmuster von CPK3, CPK29 und TPK1	84
3.3.4. Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1.....	85
3.3.4.1. Phosphatasefamilie.....	85
3.3.5. Einfluss von abiotischen Stressfaktoren auf TPK1	86
3.3.5.1. Einfluss von Salzstress auf den Phosphorylierungszustand von TPK1.....	87
3.3.5.2. Einfluss von Salzstress auf die Keimung	88
3.3.6. Zusammenfassung: Funktion und Regulation von TPK1	91
4. Diskussion.....	93
4.1. Targeting der TPKs	93
4.2. Funktion von TPK1 und TPK4	96
4.1.2. TPK4 in der Plasmamembran.....	97
4.2.2. Ionenkanäle der Vakuolenmembran.....	98
4.3. Regulation von TPK1.....	103
4.3.1. Calcium:.....	104

4.3.2. 14-3-3-Proteine:.....	105
4.3.3. Proteinkinasen:.....	106
4.3.4. Proteinphosphatasen:	107
4.4. Eingliederung von TPK1 in die Kaliumhomeostase und Stressphysiologie der Pflanze	109
4.5. Pflanzenbasiertes Expressionssystem	114
5. Zusammenfassung.....	117
6. Summary.....	119
7. Anhang.....	121
7.1. Literaturverzeichnis	121
7.2. Abkürzungsverzeichnis.....	131
7.3. Sequenzen und Vektoren	134
7.3.1. Vektoren.....	132
7.3.2. Sequenzen.....	171
7.3.3. Primersequenzen.....	176
7.3.4. Peptidsequenzen	178
7.4. Eichgeraden	179
7.5. Puffer und Medien	180

1. Einleitung

Die molekulare Analyse und funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Proteine sowie die Zuordnung ihrer Rolle im physiologischen System der Pflanze ist ein wichtiges Feld der modernen botanischen Wissenschaft. Das Erkennen der molekularen Zusammenhänge und übergeordneter Regulationsstrukturen ist die Voraussetzung für das Verständnis der Mechanismen, mit welchen Pflanzen auf verschiedenste Stresssituationen reagieren. Ziel dieser Forschung ist es, mit Hilfe gentechnischer Methoden oder des sog. „Smart Breeding“ (Ruge-Wehling et al., 2006) die Eigenschaften von Pflanzen so zu verändern, dass sie unter schwierigen äußeren Bedingungen wie z.B. Trockenheit, Salzstress oder Pathogenbefall besser überleben können. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Charakterisierung pflanzlicher Proteine auch Einblicke in die Funktion und Regulation von orthologen Proteinen in anderen Organismen gewährt. Im Fokus der aktuellen Forschung zur Stressphysiologie der Pflanze stehen Ionenkanäle und Transporter, welche den osmotischen Zustand und den Ionenhaushalt der Zelle regulieren. Daneben aber auch Proteinkinasen, -phosphatasen oder 14-3-3-Proteine, welche die Aktivität dieser Membranproteine steuern und damit eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion des Stresssignals haben. Aufgrund ihres kurzen Generationszyklus, einfacher Kultivier- und Transformierbarkeit sowie des relativ kleinen Genoms eignet sich die Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*, besonders als Modellorganismus für solche Analysen. Das Genom von *A. thaliana* ist vollständig sequenziert (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) und frei zugänglich (<http://www.arabidopsis.org>). Auf der Basis vergleichender Sequenzanalysen konnte unter anderem mit den Tandem-Poren-Kaliumkanälen eine neue Familie von Ionenkanälen in Pflanzen identifiziert werden. Aber auch andere Gene, die für regulatorische bzw. modifizierende Proteine kodieren, können anhand der Sequenzierung identifiziert und einer näheren Analyse zugänglich gemacht werden.

1.1. Pflanzliche Kaliumkanäle

Osmotische Prozesse sind die Triebkraft für pflanzliches Wachstum und Entwicklung. Kalium kann bis zu 10% des Trockengewichts einer Pflanze ausmachen und ist damit das abundanteste Ion innerhalb der Zelle (Clarkson und Hanson 1980;

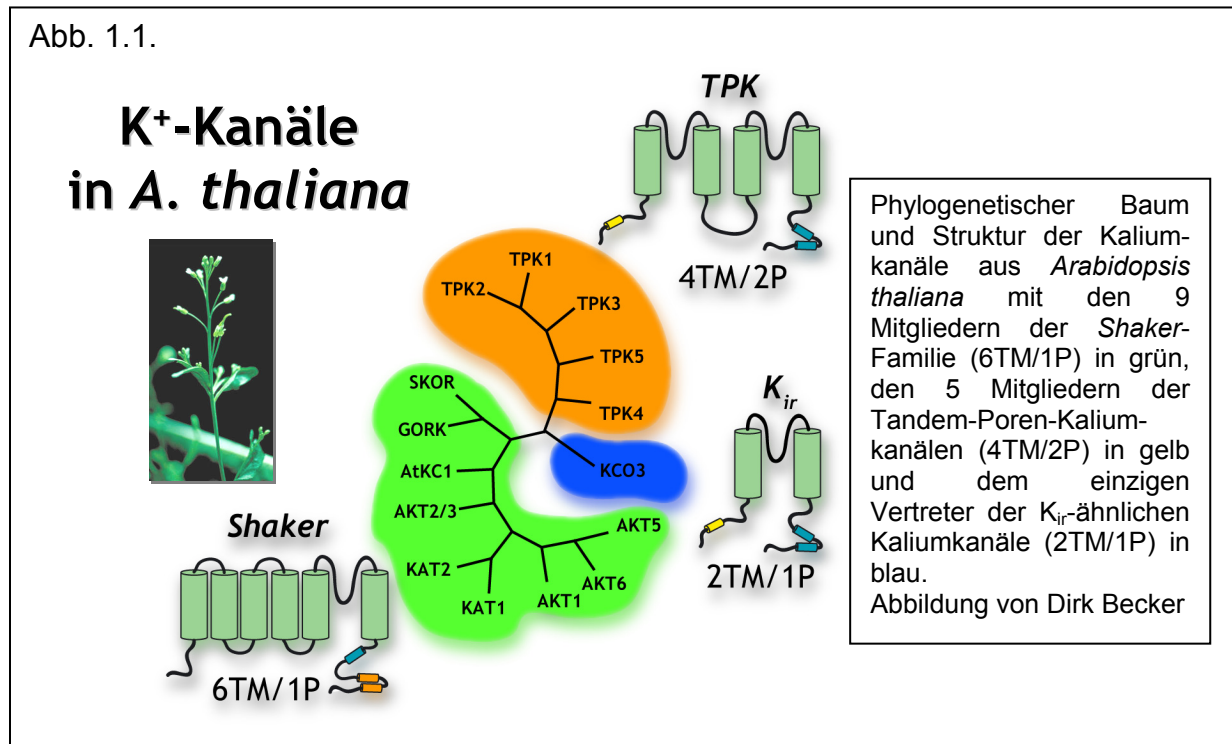
1. Einleitung

Maathuis und Sanders, 1996). In Pflanzen sind Kaliumsalze die Hauptosmotika ausreichende Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma sind Voraussetzung für viele Enzymfunktionen in Pflanzen und Tieren als auch in prokaryotischen Organismen. Die Kaliumhomöostase ist von entscheidender Bedeutung für die Osmoregulation und demnach für das Streckungswachstum oder für nastische Turgorbewegungen. Bei starker Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration sind oft schädigende Auswirkungen auf die Zelle beobachtbar. Um die elektrische Neutralität zu gewährleisten, können bei geringen Kaliumkonzentrationen andere Kationen das Kalium ersetzen. Allerdings wirken viele Kationen, wie z.B. Natrium, toxisch auf die Zellen (Rodríguez-Navarro, 2000).

Die meisten Zellen halten eine intrazelluläre Kaliumkonzentration aufrecht, die in der Regel weit über der Kaliumkonzentration in der Umgebung liegt. Dementsprechend müssen Zellen in der Lage sein, Kalium gegen einen chemischen Gradienten in die Zelle zu transportieren. Die Triebkraft für den Transport von Kalium liegt zumeist im Aufrechterhalten eines Protonengradienten und der elektrischen Potentialdifferenz über der Plasmamembran. In Pflanzen, wie auch in Tieren, ist die Aktivität von Kaliumkanälen eine wichtige Determinante der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran. Durch die Komplementierung des K^+ -Transports in Hefemutanten konnten 1992 von Sentenac et al. und Anderson et al. die ersten pflanzlichen Kaliumkanäle aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Kaliumkanäle sind nicht nur für die elektrische Erregbarkeit von Membranen essentiell, sondern auch für die Kontrolle des Zelldrucks und die osmotische Adaptation von Zellorganellen gegenüber dem Cytoplasma. Es konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Kaliumkanäle durch eine Vielzahl von anderen Proteinen, wie Kinasen, Phosphatasen, 14-3-3-Proteinen, Syntaxine, Farnesyltransferasen oder G-Proteinen, reguliert werden (Assmann 2002, Blatt 2000, deBoer 2002, Schröder et al.; 2001), aber auch durch andere Faktoren wie Membranspannung, pH-Wert, Calcium und zyklische Nukleotide (Kochian und Lucas, 1988; Blatt, 2000; Epstein, 1973; Zimmermann et al., 1999; Gaymard et al., 1996; Hoshi, 1995; Leng et al., 1999). Durch die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms wurden 15 putative Kaliumkanäle identifiziert (siehe Abb. 1.1.). Strukturvorhersagen, basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen, haben drei unterschiedliche Strukturklassen von Kaliumkanälen ergeben (Mäser et al., 2001). Von den 15 putativen Kaliumkanälen gehören neun zur *Shaker*-Familie, fünf (TPK1-5) zu den **Tandem-Poren-Kaliumkanälen** und ein Kanal

1. Einleitung

(KCO3) zur Klasse der K_{ir} -Einwärtsgleichrichter (Very, Sentenac, 2003; Becker et al., 2004;). Im Gegensatz zu den *Shaker*-Kanälen, die strukturell und funktionell, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, sehr gut untersucht sind, war die Bedeutung der TPK-Kanäle bisher noch weitgehend unklar.



Die bislang am intensivsten untersuchten Kaliumkanalproteine gehören zur Familie der pflanzlichen *Shaker*-Kanäle. Sie bilden eine Strukturklasse bestehend aus 4 α -Untereinheiten mit je sechs transmembranen Domänen (S1 bis S6) und einer hoch konservierten Porenregion (P) zwischen der Transmembrane fünf und sechs (Uozumi *et al.*, 1995, 1998). Diese Porenregion taucht in die Membran ein und formt eine hydrophile Pore für den selektiven Transport von Kalium (Doyle *et al.*, 1998). Die Kalium-Selektivität aller bisher bekannten Kanäle wird durch die Aminosäureabfolge TXXTGX(Y/F)GD in der aufsteigenden Seite der Porenschleife maßgeblich bestimmt (Heginbotham *et al.*, 1994, Becker *et al.*, 1996, Yang und Yan, 1997). Sie ist sowohl von der Sequenz als auch von der Struktur her den tierischen spannungsabhängigen Kaliumkanälen der *Shaker*-Familie ähnlich. Die transmembrane Domäne S4 weist eine charakteristische Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren auf und ist an der Perzeption der Membranspannung beteiligt (Smith-Maxwell *et al.*, 1998). Der cytoplasmatische C-Terminus enthält regulatorische Domänen wie eine Bindestelle für zyklische Nukleotide und eine KHA-

1. Einleitung

Domäne, welche eine Rolle bei der Tetramerisierung der Untereinheiten spielen könnte (Daram et al., 1997). In vielen *Shaker*-Kanälen befindet sich zusätzlich noch eine Ankyrinmotiv (Sentenac et al., 1992) für die Interaktion mit regulatorischen Proteinen. Die pflanzlichen *Shaker*-Kanäle sind spannungsabhängige, kaliumselektive Kanäle, wobei man sie in auswärtsgerichtete, einwärtsgerichtete und schwach einwärtsgerichtete Kanäle unterteilen kann. Wie im tierischen System dürften alle pflanzlichen *Shaker*-Kanäle in der Plasmamembran lokalisiert sein. Dort erfüllen sie vielfältige Aufgaben wie die Aufnahme von Kalium aus dem Boden in die Wurzel (AKT1), die Beladung des Xylems mit Kalium (SKOR), die Regulation der Stomataöffnung (GORK), die Kaliumaufnahme im Pollen (SPIK1) oder die Kontrolle des Membranpotentials bei der Phloembeladung mit Zuckern. (Gaymard et al., 1998; Pilot et al., 2001; Mouline et al., 2002; Ache et al., 2000).

Die einfachste Strukturklasse innerhalb der Kaliumkanäle repräsentiert ein einziges Kanalgen in *Arabidopsis*, KCO3. Dieser Kanaltyp besitzt zwei transmembrane Domänen, die eine Porenregion flankieren (2TM/1P; siehe Abb. 1.2.), und zeigt somit Strukturähnlichkeiten mit den K_{ir} Kanälen (Very, Sentenac, 2003). Alle bisher untersuchten Organismen, vom Bakterium bis zum Menschen, besitzen diesen Minimalkanal. Selbst im Genom von Pflanzenviren konnte man diesen Kaliumkanaltyp finden (Plugge et al., 2000).

Durch eine Verdopplung des KCO3-Motivs ist eine weitere Strukturklasse gekennzeichnet (4TM/2P). Aufgrund ihrer zwei Porenregionen werden sie Tandem-Poren-Kanäle genannt (TPK, Becker et al., 2004). Im Genom von *Arabidopsis* konnten fünf Vertreter ausgemacht werden (Schönknecht et al., 2002; Czempinski et al., 1997). Aufgrund der Sequenzhomologien wurden anfänglich die TPK-Kanäle zusammen mit dem K_{ir} -ähnlichen KCO3 in der Familie der AtKCO-ähnlichen pflanzlichen Kaliumkanäle zusammengefasst. Die pflanzlichen TPKs teilen sich strukturelle Merkmale mit ihren tierischen Homologen der KCNK Familie. Diese tierischen Tandem-Poren-Kanäle der animalen TREK und TRAAK Familie sind in der Plasmamembran lokalisiert. Sie zeichnen sich durch eine hydrophobe Kernregion bestehend aus 4 transmembranen Domänen sowie 2 Kalium-selektiven Porenregionen aus, ohne allerdings einen transmembranen Spannungssensor wie die *Shaker*-Kanäle zu besitzen. Im tierischen System werden diese Kanäle als

1. Einleitung

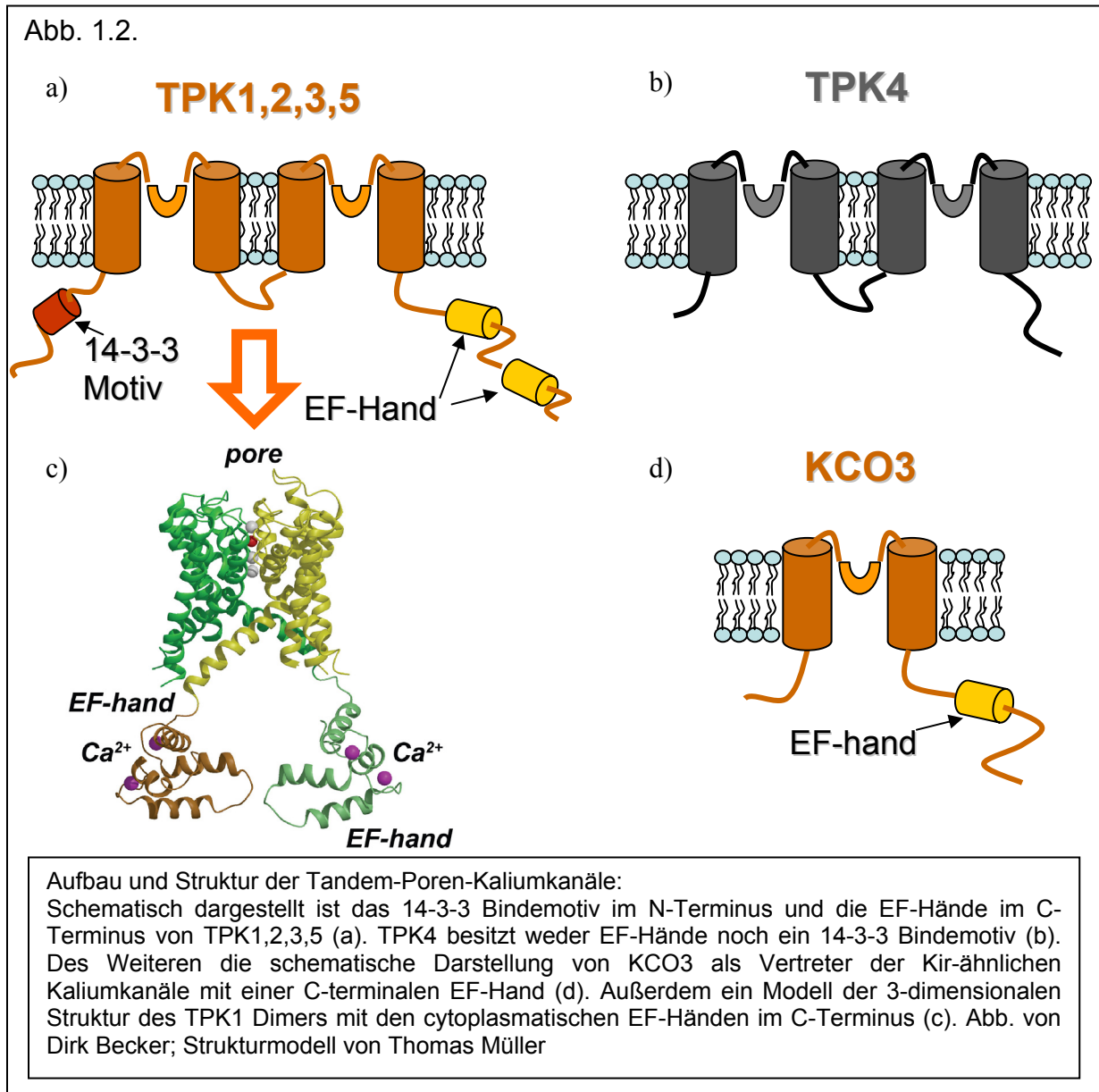
„Leckstromkanäle“ bezeichnet, da ihre Offenwahrscheinlichkeit unabhängig von der Spannung ist. Für einige Vertreter wurde beschrieben, dass sie aufgrund der mechanischen Spannung der Membran in ihrer Aktivität reguliert werden können (Patel und Honoré, 2001).

Eine strukturelle Besonderheit der pflanzlichen TPK-Kanäle gegenüber ihren tierischen Pendants ist der Besitz von EF-Händen (im C-Terminus von TPK1,2,3,5) und von 14-3-3-Bindestellen (im N-Terminus von TPK1,2,3,5). Dies deutet auf eine direkte calcium- bzw. 14-3-3-abhängige Regulation dieser Kanäle in der Pflanze hin (siehe Abb. 1.2.). Mit der funktionellen Charakterisierung von TPK4 und TPK1 konnte gezeigt werden, dass die TPK-Kanäle instantan aktivierende K⁺-Kanäle der Plasma- bzw. Vakuolenmembran sind (Czempinski et al., 2002; Schönknecht et al., 2002; Becker *et al.*, 2004). Während TPK4 als protonensensitiver „offener Gleichrichter“ fungiert, wird TPK1 durch cytosolische Ca²⁺-Änderungen aktiviert (Biehler et al., 2005). In Hefen findet man ebenfalls einen Tandem-Poren-Kaliumkanal. Allerdings besitzt der auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal TOK1 8 transmembrane Domänen und erinnert dadurch eher an eine Kombination aus *Shaker*- und Kir-ähnlichen Kanälen (Bertl et al., 1998a).

TPK4 wird hauptsächlich im Pollen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Nach Expression in Oocyten von *Xenopus laevis* bzw. in Hefezellen zeigt sich, dass es sich um einen spannungsunabhängigen, kaliumselektiven Kanal der Plasmamembran handelt. Sowohl hyperpolarisierende als auch depolarisierende Spannungen erzeugen sofortige Kaliumströme, welche durch extrazelluläres Calcium und cytoplasmatische Protonen geblockt werden konnten. Dies deutet auf eine Funktion bei der Regulierung der Membranspannung und der Kalium-Homöostase im wachsenden Pollenschlauch hin (Becker et. al 2004).

TPK1 hingegen wird ubiquitär in der Pflanze exprimiert und ist im Tonoplasten lokalisiert (Czempinski et. al 2001). Er wurde zuerst als calciumabhängiger, auswärtsgleichrichtender Kaliumkanal nach Expression in *Spodoptera frugiperda* (*Sf-9*) Zellen beschrieben (Czembinski et. al 1997). Dies wurde allerdings in nachfolgenden Arbeiten widerlegt (Bihler et al., 2005). Über die anderen Mitglieder der TPK-Familie ist bisher so gut wie nichts bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass außer TPK4 alle anderen Mitglieder in der Vakuolenmembran lokalisieren (Völker et al., 2006).

1. Einleitung



Die Vakuole ist das zentrale Kompartiment der pflanzlichen Zelle und dient der Speicherung von Ionen, Proteinen oder Metaboliten sowie zur Entsorgung von toxischen Substanzen. Treibende Kraft für den vakuolären Stofftransport ist ein Protonengradient (Vakuolenlumen pH-Wert ca.5; Cytoplasma pH-Wert ca.7), der unter anderem durch V-Typ H⁺-ATPasen aufrechterhalten wird. Auf der Basis elektrophysiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass 3 Typen von Kalium-permeablen Kanälen in der Vakuolenmembran unterschieden werden: Der so genannte SV-Kanal (für **S**low-Activating-**V**acuolar-Channel, der FV-Kanal (**F**ast-Activating-**V**acuolar-Channel) und der VK-Kanal (**V**acuolar-**K**⁺-Selective-Channel) (Allen und Sanders 1996). Der dominierende Ionenkanal im Tonoplasten ist der langsam aktivierende, spannungsabhängige SV-Kanal (Hedrich und Neher, Allen

1. Einleitung

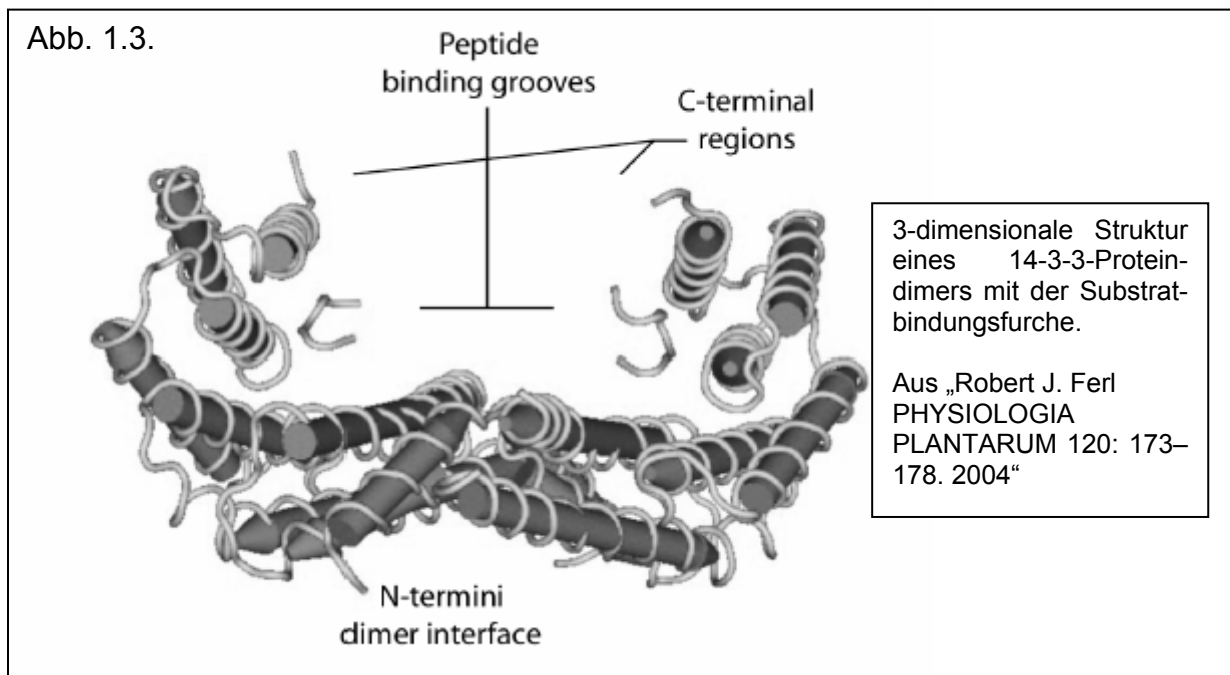
und Sanders, Ward und Schröder). Dieser konnte kürzlich dem TPC1-Genprodukt zugeordnet werden (Peiter et al.). Der SV-Kanal, TPC1, wird durch cytoplasmatisches Calcium ($>1\mu\text{M}$) aktiviert und ist ein nicht-selektiver Kationenkanal. Die FV- und VK-Kanäle sind im Gegensatz zu den SV-Kanälen spannungsunabhängig (Ward et al., 1994), wobei die VK-Kanäle wie die SV-Kanäle nur bei hohen cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen aktiv sind, während die FV-Kanäle durch Calcium geblockt werden (Hedrich und Neher, 1987).

1.2. Pflanzliche 14-3-3-Proteine

Die Aktivität von Proteinen innerhalb einer Zelle unterliegt einer strengen Kontrolle. So können Proteine z.B. durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert werden. Auch andere Faktoren wie Ionen, Metabolite und die Interaktion mit anderen Proteinen können die Aktivität eines Proteins beeinflussen. Daneben besitzen die Zellen noch viele andere Mechanismen zur Regulation und Modulation der Proteinaktivität. Auch pflanzliche Ionenkanäle werden durch die oben genannten Faktoren reguliert. Sie können aktiviert, deaktiviert oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften verändert werden. So wird z.B. der SV-Kanal im Tonoplasten durch 14-3-3-Proteine inhibiert und durch Calcium aktiviert (Hedrich und Neher, 1987; van den Wijngaard, 2001). 14-3-3-Proteine sind eine Familie von regulatorisch wirkenden Proteinen, die in allen eukaryotischen Lebewesen vorkommen. In *Arabidopsis thaliana* besteht diese Familie aus vermutlich 13 Mitgliedern (GRF1-GRF13), wobei man im Genom 15 putative 14-3-3-Gene findet, von denen mindestens 12 exprimiert werden (Rosenquist et al., 2001; deLille et al., 2001; Sehnke et al., 2002). Im tierischen System sind 7 unterschiedliche 14-3-3-Proteine bekannt, in Hefen und *Drosophila* findet man 2 Vertreter dieser Familie (Chang und Rubin, 1997; Kockle et al., 1997). 14-3-3-Proteine sind ca. 30 kDa große, saure Proteine. Sie entfalten ihre Wirkung als Dimer (sowohl Homo- als auch Heterodimere), indem sie isoformspezifisch an bestimmte Konsensussequenzen im Zielprotein binden. Ihren Namen haben die 14-3-3-Proteine aufgrund ihres Elutions- und Migrationsmusters nach zweidimensionaler DEAE-Cellulose-Chromatographie und Stärke-Gel-Elektrophorese von Rinderhirn-Homogenaten (Moore et al., 1967). Zwischen den unterschiedlichen 14-3-3-Isoformen besteht ein hoher Grad an Sequenzidentität und Konservierungen, insbesondere in den Dimerisierungsregionen und den Liganden-Bindungsstellen. Die Sequenz der 14-3-3-Proteine teilt sich in 3

1. Einleitung

Bereiche auf, divergente N- und C-Termini sowie eine konservierte Kernregion. Letztere enthält eine amphipatische Furche, welche die funktionelle Domäne für die Interaktion mit den Zielproteinen ausbildet. Ein 14-3-3-Monomer beinhaltet 9 Helices, die in antiparalleler Weise angeordnet sind und eine L-förmige Struktur ausbilden (Abb. 1.3.). Das Innere der L-Struktur ist zusammengesetzt aus 4 Helices: H3 und H5, welche zahlreiche geladene und polare Aminosäuren beinhalten sowie H7 und H9, welche eher hydrophobe Aminosäuren besitzen. Diese 4 Helices bilden die amphipatische Furche, die mit den Zielproteinen interagiert. Von tierischen 14-3-3-Proteinen ist bekannt, dass der N-Terminus acetyliert werden kann, was auf eine N-terminale Prozessierung des Proteins hindeutet (Martin et. al 1993, Aitken et. al 1999).



14-3-3-Proteine binden hauptsächlich an Proteine, welche ein Phosphothreonin bzw. Phosphoserin im Bindungsmotiv enthalten. Studien am 14-3-3-Bindungsmotiv der tierischen Serin/Threonin-Kinase Raf-1 haben als konservierte Konsensus Sequenz die Aminosäureabfolge RSxp(S/T)X determiniert. (Muslin et al 1996). Yaffe et. al fügten 2001 dieser „Mode 1“ Konsensus Sequenz noch die „Mode 2“ Sequenz RX(Y/F)Xp(S/T)XP hinzu. 2005 wurde von Ganguly et. al schließlich die C-terminale Sequenz p(S/T)X_{1,2}CO₂H als „Mode 3“ Motiv beschrieben. Die Bindungskinetiken dieser Motive an die 14-3-3-Proteine sind allerdings suboptimal, was es den 14-3-3-Proteinen ermöglicht, ihre regulatorische Funktion einzunehmen. So weisen unter

1. Einleitung

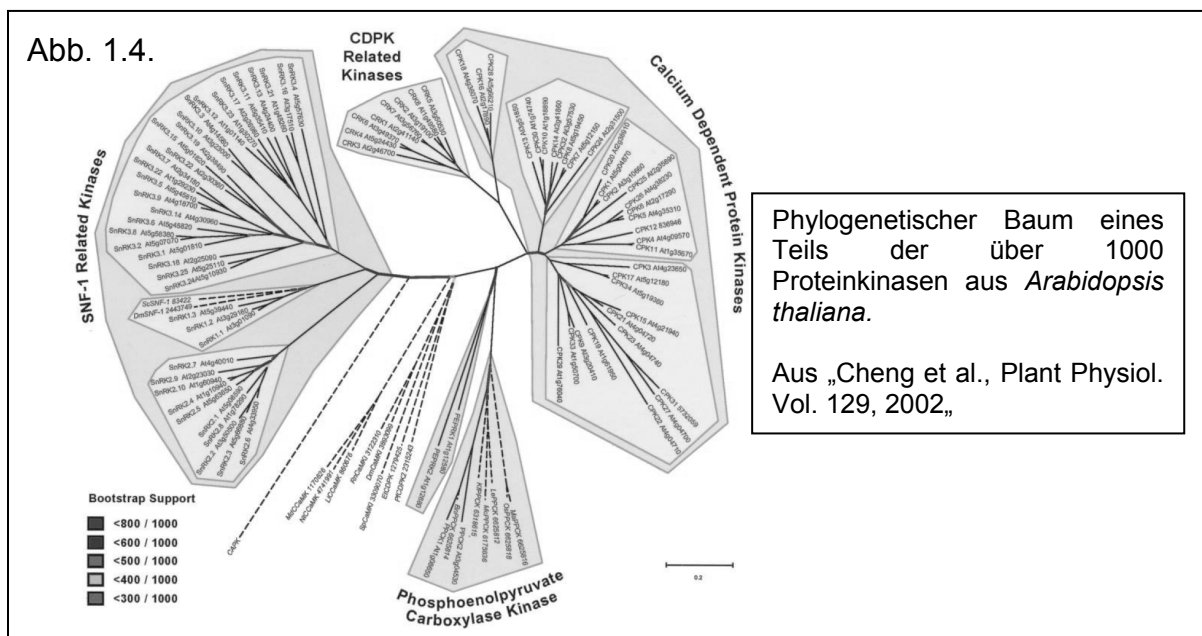
anderem Phosphoserine in diesen Bindungsmotiven eine höhere Affinität zu 14-3-3-Proteinen aus als Phosphothreonine. Der Effekt von 14-3-3-Proteinen auf die intrazelluläre Signaltransduktion kann auf drei unterschiedlichen Wegen vonstatten gehen: (i) durch die direkte Regulation der Aktivität des gebundenen Zielproteins, (ii) durch die Regulation der Interaktion zwischen gebundenen Protein und anderen Molekülen oder (iii) durch die Kontrolle der subzellulären Lokalisation des gebundenen Zielproteins. Das 14-3-3-Dimer ist in der Lage die Konformation des gebundenen Liganden zu verändern, während es selbst nur minimalen Strukturänderungen unterliegt. Nach Phosphorylierung des 14-3-3-Proteins konnte im tierischen System eine Reduktion der Interaktion mit dem Zielprotein beobachtet werden. Die erste bekannte Funktion dieser Proteine war die Aktivierung der Tyrosin/Tryptophan Hydroxylasen. Im Laufe der Zeit wurden allerdings mannigfaltige zusätzliche Funktionen der 14-3-3-Proteine bekannt. Dazu gehören: (i) die Regulation metabolischer Prozesse und der Elektrolyt Homöostase (ii) die Modulation der Funktion von Ionenkanälen, Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren oder auch (iii) die Zellzyklusregulation (zusammengefasst bei Aitken, 2006). In Pflanzen ist die Rolle von 14-3-3-Proteinen bei der Regulation der Nitratreduktase gut beschrieben (Moorhead et. al 1996). Es ist bekannt, dass pflanzliche 14-3-3-Proteine auch Membranproteine regulieren (de Boer et. al 2002). So ist z.B. die 3-D-Struktur des trimeren Komplexes von H⁺-ATPase, Fusicoccin und einem 14-3-3-Protein bekannt (Oecking et. al 2003). Die isoformspezifische Interaktion mit 14-3-3-Proteinen führt außerdem zur blaulichtabhängigen Aktivierung der Protonenpumpe (Frechilla et. al 1999; Zeiger 2000). Eine 14-3-3-Interaktion findet allerdings nicht nur an Pumpen statt sondern auch an Ionenkanälen. In *Drosophila* regulieren 14-3-3-Proteine die Aktivität des „slowpoke“ K⁺-Kanals (Zhou et. al 1999). Nach Interaktion mit 14-3-3-Proteinen erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit dieses dSlo-Kanals. Auch in Pflanzen spielen 14-3-3-Proteine eine Rolle bei der Regulation von Ionenkanälen. So führt eine Überexpression von 14-3-3-Proteinen in Tabak zu einer Erhöhung von Kanalvermittelten Kalium-Auswärtsströmen (Saalbach et al., 1997). In Gerste konnte die isoformspezifische Interaktion des zu *Arabidopsis* homologen TPK-Kanals HvKCO1 beschrieben werden (Sinnige et al., 2005). In dieser Arbeit wird HvKCO1 als Bestandteil des SV-Kanals des Tonoplasten beschrieben, der durch die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen inhibiert wird. Obwohl 14-3-3-Proteine isoformspezifisch ihre

1. Einleitung

Zielproteine finden, scheint eine hohe Redundanz zwischen den verschiedenen 14-3-3-Proteinen zu bestehen. So konnte für viele 14-3-3-Verlustmutanten bisher kein Phänotyp festgestellt werden (Krysan et al.; 1996). Die subzelluläre Lokalisation der unterschiedlichen 14-3-3-Proteine reicht vom Zellkern über das Cytoplasma bis hin zu Cytoskelettassoziationen und ist abhängig vom Zelltyp (Paul et al., 2005). Das „Targeting“ unterliegt dabei dynamischen Mechanismen basierend der phosphospezifischen Interaktion mit den Zielproteinen.

1.3. Pflanzliche Proteinkinasen

Phosphorylierungen sind eine häufig auftretende Art der posttranslationalen Modifikation und Regulation von Proteinen und werden durch Protein-Kinasen katalysiert. Auch die Interaktion von Zielproteinen mit 14-3-3-Proteinen setzt in den meisten Fällen die Phosphorylierung eines Serin- bzw. Threonin-Restes im Bindemotiv des Zielproteins voraus. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert 1085 typische Protein-Kinasen. Dies sind ca. 4% der vorhergesagten 25500 Gene. Diese Kinasen lassen sich in unterschiedliche Familien aufteilen bzw. aufgrund des Substrats in Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen unterteilen (Abb. 1.4.)



Die Familie der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Kinase-verwandten Kinasen (PEPRKs) beinhaltet calciumunabhängige Kinasen mit einem Molekulargewicht von 30 bis 37kD, welche die PEP-Carboxylase phosphorylieren.

1. Einleitung

Des Weiteren enthält *A. thaliana* 38 Mitglieder der „sugar-non-fermenting-1“, SNF-1, verwandten Kinasen (SnRK), welche homolog zu SNF1 aus Hefe und zu den AMP-aktivierten Kinasen im tierischen System sind. Diese Kinasen binden an SOS3 (salt overly sensitive) ähnliche Proteine. Das Molekulargewicht liegt bei 56-59kD. Die SnRKs wiederum werden in die 3 Subgruppen SnRK1 bis SnRK3 aufgeteilt. Die Phosphorylierungsmotive der SnRKs (AMARAASAAALARRR / HMRSAMSGLHVKRR / RLRRSRSAPRGDCMY / RRLRRSRSAPRGDCM) passen allerdings nicht zum 14-3-3-Bindemotiv von TPK1. Da die SnRK's, anders als die CDPKs und den CRKs (siehe unten), keine N-terminale Myristylierungsstelle aufweisen kann eine cytoplasmatische Lokalisation für diese Kinasen vorhergesagt werden. Die Aktivität dieser Kinasen wird unter anderem durch 14-3-3-Proteine reguliert.

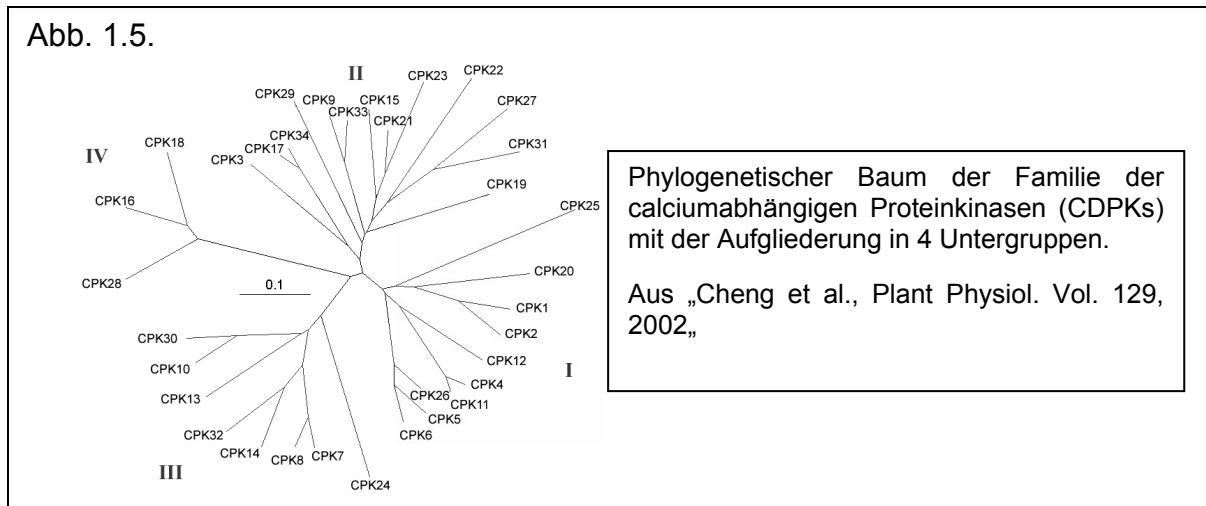
Eine weitere Klasse der pflanzlichen Proteinkinasen ist die Familie der calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMKs). Diese Familie zeichnet sich durch den Besitz von calciumbindenden EF-Händen am C-Terminus aus. Allerdings wurden von diesen Kinasen bisher nur Vertreter in Tabak, Lotus und Medicago gefunden, während in *Arabidopsis* noch kein Vertreter dieser Kinasefamilie identifiziert werden konnte (Patil et. al 1995; Liu et. al; 1998).

Die Familie der CDPK verwandten Proteinkinasen (CRKs) weisen degenerierte EF-Hände auf, die kein Calcium mehr binden und somit auch nicht durch Calcium reguliert werden (Famer und Choi 1999; Furumoto et. al, 1996). In *Arabidopsis* konnten 8 CRK-Gene identifiziert werden, die für Proteine mit einem Molekulargewicht von 64-68 kD kodieren.

Eine wichtige Familie pflanzlicher Proteinkinasen ist die Familie der calciumabhängigen Proteinkinasen (calcium-dependent-protein-kinases, CDPKs). Diese kommen nur in Pflanzen vor. In *Arabidopsis* finden sich 34 CDPK-Gene (siehe Abb. 1.5.). Viele dieser Kinasen werden ubiquitär exprimiert (Hong et. al 1996), wobei bei einigen Vertretern auch eine induzierte Expression durch Hormone und Stress beobachtet werden konnte (Urao et al., 1994; Sheen, 1996).

Aufgrund von Sequenzhomologien lassen sich diese in 4 Untergruppen aufteilen, wobei bisher nicht bekannt ist, ob auch funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen existieren.

1. Einleitung



Durch 4 C-terminale EF-Hände werden diese Kinasen direkt über Calcium reguliert. Die Kinasen sind zwischen 54 und 72 kD groß. Die meisten besitzen im N-Terminus putative Myrestylierungs- und Palmetylierungsstellen. Viele dieser Kinasen werden ubiquitär exprimiert (Hong et al. 1996), wobei bei einigen Vertretern auch eine induzierte Expression durch Hormone und Stress beobachtet werden konnte (Urao et al., 1994; Sheen, 1996) wie durch Verwundung (Chico et al., 2002), Salz- und Trockenstress (Botella et al., 1996; Patharkar and Cushman, 2000; Saijo et al., 2000), Kälte (Monroy and Dhindsa, 1995; Saijo et al., 2000; Martin and Busconi, 2001; Llop-Tous et al., 2002), Licht (Frattini et al., 1999), und Pathogene (Murillo et al., 2001; Romeis et al., 2001). Neben der Aktivierung der Kinasen durch Calcium wurde auch für CPK1 eine Aktivierung durch Phospholipide (Phosphatidylinositol und lyso-phosphatidylcholin) beschrieben (Schaller et al., 1992; Harper et al., 1993; Binder et al., 1994; Farmer and Choi, 1999).

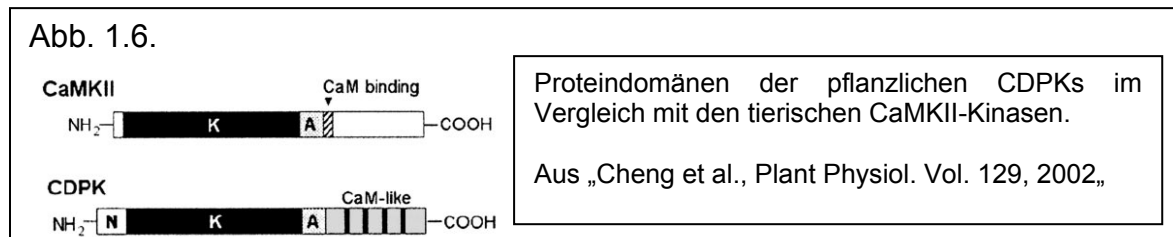
Für CPK1 ist auch eine isoformspezifische Aktivierung durch 14-3-3 beschrieben worden (Camoni et al.; 1998; Palmgren et al.; 1998). Daneben besitzen noch CPK24 und CPK28 putative 14-3-3-Bindemotive.

Die beschriebenen Phosphorylierungsmotive der CDPKs (B=basisch; H= hydrophil; S=Serin; X=beliebig: BBXBHXXXXSXB / HHBXXS) (McMichael et al., 1995; Bachmann et al., 1996; Huang and Huber, 2001) passen sehr gut zu dem 14-3-3-Bindemotiv der TPKs (RSRpSAP).

Die CDPKs agieren als Calciumsensoren der Zelle. Erhöht sich aufgrund eines Stresssignals der freie cytoplasmatische Calciumgehalt, so wird diese Information durch die Kinasen in eine Phosphorylierung der Zielproteine übersetzt, um weitere

1. Einleitung

downstream-Prozesse zu regulieren (Sanders et al., 1999; Rudd und Franklin-Tong, 2001). Die CDPK Proteine lassen sich in 4 Domänen unterteilen: eine variable N-terminale Domäne, eine Proteinkinasedomäne, eine autoinhibitorische Domäne, welche als Pseudosubstrat fungiert, und einen calmodulinähnlichen C-Terminus (siehe Abb. 1.6.). Anders als die tierischen analogen CaMKII-Kinasen, üben die pflanzlichen CDPKs ihre Funktion als Monomere aus (Roberts und Harmon, 1992).



16 der 34 CDPKs aus *Arabidopsis* enthalten eine putative Autophosphorylierungsstelle (Harmon et al., 1994), welche die Aktivität des Enzyms regulieren könnte (Saha and Singh, 1995; Chaudhuri et al., 1999; Harmon et al., 2000). Die EF-Hände am calmodulinähnlichen C-Terminus bestehen jeweils aus 13 Aminosäuren, welche durch je zwei α -Helices flankiert werden. Jede EF-Hand ist in der Lage ein Ca^{2+} -Molekül zu binden (Zang und Yuan, 1998). Unter normalen physiologischen Bedingungen, bei geringen Mengen an freiem cytosolischem Calcium, ist die autoinhibitorische Domäne an die Kinasedomäne gebunden und verhindert so die Phosphorylierung des Substrats. Nach Erhöhung des Calciumspiegels und der daran anschließenden Bindung des Calciums an die EF-Hände der CDPKs findet eine Konformationsänderung des Proteins statt, welche das Pseudosubstrat aus der katalytischen Domäne entfernt und das Protein somit aktiviert (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994).

Über einen Lipidanker im variablen N-Terminus einiger CDPKs sind diese in der Lage mit Membranen zu assoziieren (Ellard-Ivey et al., 1999; Martin und Busconi, 2000; Lu et al., 2001; Lu und Hrabak 2002). Sie sind somit nicht nur im Cytoplasma lokalisiert, sondern auch in Membransystemen wie der Plasmamembran, dem ER, dem Tonoplasten und dem Zellkern. Des Weiteren sind sie mit dem Cytoskelett assoziiert (Putnam-Evans et al., 1990; Schaller et al., 1992; Martin und Busconi, 2000; Patharkar und Cushman 2000). Die modifizierbaren N-terminalen Gly-Reste und Myrestylierungsmotive werden bei 25 Mitgliedern der CDPK Familie gefunden.

1. Einleitung

1.4. Pflanzliche Proteinphosphatasen

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen wird oft als molekularer „Ein/Aus“-Schalter bei der Regulation zellulärer Prozesse verstanden und spielt bei fast allen Signalwegen innerhalb eines Organismus eine wichtige Rolle. Daher spielen Proteinphosphatasen eine ebenso wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinaktivitäten und Signalkaskaden wie die korrespondierenden Kinasen. Im Allgemeinen kann man, wie bei den Kinasen, zwischen Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphatasen unterscheiden, wobei in *Arabidopsis* zwischen einer Familie von Tyrosin-Phosphatase (PTP) und zwei Familien von Serin/Threonin-Phosphatasen (PPP und PPM) unterschieden werden kann.

Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) sind genauso wie die entsprechenden Tyrosin-Kinasen im tierischen System gut erforscht, wohingegen in der Pflanze die Rolle der PPPs und PPM's weitgehend unklar ist. Im tierischen System spielen sie eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation. In Pflanzen wurden ca. 20 putative Gene gefunden, welche für eine typische PTP-Domäne kodieren. Es wird spekuliert, dass die pflanzlichen PTPs eine Rolle bei der Regulation des MAPK (**mitogen activated protein kinase**) Signalwegs spielen. So kann z.B. AtMPK4 durch AtPTP1 dephosphoryliert und damit inaktiviert werden. Die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen können aufgrund von Substratspezifität und pharmakologischen Eigenschaften in zwei Untergruppen unterteilt werden (siehe Abb. 1.7.). Die Typ1-Proteinphosphatasen (PP1), welche durch zwei Peptide (Inhibitor 1 und 2) inhibiert werden können und die Typ2-Proteinphosphatasen (PP2), welche insensitive gegenüber der inhibierenden Wirkung dieser Peptide sind. Aufgrund der Abhängigkeit der Aktivität von zweiwertigen Kationen und aufgrund der Proteinstruktur lässt sich die PP2 Gruppe nochmals in drei Untergruppen unterteilen (PP2A, PP2B, PP2C; siehe Abb. 1.7.). PP2B und PP2C werden durch Calcium- und Magnesiumionen reguliert, während die PP2A- wie auch PP1-Phosphatasen unabhängig von zweiwertigen Kationen sind. Diese Phosphatasegruppen können aufgrund ihrer Pharmakologie hinsichtlich der Phosphataseinhibitoren Okadeinsäure, Calyculin A oder Cantharidin unterschieden werden. Phosphatasen vom Typ PP1, PP2A und PP2B benötigen Mangan und werden in der PPP-Familie zusammengefasst. Dem gegenüber gehören Phosphatasen vom Typ PP2C zusammen mit der Pyruvat Dehydroxygenase-Phosphatase und anderen

1. Einleitung

magnesiumabhängigen Phosphatasen zur PPM-Familie. Weiter entfernt verwandte Phosphatasen werden den Gruppen PP4, PP5 und PP6 zugeordnet (insgesamt ca. 12 Gene in *Arabidopsis*).

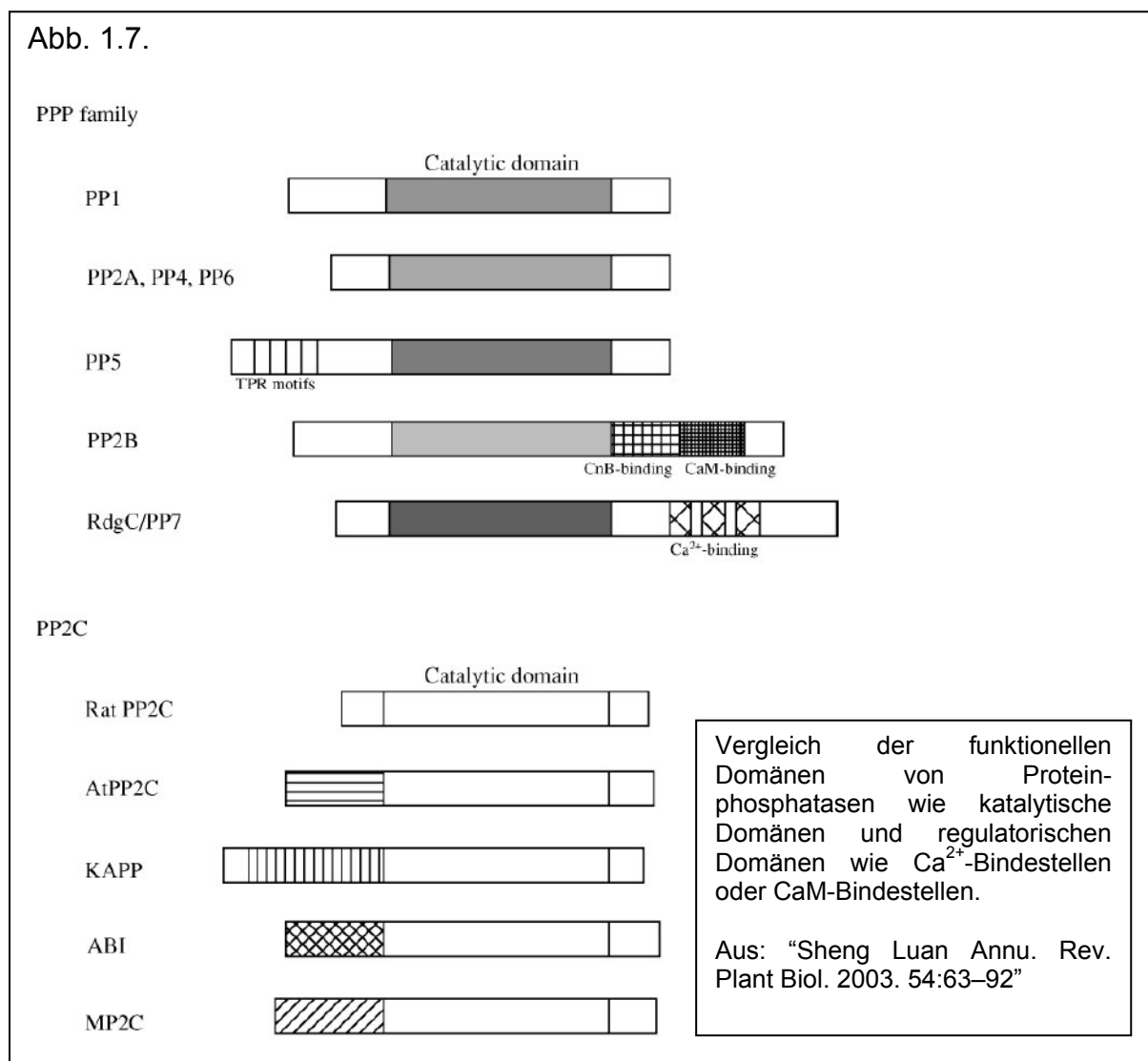
Die Phosphatasen der PP1-Familie fungieren als Heterodimere (siehe Abb. 1.8.), bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Es konnten 7 Gene für katalytische Untereinheiten der PP1 Familie in Pflanzen gefunden werden. PP1 spielt im tierischen System eine wichtige Rolle bei der Regulation des Glykogen-Metabolismus, aber auch bei der Kontrolle des Zellzyklus.

PP2As sind Heterotrimere aus einer katalytischen- (36kD), einer regulatorischen- (54-130kD) und einer Assemblierungsdomäne (siehe Abb. 1.8.). Hier findet man in *Arabidopsis* 6 Gene für die katalytische Untereinheit und mehr als 20 für die regulatorische Untereinheit. Die katalytischen Untereinheiten der PP2As werden in allen Zellen exprimiert, wobei die Expressionsstärke durch den Entwicklungszustand der Pflanze beeinflusst wird. Die regulatorische Untereinheit wird jedoch als Reaktion auf Stressfaktoren exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der subzellulären Lokalisation und für die Substratspezifität. Reguliert wird die Aktivität der PP2As im tierischen System durch Ceramid, einem sekundärem Boten-Lipid, der auch in Pflanzen vorkommt. In der Pflanze können PP1 und PP2As die Nitratreduktase und die Saccharose-Phosphat-Synthase aktivieren. Die regulatorische PP2A-Untereinheit RCN1 spielt eine Rolle bei der Auxin Signaltransduktion und dem polaren Auxintransport, während die regulatorische Untereinheit TON2 Einfluss auf die Cytoskelettorganisation hat.

Ebenso wie die PP2A-Proteine sind die PP2Bs Heterotrimere, wobei eine Untereinheit im aktiven Komplex Calmodulin ist (siehe Abb. 1.8.). Die PP2Cs sind monomere, calcium-/calmodulinabhängige Proteinphosphatasen. Etwa 70 PP2C kodierende Gene wurden bisher in *Arabidopsis* gefunden. Damit finden sich in Pflanzen weit mehr unterschiedliche PP2Cs als im tierischen System. *ABI1* und *ABI2* (**ab**scisic acid insensitive) sind Vertreter der PP2C-Familie in *Arabidopsis*, deren Expression durch ABA reguliert wird. Als negative Regulatoren der Signaltransduktion des pflanzlichen Hormons ABA (Abscisinsäure) sind diese beiden Enzyme an der Steuerung der Schließzellenbewegung beteiligt. Dabei stellen vermutlich Ionenkanäle die Zielproteine dieser Phosphatasen dar. Das *Arabidopsis* Protein KAPP ist ebenfalls eine Phosphatase aus der PP2C Familie und

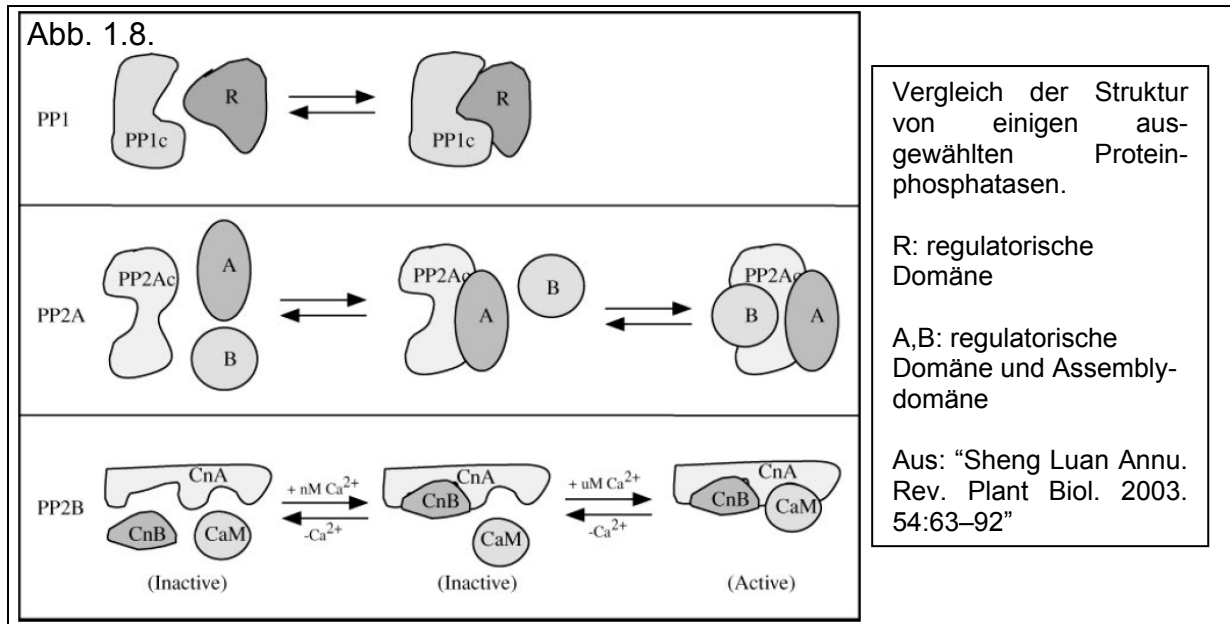
1. Einleitung

dephosphoryliert unter anderem die membranständigen rezeptorähnlichen Kinasen RLK5 und CLV1. PP2Cs werden neben Calcium auch durch ungesättigte Fettsäuren aktiviert, welche durch die Degradation von Membranlipiden durch Lipasen entstehen. PP2Cs spielen oft eine Rolle bei der Signaltransduktion von Stresssignalen.



Im tierischen System wurde die Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs bei Raf und KSR1 einer PP2A-Aktivität zugeschrieben. In den Wurzeln von Mais wurde die Inhibierung der Interaktion zwischen H⁺-ATPase und 14-3-3-Proteinen der Proteinephosphatase 2A zugeschrieben (Cameni et al 2000). Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Phosphatase zu identifizieren, die für die Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1 verantwortlich ist.

1. Einleitung



1.5. Pflanzliche Stresssignalverarbeitung

Pflanzen nehmen ständig Signale aus ihrer Umwelt wahr und passen sich an Änderungen durch eine Reihe von biochemischen und molekularen Mechanismen an. Der Perzeption externer Information durch Rezeptoren folgt die Informationsverarbeitung und -weiterleitung innerhalb der Pflanze. Dabei bedient sich die Pflanze überlappender Signaltransduktionswege, wobei 14-3-3-Proteine eine wichtige Rolle als Regulatoren der Stressantwort darstellen. In Pflanzen konnten viele Proteine des primären Metabolismus identifiziert werden, die nach abiotischen Stress über 14-3-3-Proteine in ihrer Aktivität reguliert werden wie z.B. die Nitratreduktase, Saccharose-Phosphat-Synthase, Glutaminsynthase und Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase. Außerdem sind 14-3-3-Proteine an der Antwort von Pflanzen auf Salzstress beteiligt (Chen et al.; 1994). So konnte in Tomaten eine stressabhängige Aktivierung von auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen durch 14-3-3-Proteine beschrieben werden (Booij et al.; 1999), die nach einer Depolarisierung der Membran durch externe Stressfaktoren das Ruhepotential wieder einstellten. Viele dieser Stressfaktoren, wie auch Verwundung, Kälte, hoher Salzgehalt oder Trockenheit, leiten über Änderungen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration diese Signale weiter. Dabei führt die Aktivierung von Calciumkanälen in der Plasmamembran zu einer Depolarisierung des Membranpotentials (Knight et al.; 1997; Knight et al.; 1991; Minorsky und Spanswick 1989) und zu einer Ca^{2+} -abhängigen Veränderung des

1. Einleitung

Phosphorylierungsmusters von Proteinen (Bush, 1995; Trewavas, 1999; Knight und Knight, 2001). In Pflanzen findet man verschiedene Sensoren, die Calciumsignale nach Bindung des Calciumions interpretieren können. Dazu gehören Calmodulin und Calcineurin-B-ähnliche Proteine. Auch die Calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPKs) welche viele der 14-3-3-Bindungsmotive phosphorylieren werden durch Calciumsignale aktiviert. Änderungen im Calciumspiegel werden auch durch Hormone induziert (Bethke et al., 1995; Bush 1995). So konnte man eine Erhöhung der CDPK Aktivität in Reissamen nach Behandlung mit Gibberelinen beobachten (Abo-el-Saad and Wu, 1995). Auch die Expression einiger CDPKs wird durch Hormone wie GA, ABA, IAA und Cytokinin beeinflusst (Yoon et al., 1999; Botella et al., 1996; Davletova et al., 2001). Li et al. zeigten, dass die CDPKs den spannungsabhängigen Kaliumeinwärtskanal KAT1 aus *Arabidopsis* phosphorylieren können (Li et al., 1998). Nach Koinjektion von KAT1 und CDPK mRNA in Oocyten von *Xenopus laevis* kann eine Inaktivierung des KAT1-Stroms beobachtet werden (Berkowitz et al., 2000). In Schließzellen spielt Calcium eine wichtige Rolle beim ABA-induzierten Stomaschluss. Dabei wurde postuliert, dass über diese Signalkette aus Kinase zum Ionenkanal eine stressinduzierte Schließung der Spaltöffnung und damit eine Reduktion des Wasserverlusts ermöglicht wird. Die wichtige Rolle der CDPKs bei der Signaltransduktion von abiotischem Stress wird auch deutlich, wenn OsCDPK7 in den Leitgeweben von Reis überexprimiert wird. Diese Pflanzen sind toleranter gegen Kälte-, Salz- und Trockenstress (Saijo et al., 2001).

Ein konstanter Kaliumgehalt im Cytoplasma, auch unter Stressbedingungen, ist überlebenswichtig für die Pflanze. So konnte für die Proteinbiosynthese *in vitro* gezeigt werden, dass physiologische K^+ -Konzentrationen (100-150mM) für verschiedene Schritte der Translation, wie z.B. die ribosomale Bindung der t-RNA, erforderlich sind. Außerdem beeinflusst die Verfügbarkeit von Kalium die Photosynthese. So hängt die Photosyntheserate isolierter Chloroplasten von der K^+ -Konzentration im Außenmedium ab und die Abnahme der Photosyntheserate in trockengestressten Pflanzen kann durch die Bereitstellung höherer Kaliumkonzentrationen im Boden gemildert werden (zusammengefasst in Marschner, 1995). Kalium kann bezüglich der beschriebenen Funktionen im Allgemeinen nicht durch andere Ionen ersetzt werden. Zwar kann Natrium wie Kalium als gewöhnlich leicht verfügbares Osmotikum dienen, jedoch ist eine zu hohe cytosolische

1. Einleitung

Natriumkonzentration toxisch für viele Pflanzen. Es ist daher für Pflanzen essentiell, das zelluläre Verhältnis von Kalium und Natrium im Cytosol möglichst konstant zu halten. Besonders Pflanzen, die auf salzhaltigen Böden wachsen, sind darauf angewiesen, ein möglichst hohes K^+/Na^+ -Verhältnis beizubehalten, welches als bestimmender Faktor für die Ausbildung der Salztoleranz bei Pflanzen gilt (Maathuis und Amtmann, 1999). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Pflanzen Salzstress erheblich besser tolerieren können, wenn sie ausreichend mit Kalium versorgt sind (Marschner, 1995) oder wenn die Calciumkonzentration im Boden erhöht wird (Ref). Die Pflanze hat mehrere Mechanismen entwickelt, wie sie toxisches Natrium aus ihrem Cytoplasma entfernen kann. So kann z.B. über das calciumaktivierte SOS-System, bestehend aus SOS1, 2, 3, Natrium über einen energieabhängigen Austausch mit Protonen über die Plasmamembran in das Außenmedium abgegeben werden. Die AtNHX-Transporter (Na^+/H^+ -exchanger) können ebenfalls über einen energieabhängigen Austausch mit Protonen Natrium über den Tonoplasten in das Lumen der Vakuole transportieren. Vorstellbar wäre auch der passive Transport von Natrium über TPC1 in die Vakuole. Inwiefern TPK1 an diesen Prozessen beteiligt ist, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mechanismen der Regulation der pflanzlichen Tandem-Poren-Kaliumkanäle untersucht werden. Dazu sollte zuerst die subzelluläre Lokalisation und funktionelle Charakterisierung der Mitglieder der TPK-Familie bestimmt werden. Besonderes Augenmerk sollte auf die Struktur-Funktions-Analyse bezüglich funktioneller Domänen wie EF-Hände, Phosphorylierungs- und 14-3-3-Bindestellen und der diesbezüglichen Kanaleigenschaften gelegt werden. Auch die physiologische Relevanz dieser Interaktion sollte untersucht werden, um Einblicke über die Signalketten zu erhalten, welche die Aktivität der TPKs regulieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die TPKs in einem calciumabhängigen Signaltransduktionsmechanismus eingebettet sind und ob die Kanalaktivität der TPKs über ein Kinase/Phosphatase-System durch äußere Stressfaktoren reguliert wird.

1. Einleitung

1. Lokalisation/“Targeting“ der TPKs

Zur Determinierung der subzellulären Lokalisation der TPKs sollten Kanal::GFP Fusionskonstrukte hergestellt werden und diese sollten mit Hilfe der „particle inflow gun“ in Epidermiszellen von *Allium cepa* zur Expression gebracht werden um anschließend die subzelluläre Lokalisation unter dem LSM zu analysieren. Außerdem sollte mit Hilfe von Chimären und Mutanten untersucht werden, ob das 14-3-3-Bindemotiv wie im tierischen System einen Einfluss auf das Targeting der TPK-Kanäle hat.

2. Interaktion und Regulation der TPKs durch 14-3-3-Proteine

Hierzu sollten zuerst durch eine Kollokalisationsanalyse zwischen unterschiedlich markierten TPKs und 14-3-3-Proteinen mögliche Interaktionspartner gesucht werden. Die biochemische Analyse der Proteininteraktion sollte durch Pulldown-Analysen von heterolog exprimierten und affinitätsaufgereinigten Kandidatenproteinen erfolgen und durch „surface-plasmon-resonance“-Studien quantifiziert werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion sollte in Hefevakuolen untersucht werden.

3. Interaktion und Regulation der TPKs durch Kinasen/Phosphatasen

Da die 14-3-3-Interaktion mit den TPKs abhängig von der Phosphorylierung eines Serin/Threonin im 14-3-3-Bindemotiv der Kanäle ist, sollten die hierfür verantwortliche Kinasen und Phosphatasen identifiziert werden. Dazu sollten aus Blattextrakten von *Arabidopsis thaliana* durch Kinase- und Phosphatase-Assays zunächst mögliche Proteinfamilien identifiziert und diese dann auf Proteinebene eingegrenzt werden. Nach Reinigung, Klonierung und Analyse der für die Phosphorylierung/Dephosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle verantwortlichen Proteinkinasen und dazugehörigen Phosphatasen sollten diese in ihrer Funktion näher analysiert werden und zusammen mit den TPKs in eine Signalkette der Regulation der Kanalaktivität eingebettet werden.

4. Interaktion und Regulation der TPKs durch Calcium

TPK1, 2, 3 und 5 besitzen am C-Terminus calciumbindende EF-Hände. Für TPK1 wurde in Hefe bereits gezeigt, dass dieser Kanal durch Calcium aktiviert wird. Für eine funktionelle Analyse der EF-Hände sollten die C-Termini dieser Kanäle aufgereinigt und mittels overlay-Verfahren auf Calciumbindung überprüft werden.

1. Einleitung

5. Einbettung der TPKs in die Signalketten der Stressphysiologie der Pflanze

Das finale Ziel stellt die Entschlüsselung des Signalweges, welcher zur Aktivierung/Deaktivierung der TPKs führt, dar. Dazu sollte ermittelt werden, unter welchen äußeren Bedingungen bestimmte Signalwege wie Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder Calcium als second messenger bzw. 14-3-3-Proteine zu einer Regulation der TPK-Kanalaktivität führen. Außerdem sollte analysiert werden, wie diese Signalwege selbst reguliert werden bzw. welche Relevanz dies in der Stressphysiologie bezüglich Perzeption und Weiterleitung eines Signals mit der anschließenden physiologischen Antwort darstellt.

6. Etablierung eines pflanzenbasierten Expressionssystems

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften TPKs durch "Patch-Clamp"-Messungen an isolierten Vakuolen bestimmen zu können, sollte eine transiente Expression der Kanalproteine im pflanzlichen Hintergrund durch Etablierung der „Agro-Infiltrations“-Methode realisiert werden. Dieses Verfahren könnte zum Studium der Aktivierung und Regulation der TPKs durch modulatorische Proteine (z.B. 14-3-3), sekundäre Botenstoffe (z.B. Calcium), mechanische Kräfte und Temperatur eingesetzt werden. Entsprechend gewonnene Proteine könnten auch für biochemische Studien bezüglich TPK-Interaktionen herangezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verfahren mit rekombinanter DNA

Die Methoden der DNA-Rekombination beruhen auf dem Prinzip, dass DNA-Moleküle, wie z.B. Plasmide, als Träger oder Vektoren für Fremd-DNA in einer geeigneten Zelle zur Replikation in der Lage sind. Die Entstehung solcher rekombinanter, transduzierender DNA-Moleküle wird *in vitro* durch das Zusammenfügen von modifizierten DNA-Einschüben und Vektor DNAs erreicht. Dazu werden Enzyme wie Restriktionsendonucleasen, DNA-Ligasen oder auch DNA-Polymerasen verwendet. Solche rekombinanten Moleküle werden dann in geeignete Zellen eingeschleust, wo sie durch DNA-Replikation vermehrt werden. Dabei werden Zellen durch die rekombinante DNA transformiert.

2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ausgewählte und kurze DNA-Abschnitte können *in vitro* durch die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden. Dies erlaubt eine direkte milliardenfache Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes aus einer DNA-Sequenz. Man benötigt dazu 2 DNA-Oligonucleotid-Primer (jeweils ca. 20bp), deren Basenabfolge jeweils zu einem der beiden 3'-Einzelsträngenden des zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA-Segments komplementär ist. Die *in vitro* DNA-Synthese der zwischen den beiden Primern liegenden Sequenz wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert. In jedem Reaktionszyklus der PCR ist eine kurze Hitzebehandlung erforderlich, um die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix zu trennen (Schritt 1). Die spezielle DNA-Polymerase *Pfu* aus dem thermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus* ist auch bei höheren Temperaturen stabil und wird durch das wiederholte Erhitzen nicht denaturiert. Außerdem besitzt diese Polymerase ein Temperaturoptimum bei 72°C - 78°C. Bei dieser Temperatur ist auch die Basenpaarung zwischen den Oligonucleotid-Primern und der DNA besonders spezifisch. Während des anschließenden Abkühlens sind die beiden Oligonucleotid-Primer im Überschuss vorhanden und hybridisieren spezifisch mit den komplementären Sequenzen der DNA (Schritt 2). Durch die Inkubation mit der DNA-Polymerase und den vier Desoxyribonucleosid-Trisphosphaten werden die

2. Material und Methoden

stromabwärts von jedem der beiden Primer gelegenen DNA-Abschnitte, an den 3'-OH der Primer beginnend, selektiv in 5'-Richtung verlängert (Schritt 3). Die Zyklen werden mit einem computergesteuerten Heizblock automatisiert. Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle werden denaturiert, wieder mit den Primern hybridisiert und die DNA-Polymerase Reaktion wird wiederholt. Dabei dienen nun auch die neu synthetisierten Fragmente ihrerseits als Template, wodurch sich die Menge des zu amplifizierenden DNA-Segments jeweils verdoppelt. Dieser Zyklus (Denaturieren, Hybridisieren und Synthese) kann bis zu 60-mal wiederholt werden. Nach einigen Reaktionszyklen liegt dann als vorwiegendes Produkt nur eine einzige Art von DNA-Fragmenten vor, dessen Länge dem Abstand zwischen den beiden ursprünglichen Oligonucleotid-Primern entspricht. Man erhält eine exponentielle, 2^n -fache Amplifikation der Ausgangs-DNA-Sequenz, wobei n die Anzahl der Zyklen ist. Bei einer Variante der PCR enthalten die 5'-Enden der Primer-Sequenzen einer Restriktionserkennungsstelle, welche nach der Amplifikation für die Klonierung in einen Vektor genutzt werden kann.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde für die PCR folgender Reaktionsansatz verwendet.

Tab. 2.1. PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
DNA-Template	5ng
10x Reaction Buffer	5 μ l
dNTP (dATP; dCTP; dGTP; dTTP)	0,2mM
sense Primer	25pM
antisense Primer	25pM
PfuTurbo [®] DNA Polymerase	5U
PCR-H ₂ O	add. 50 μ l

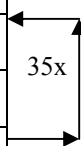
Sowohl die PfuTurbo[®] DNA Polymerase als auch der 10x Reaction Buffer (200mM Tris-HCl; 100mM KCl; 100mM (NH₄)₂SO₄; 20mM MgSO₄ 1% Triton[®]X-100; 1mg/ml nuclease-free BSA) wurden von Stratagene[®] bezogen. Die Oligonucleotid-Primer wurden von SIGMA[®]-ARC synthetisiert (Sequenz s. Anhang).

2. Material und Methoden

Der Reaktionsansatz wurde in 2-fach bei 120°C für 20 min autoklavierten 0,5ml Reaktionsgefäßen mit gestopften Pipettenspitzen pipettiert und anschließend mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet. Die PCR wurde im Thermocycler (Modell Varius V45, Landgraf) durchgeführt. Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt (Programm 2).

Tab. 2.2. PCR-Zyklen

<u>Anzahl der Zyklen</u>	<u>Temperatur</u> [°C]	<u>Zeit</u> [sec]
1x Denaturieren	95	120
35x Denaturieren	95	30
35x Primer-Annealing	60	30
35x DNA-Synthese	72	240
1x Abschluss der Synthese	72	300
1x Lagerung	4	∞



Nach der Beendigung der PCR wurde das Mineralöl entfernt und das PCR-Produkt bei -20°C gelagert. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem DNA-Agarosegel überprüft (s. Kapitel 2.1.3.) und konnte für Klonierungen herangezogen werden. Die *Pfu*-Polymerase erzeugt im Gegensatz zur *Tag*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* blunt-end PCR-Produkte.

2.1.2. Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Restriktions-Endonukleasen sind bakterielle Enzyme, die Zellen gegen Viren schützen sollen, indem sie Virus-DNA abbauen. Restriktionsenzyme erkennen spezifische Basensequenzen von 4 bis 8 Nukleotiden in einer DNA-Doppelhelix und hydrolysieren eine Phosphodiesterbindung in beiden Strängen der Helix an spezifischen Stellen. Wo solche Sequenzen im Prokaryonten-Genom selbst vorkommen, sind diese Stellen durch Methylierung an einem Adenin- oder Cytosin-Rest geschützt. Restriktionsendonuklease erzeugen entweder versetzte Schnitte mit kurzen, überstehenden Einzelstrangabschnitten (sticky-end) oder glatte Schnitte (blunt-end). Es gibt drei unterschiedliche Typen von Restriktionsenzymen. Typ-I-

2. Material und Methoden

Enzyme sind bifunktionelle Enzyme, die sowohl die DNA methylieren können als auch Endonuklease-Aktivität besitzen. Sie schneiden die DNA mehr als 1000bp von ihrer zweigeteilten, asymmetrischen Erkennungssequenz entfernt. Auch Typ-III-Enzyme, ebenfalls bifunktionell, schneiden nicht in ihrer 5-7bp großen, asymmetrischen Erkennungssequenz, sondern 24-26bp stromaufwärts von dieser. Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Restriktions-Endonukleasen sind Enzyme vom Typ-II. Sie erkennen eine zweifach rotationssymmetrische (palindromische) Sequenz und schneiden auch in dieser, falls beide Stränge der Zielstelle im nichtmethylierten Zustand vorliegen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Dimere aus identischen Einheiten.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Restriktionsverdau zur Analyse von DNA und zur Herstellung von Fragmenten für die weitere Klonierung verwendet. Dazu wurden die in Tab. 2.3. und Tab. 2.4. aufgeführten Reaktionsansätze benutzt.

Tab. 2.3. Reaktionsansatz für einen analytischen Restriktionsverdau

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	3µg - 5µg
Restriktionsenzym	1U
10x Enzymspezifischer Puffer	2µl
H ₂ O	add. 20µl

Tab. 2.4. Reaktionsansatz für einen präparativen Restriktionsverdau

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	10µg
Restriktionsenzym	5U
10x Enzymspezifischer Puffer	5µl
H ₂ O	add. 50µl

Für die Restriktionsanalyse wurde der Reaktionsansatz (Tab. 2.3.) für 30 – 60 min bei 37°C inkubiert. Sollten die durch den Restriktionsabbau entstandenen Fragmente für weitere Schritte zur Verfügung stehen, so wurde der Restriktionsansatz (Tab. 2.4.) für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde nun durch

2. Material und Methoden

eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.1.3.) auf ihren Erfolg hin überprüft.

2.1.3. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Durch die DNA Agarose Gelelektrophorese lassen sich Größenfraktionierungen von DNA-Molekülen erreichen. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie in einem elektrischen Feld zur Anode (Plus-Pol). Maßgebend für die Trennschärfe ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen, die von der Größe der Moleküle und dem Vernetzungsgrad des Trägermaterials abhängt. Begrenzt wird die Geschwindigkeit der Bewegung, neben der Stärke des elektrischen Feldes, durch die mittlere Porengröße der Agarose, einem Polysaccharid aus Algen. Dabei wandern kleine Fragmente im Allgemeinen schneller durch die Poren als größere Fragmente. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten von 500–10.000bp eignen sich 1%-ige Agarosegele. Um die DNA-Fragmente sichtbar machen zu können, wurde das Agarosegel mit 1‰ Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA und fluoresziert in diesem Zustand bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 260-360 nm (UV Band-Elutor, Biometra) rot-orange. Die zu fraktionierende DNA-Probe wurde mit 10x DNA-Gelladungspuffer versetzt und im elektrischen Feld bei einer Spannung von 80-100 V aufgetrennt, wobei als Laufpuffer und Gelpuffer 1 x TBE diente. Die Dokumentation der DNA-Banden im Agarosegel erfolgte photographisch unter UV-Licht (312nm; Image Master VDS, Pharmacia). Als Größenstandard wurden 7µl λ-PST verwendet (s. Anhang).

Folgende Puffer wurden verwendet.

Tab. 2.5. Bei der DNA-Gelelektrophorese verwendete Puffer

10 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer):		DNA-Gelladungspuffer (in H₂O):	
Tris HCl (pH 8.3)	1 M	Bromphenolblau	0.25 % (w/v)
Borsäure, wasserfrei	0.9 M	Xylen Cyanol FF	0.25 % (w/v)
EDTA	10 mM	EDTA (pH 8.3)	100 mM
ddH ₂ O		Glycerin	50 % (w/v)

2. Material und Methoden

2.1.4. DNA-Elution aus Agarosegelen

Nach der Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld können diese aus dem Agarosegel isoliert werden. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll „JETSORB DNA Extraction / 150“ (Genomed).

Je 100mg Gelstück wurden 300 µl A1-Puffer in das 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Außerdem wurden noch 10µl JETSORB-Lösung hinzugefügt. Diese Mischung wurde zuerst gevortext und dann für 15 min bei 50°C inkubiert, wobei alle 3 min eine Durchmischung der Lösung erfolgte. Danach wurde für 30 Sekunden bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde nun in 300µl A1-Puffer gewaschen (High Salt Wash) und der Zentrifugations-Schritt wurde wiederholt. Nun folgten 2 Waschschriffe mit 300µl des A2-Puffers (Low Salt Wash), wobei zwischendurch wieder für 30 Sekunden bei 10.000g zentrifugiert wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 20µl ddH₂O aufgenommen und für 5 min bei 50°C inkubiert. Nun wurde für 2 min bei 10.000g zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun das aufgereinigte DNA-Fragment, welches nun für weitere Arbeitsschritte zur Verfügung steht.

2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgte mittels UV-Photospektrometrie (GeneQuant II, Pharmacia) bei 230 nm, 260 nm und 280 nm. Die Proben wurden hierzu 1:70 mit ddH₂O verdünnt, in eine 1 cm dicke Quarzküvette überführt und die Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm spektralphotometrisch gemessen. Anhand der Formel $E_{260\text{nm}} \cdot F \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 = \text{Konzentration der Probe in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$, wurden für DNA (Extinktionsfaktor F= 50 µg/µl) die Nukleinsäurekonzentration der Proben ermittelt. Über den Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm ließ sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. Niedrige Werte sind ein Indiz für die vermehrte Anwesenheit von Proteinen (Absorptionsmaxima bei 280 nm) bzw. Kohlenhydraten (Absorptionsmaxima bei 230 nm). Ideale Werte liegen bei 1.8 bis 2.0.

2. Material und Methoden

2.1.6. Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Bei der DNA-Rekombination muss man häufig Phosphomonoestergruppen vom Ende einer DNA-Kette entfernen um eine Religation des Vektors zu vermeiden, denn durch das Fehlen der 5'-Phosphomonoestergruppen wird eine intramolekulare Ligation unterbunden. Die thermosensitive alkalische Phosphatase TsAP aus *E.coli* (GibcoBRL) hydrolysiert 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden unter schwach denaturierenden Bedingungen (erhöhte Temperatur). Für die Entfernung der terminalen Phosphatgruppen wurden 1U TsAP zu den isolierten DNA-Fragmenten (s. Kapitel 2.1.4.) hinzugefügt, welche in Mg^{2+} -enthaltenden Puffer gelöst waren und inkubiert bei 65°C für 15 min. Anschließend wurde die Phosphatase durch Zugabe einer der Mg^{2+} -Konzentration entsprechende EDTA-Menge und Inkubation bei 65°C für 15 min inaktiviert oder durch Isolierung der DNA mittels JETSORB (s. Kapitel 2.1.4.) entfernt. Alternativ kann 1U der thermosensitiven alkalischen Phosphatase auch direkt zum Restriktionsansatz (s. Kapitel 2.1.2.) gegeben werden.

2.1.7. DNA-Ligation

Für die *in vitro* Verknüpfung von DNA-Fragmenten benötigt man das Enzym DNA-Ligase. Die DNA-Ligase verbindet DNA-Moleküle in einem energieabhängigen Prozess kovalent miteinander, indem sie die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten Nukleotiden katalysiert. Allerdings ist nur die T4-DNA Ligase, ein Enzym des Bakteriophagen T4, in der Lage, zwei Doppelstränge mit glatten Enden zu verknüpfen, während andere Ligasen im Allgemeinen von der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen abhängen, die sich zwischen komplementären, überhängenden DNA-Sequenzen bilden. Durch die schwache Bindung, die bei der Hybridisierung der kohäsiven DNA-Enden entsteht, wird es der DNA-Ligase erleichtert beide Stränge miteinander zu verknüpfen.

2.1.7.1. DNA-Ligation durch Directional-TOPO[®]-Cloning

Bei der Ligation durch Directional-TOPO[®]-Cloning werden blunt-end PCR-Produkte (s. Kapitel 2.1.1.) direkt in das Plasmid pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen)

2. Material und Methoden

kloniert, wobei keine DNA-Ligasen benötigt werden. In diesem System werden dem sense-Primer 4 Basen hinzugefügt (CACC). Der Überhang des Vektors dringt in das 5'-Ende des PCR Produkts ein und hybridisiert mit den hinzugefügten Basen und stabilisiert dabei die richtige Orientierung des PCR-Produktes. Dabei bildet sich ähnlich wie bei der meiotischen Rekombination eine Heteroduplex-DNA. Die 4 Nukleotide des 5'-Einzelstrangüberhangs sind komplementär zum 5'-Ende einer einfachen Kozak-Sequenz. Diese eukaryontische Translations-Initiations-Sequenz erhöht die Expression von offenen Leserastern in eukaryontischen Zellen durch eine Verbesserung der Effizienz bei dem Zusammenbau der Ribosomen. Die Topoisomerase I aus dem Virus *Vaccinia* bindet an spezifischen Stellen an die Heteroduplex-DNA und spaltet das Phosphodiester Rückgrad nach dem 5'-CCCTT in einem Strang. Die Energie dieser gebrochenen Phosphodiesterbindung wird auf das Enzym übertragen und dazu benutzt das PCR-Produkt kovalent mit dem Vektor zu verknüpfen. Das so erzeugte rekombinante Plasmid kann nun in One Shot[®] Top10 *E.coli* Zellen transformiert werden.

Für die Ligation eines blunt-end PCR-Produktes durch Directional-TOPO[®]-Cloning wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

Tab. 2.6. Reaktionsansatz für die DNA-Ligation mittels Directional-TOPO[®]-Cloning

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	2,5µl
Salz-Lösung (1,2M NaCl; 0,06M MgCl ₂)	1µl
TOPO [®] -Vektor	1µl
ddH ₂ O	add. 5µl

Der durchmischte Reaktionsansatz wurde 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2µl des Vektors durch Hitzeschock (s. Kapitel 2.1.8.) in One Shot[®] Top10 *E.coli* Zellen transformiert.

2.1.7.2. DNA-Ligation durch die T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung von 3'-Hydroxy- mit 5'-Phosphat-Enden von doppelsträngigen DNA-Molekülen. Für diese katalytische Aktivität benötigt das Enzym neben Mg²⁺ auch den Energieträger ATP. Die Katalyse führt zu einer Austauschreaktion der Phosphate zwischen dem Pyrophosphat und dem γ-

2. Material und Methoden

Phosphat von ATP. Für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels der T4-DNA-Ligase wurde folgender Ansatz verwendet.

Tab. 2.7. Reaktionsansatz für die DNA-Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Reagenz	Menge
Vektor Rückgrad	400ng – 800ng
DNA-Insert	Bis zu 3facher Überschuss zum Vektor Rückgrad
10x Ligationspuffer	2µl
T4 DNA-Ligase	2U bei sticky-end-; 4U bei blunt-end- Ligation
50% PEG 4000	2µl (nur bei blunt-end Ligation)
ddH ₂ O	add. 20µl

Der Reaktionsansatz wurde zusammen pipettiert, kurz abzentrifugiert, und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die T4 DNA-Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Der Ligationsansatz stand nun für die Transformation von XL1-Blue MRF⁻ bzw. DH5α- *E. coli*-Zellen bereit.

2.1.7.3. Gateway-Klonierung

Für Gateway®-Klonierungs-Reaktionen (Invitrogen) wurden die gewünschten kodierenden Sequenzen in den Vektor pENTR-MCS (siehe Anhang) so kloniert, dass diese von den beiden Rekombinationsstellen, attL1 und attL2, flankiert wurden. Die "LR clonase"-Reaktion um die DNA-Fragmente der "entry"-Klone in den "destination"-Vektor pMDC32 (Curtis *et al.*, 2003) zu übertragen, wurde nach Angabe des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Das Produkt der Rekombination (LR Reaktion) wurde verwendet um den *E. coli* Stamm DH5α mittels Hitzeschock zu transformieren (siehe 2.1.8.). Das fertige Plasmid wurde aufgereinigt und der *A. tumefaciens*-Stamm LBA4404 wurde mit diesen Plasmiden durch Elektroporation (siehe 2.2.2.1.) transformiert.

2. Material und Methoden

2.1.8. Transformation von Bakterienzellen

Nach der Ligation der PCR-Produkte in die Vektoren konnten diese in kompetente Bakterien übertragen werden. Nach dem Directional-TOPO[®]-Cloning wurden chemisch kompetente One Shot[®] Top10 (Genotyp: F- mcrA .(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ.M15 .lacX74 recA1 deoR araD139 .(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG; Invitrogen) *E.coli* Zellen verwendet. Nach einer Ligation mit der T4-DNA-Ligase wurden je nach Verfügbarkeit entweder XL1-Blue MRF'-Zellen (Genotyp: (mcrA)183; (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Lac; Bullock, 1987) oder DH5 α -Zellen (Genotyp: SupE44; lac U 169 (lacZ M15) hsd R17 rec A1 EndA1 gyrA96 thi-1 rel A1; Hanahan, 1993) verwendet. Es wurden 2 μ l (für One Shot[®] Top10) bzw. 5 μ l (für MRF' oder DH5 α) des Ligationsansatzes vorsichtig zu 50 μ l der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend sorgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad für die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien. Nach Zusatz von 450 μ l SOC-Medium für XL1-Blue MRF'- und die DH5 α - Zellen bzw. 250 μ l für One Shot[®] Top10-Zellen wurden die Bakterien für 1 Stunde bei 37 °C unter starkem Schütteln (300 rpm) regeneriert. Das SOC-Medium wurde aus SOB-Fertigmedium (Bio 101, Inc.) durch Zusatz von 0.4 % Glucose hergestellt. 50 μ l der transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die mit einem geeigneten Antibiotikum in adäquater Menge versetzt waren. Das Antibiotikum gewährleistete, dass nur transformierte Zellen, die ein Plasmid aufgenommen hatten und dadurch resistent sind, sich auf dem Selektionsagar vermehren konnten. Die Vermehrung der Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank „Modell 600“ (Memmert). Um Plasmide für weitere Verarbeitungsschritte in ausreichender Menge zu erhalten, wurden einige der über Nacht gewachsenen Kolonien einzeln in 5ml LB-/Antibiotika - Medium überimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Tab. 2.8. LB-Selektionsmedium

Trypton	1.0 %
Hefeextrakt	0.5 %
Natriumchlorid	171 mM
Antibiotika	Menge abh. vom Antibiotikum

2. Material und Methoden

Tab. 2.9. LB-Selektionsagar

Trypton	1.0 %
Hefeextrakt	0.5 %
Natriumchlorid	171 mM
Agar	1,5%
Antibiotika	Menge abh. vom Antibiotikum

Tab. 2.10. Verwendete Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Stocklösung</u>	<u>Wirkung</u>
Ampizillin	50µg/ml	50mg/ml in H ₂ O bei -20°C	Hemmt die Transpeptidierung (Zellwandsynthese)
Kanamycin	50µg/ml	50mg/ml in H ₂ O bei -20°C	Hemmt die Proteinsynthese (Translokation)
Tetracyclin	10µg/ml	10mg/ml in H ₂ O bei -20°C	Verhindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle im Ribosom

2.1.9. DNA-Minipräparation

Bei der Plasmid-Mini-Präparation wird die Plasmid-DNA von der chromosomale DNA der Bakterien und den bakteriellen Proteinen getrennt. Dies erfolgt durch die denaturierenden Bedingungen des Lysis-Puffers, in dem sich die komplementären DNA-Stränge der chromosomalen DNA trennen, die ringförmige Plasmid-DNA jedoch aufgrund der Überspiralisierung nicht. Durch die Behandlung mit Natriumacetat erfolgt Renaturierung, wobei die einzelsträngige chromosomale DNA als Komplex mit SDS ausgefällt wird.

Für die Isolierung der Plasmide wurden Kolonien (s. Kapitel 2.1.8.) in 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium über Nacht im „Inkubator Shaker Model G25“ (New Brunswick scientific co.Inc) bei 37 °C vermehrt und mittels alkalischer Lyse nach dem

2. Material und Methoden

Protokoll von Zhou et al. 1990 gewonnen. Dazu wurden 1,5 ml der Übernachtskulturen für 30 Sekunden zentrifugiert (Tischzentrifuge, Beckman E). Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl entfernt und das Pellet resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellwände wurde die Bakteriensuspension mit 300µl TENS-Puffer (s. Anhang) versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die klare, viskose Lösung wurde mit 150µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) neutralisiert und für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 500µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend für 5 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 300µl 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und dann in 50 µl H₂O resuspendiert und entweder kurzfristig bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

2.1.10. DNA-Midipräparation

Diese Präparationsmethode, mit dem „Wizard *Plus* Midipreps“-System (Promega) wurde bei Proben angewendet, bei denen nach einer Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.1.3.) davon auszugehen war, dass sich die Insertion in der gewünschten Form im Vektor befand. Die durch eine Midipräparation isolierte und gereinigte DNA diente als Ausgangspunkt für alle weiteren Anwendungen. Es wurden 50 ml einer Übernachtskultur (s. Kapitel 2.1.8.) für 10 min bei 4°C und 4800 rpm zentrifugiert (Beckman, GS-15R). Das Sediment wurde in 3ml Resuspensionslösung aufgenommen und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 3ml Lysispuffer wurde durch Invertieren gemischt, bis die Lösung klar wurde und anschließend 3ml Neutralisationspuffer zugegeben. Das Lysat wurde 15 min bei 4°C und Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert (Beckman, GS-15R), der Überstand abgenommen und in eine Säule mit Purification-Resin (Silicatmatrix) gegeben. Die Lösung wurde durch eine Vakuumpumpe entfernt, wobei die DNA an der Silicatmatrix band. Die Matrix wurde nun zweimal mit ethanolhaltigen Waschpuffer gewaschen. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 300 µl auf 65°C vorgewärmten TE-Puffer von der Resin-Matrix eluiert und ihre Konzentration absorptionsphotometrisch (s. Kapitel 2.1.5.) bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1.11. DNA-Sequenzierung

Die Identifikation der PCR-Produkte erfolgte anhand der nicht-radioaktiven Sequenzierung nach dem ALF-Verfahren (engl.: **A**utomated **L**aser **F**luoreszenz) mit dem Sequenziergerät LiCOR 4200 (Licor). Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem System „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing“ (Amersham Pharmacia) durchgeführt, die Sequenzkorrektur mit dem Programm Chromas (Version 1.43). Für die Sequenzierung wurden der fluoreszenzmarkierte, genspezifische Primer (s. Anhang) verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „Vektor NTI“ (InforMax), wobei die erhaltenen Sequenzen mit den zu erwartenden Sequenzen verglichen wurde.

2.1.12. Quantitative RT-PCR

Die LightCycler Technologie (Roche) erlaubt sowohl die Detektion als auch die quantitative Darstellung der Kinetik und des Ergebnisses einer PCR-Reaktion (Rasmussen, 1998). Zusätzlich können spezifische PCR-Produkte mit Hilfe einer Schmelzpunkt-Analyse von unspezifischen Amplifikaten unterschieden werden. Die Fluoreszenz-Detektion der Amplifikate beruht hierbei auf der selektiven Interkalierung von SYBR Green I in die bei der PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA, so dass die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA-Konzentration zunimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene mit Hilfe des LightCyclers (Roche Diagnostics) untersucht. Der Einsatz von cDNA als Matrize ermöglichte es hierbei, durch den Verlauf der PCR-Reaktion auf die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkriptes in einer zu untersuchenden Gewebeprobe zu schließen.

Die RNA von *Nicotiana benthamiana* Blättern wurde mit dem Plant RNeasy Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Restliche DNA wurde mit RNase-Free-DNase (Amersham, Freiburg, Germany) nach Angaben des Herstellers verdaut. Einzelstrang-cDNA wurde mit dem M-MLV-RT Kit (Promega, Mannheim, Germany) hergestellt und 20fach in Wasser für die RT-PCR verdünnt. Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler (Roche, Mannheim, Germany) mit dem LightCycler-Fast

2. Material und Methoden

Start-DNA-Master-SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim, Germany) durchgeführt. Verwendet wurden folgende Primer:

NtACTfwd (5'-CCCAGAAGTCCTCTT-3')

NtACTrev (5'-GGGATGCGAGGAT-3')

TORK1fw(5'-GGATCTACTACGAAGGC-3')

TORK1rev (5'-AAACACAGTACACTTCT-3')

TORK2fw(5'-CAGAATTTTCTACGAGC-3')

TORK2rev(5'-CTTTCCTAACTAAAAACAG-3')

TPK4fw (5'-GCAAGATAAGGTAAAGTG-3')

TPK4rev (5'-CATGACAGTAGTACGAT-3')

Alle Quantifizierungen wurden auf 10000 Aktin cDNA Moleküle normalisiert, welche mit NtACTfwd and NtACTrev amplifiziert wurden. Diese *Nicotiana tabacum* sind homolog zu den konstitutiv exprimierten *Arabidopsis* Aktinen 2 und 8 (siehe Szyroki *et al.*, 2001). Die Primer für *NtACT*, *TORK1* und *TORK2*, welche für eine PCR auf *Nicotiana tabacum* Templates erstellt wurden, wurden auf die Fähigkeit überprüft, die gleichen Transkripte in *Nicotiana benthamiana* zu amplifizieren durch die Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkte. Jedes Transkript wurde durch individuelle Standards quantifiziert. Um die Möglichkeit von kontaminierender genomischer DNA zu überprüfen, wurden PCRs mit dem selben RNA Template, welches auch für die cDNA Synthese verwendet wurde, durchgeführt. Alle Kits wurden nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.1.13. Mutagenesen

Die Generierung der Chimären aus verschiedenen Kanälen und Mutanten geschah mit Hilfe des QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kits (Stratagene). Dabei wurde sowohl beim Entwurf der verwendeten Primer als auch bei der Durchführung gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Durch Wahl einer geeigneten Lage der Primer gelang es, stille Mutationen in die kodierenden Sequenzen einzuführen

2. Material und Methoden

bzw. die kodierende Sequenz so zu verändern, dass diese an einer gewählten Position für eine andere Aminosäure kodiert. Diese erlaubten den Einsatz von Restriktionsendonukleasen mit deren Hilfe Kanal-Chimären erzeugt werden konnten, die aus zwei verschiedenen Kanälen bestanden bzw. aus modifizierten Proteinen, welche in ihrer Aminosäureabfolge verändert wurde.

2.2. Klonierungs- und Expressionssysteme

Bei der heterologen Expression von Genen werden die in eine geeigneten Wirtszelle eingebrachten DNA-Sequenzen *in vivo* in mRNA und Proteine übersetzt, da der genetische Code universell ist. Dies hat den Vorteil, dass man leicht an große Mengen der gewünschten Transkripte und Proteine gelangen kann. Man benötigt dazu einen Expressionsvektor, der für die Herstellung großer Mengen stabiler mRNA-Moleküle konstruiert ist, die in großer Ausbeute in den transfizierten Zellen in Proteine translatiert werden. Vektoren, die für die effiziente Transkription und Translation eines klonierten DNA-Segments vorgesehen sind, beinhalten Elemente zur optimalen Förderung der Vektorreplikation und Genexpression. Die Transkription ist auf einen Promotor im Vektor angewiesen, der zu der RNA-Polymerase in den Zellen passt. In eukaryontischen Expressionsvektoren muss auch für eine Stelle zur Spaltung und Polyadenylierung des Primärtranskripts gesorgt werden. Eine korrekte Translation erfordert die Anwesenheit eines ATG-Codons am Beginn der codierenden Region und eines der drei Stoppcodons an ihrem Ende. Für die Translation in *E.coli* muss eine Ribosomenbindungsstelle, bestehend aus einem Initiationscodon und einer Shine-Dalgarno-Sequenz, ungefähr zehn Nukleotide vom 5'-Ende des Startcodons entfernt liegen. Nach der Zell-Lyse kann das Fremdprotein von den zelleigenen Proteinen isoliert werden und steht für weitere Analysen zur Verfügung. Die Auswahl eines geeigneten Wirt-Vektor-Systems ist für die Expression eines klonierten Gens entscheidend.

2.2.1. *E.coli*

Prokaryonten wie *E.coli* sind ideale Wirte zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Sie können auch als Fabriken für die Produktion vielfältiger prokaryontischer und eukaryontischer Proteine dienen. Allerdings entfernen Bakterien nicht die Introns aus

2. Material und Methoden

genomischen eukaryontischen Primärtranskripten. Um dieses Problem zu umgehen, muss man bei Prokaryonten cDNA, welche durch die reverse Transkription von mRNA gebildet werden kann, statt Genen für die heterologe Expression verwenden. Expressionsvektoren von *E.coli* benötigen einen starken Promotor. In den prokaryontischen Expressionsvektor pMAL-C2E befindet sich der synthetische *tac*-Promotor. Seine -35-Region hat die Sequenz des *trp*-Promotors und seine Pribnow-Box (-10-Region) entspricht der aus dem *lac-UV5*-Promotor. Der *tac*-Promotor entspricht dem optimalen *E.coli*-Promotor und ist erwartungsgemäß hocheffizient. Außerdem ermöglicht dieser Promotor die zeitliche Kontrolle des Transkriptions- und Translationsbeginns, da er mit entsprechenden Regulationselementen assoziiert ist. Das ist wichtig, denn die Anhäufung großer Mengen eines Fremdproteins kann *E.coli*-Zellen schwächen und ihr Wachstum hemmen, so dass letztlich die Ausbeute an Protein begrenzt bleibt. Wenn man Zellen zu einer hohen Populationsdichte heranzüchtet und dann zu einer optimalen Expression des klonierten Gens anregt, so kann die Ausbeute an Fremdprotein zwischen 1%-10% der Gesamtproteine eines Zellextrakts ausmachen.

2.2.1.1. Transformation, Selektion und Aufzucht von *E.coli*-Zellen

Wie in Kapitel 2.1.8. schon beschrieben, kann ein Vektor in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert werden. Dazu wurden 5µl der Ligation des Expressionsvektors pGex-TT mit der gewünschten codierenden Sequenz zu 50µl kompetenten *E.coli*-Zellen hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C in einem Wasserbad. Dadurch wurde die Zellmembran der *E.coli*-Zellen durchlässig für das Plasmid, welches somit von den Zellen aufgenommen werden kann. Die Zellen wurden nach Zugabe von 450µl SOC-Medium für 1 Stunde bei 37°C unter starkem Schütteln regeneriert. 50µl der transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und durch ein geeignetes Antibiotikum, in diesen Fall 50µg/ml Ampizillin, selektioniert. Die Vermehrung der Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank „Modell 600“ (Memmert). Anschließend wurden einige der über Nacht gewachsenen Kolonien einzeln in 5ml LB-/Antibiotika-Medium überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Restriktionsanalyse über den Erfolg der Klonierung und der Transformierung wurden Glycerin-Stocks von den positiven Klonen für die

2. Material und Methoden

langfristige Lagerung angelegt. Dazu wurden 0,5ml der Übernachtskultur mit 0,5ml Glycerin in 1,5ml Reaktionsgefäßen intensiv gevortext und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2. Induktion der Proteinexpression in *E.coli* durch IPTG

Für die Induktion der Proteinexpression wurden zuerst 500ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum mit 2,5ml einer Übernachtskultur vermengt und zu einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml ($A_{600} \sim 0,5$) aufgezogen. Nun wurde Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1mM hinzugegeben, wodurch das *lac*-Operon des *tac*-Promotors aktiviert wird und nachgeschaltete Gene exprimiert wurden, und die Zellen wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde auch für 3 h bei 30°C bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.1.3. Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine aus *E.coli*-Zellen

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3500g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 20ml B-PER™ (Pierce) solange resuspendiert, bis eine homogene Zelllösung entstand. Diese Mischung wurde für 10 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 27.000g. Im Überstand befanden sich die löslichen Proteine, während sich im Pellet die Zelldebris und die unlöslichen Proteine finden ließen. Die löslichen Proteine können nun für weitere Aufreinigungsschritte verwendet werden (siehe 2.3.5.). Für die Aufreinigung der Inclusion-bodys aus dem Pellet resuspendierte man dieses in 20ml B-PER™. Nach der Zugabe von 400 μ l Lysozym (Serva; Stocklösung 10mg/ml; Endkonzentration 200 μ g/ml) wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 100ml einer 1:10 verdünnten B-PER™-Lösung hinzugefügt und durch Vortexen vermengt. Die Inclusion-bodys wurden durch Zentrifugation bei 27.000g für 15 min isoliert und in 100ml 1:10 verdünnter B-PER™-Lösung aufgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Pellet mit den Inclusion-bodys wurde in 5ml Column-Puffer gelöst und stand somit für weitere Schritte zur Verfügung.

2. Material und Methoden

2.2.2. Agro-Infiltration in *Nicotiana benthamiana*

Das *Agrobacterium tumefaciens* dient nicht direkt zur heterologen Expression von Fremd-Proteinen, sondern wird vielmehr als Vehikel für den Gentransfer in das pflanzliche Genom verwendet, wo dann die Expression der eingeführten DNA-Sequenz geschieht. Das Gram-negative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*, welches zur Familie der *Rhizobiaceae* gehört, induziert bei Pflanzen Wurzelhalstumore (Smith and Townsend 1997). Dabei übertragen Agrobakterien, die mit einer Wunde in Berührung kommen, Teile ihrer DNA in das Genom der Wirtspflanze. Die übertragene Information veranlasst die Pflanze zum unkontrollierten Wachstum. Diese Fähigkeit der DNA-Übertragung besitzen nur die virulenten Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*. Sie besitzen im Gegensatz zu den avirulenten Stämme ein etwa 200kb großes ringförmiges, doppelsträngiges, episomales DNA-Molekül, das ca. 4% der Gesamt-DNA der Bakterien ausmacht (Zambryski *et al.*, 1989). Das Tumor-induzierende Ti-Plasmid beinhaltet eine etwa 20kb lange T-DNA die von 25bp langen Borderregionen begrenzt wird. Bei einer Übertragung der T-DNA wird der eine Strang dieser DNA (T-Strang) in die Pflanze transferiert (Chilton *et al.* 1977, Stachel *et al.* 1986) und in das pflanzliche Genom integriert (Thomashow *et al.* 1980). Eine weitere Region auf dem Plasmid ist die 35kb große *vir*-Region. Diese ist für die Virulenz essentiell, da sie für die Enzyme und Proteine kodiert, die für die T-DNA-Übertragung benötigt werden. Sie wird nicht in die Pflanzenzelle transferiert. Die Gene der T-DNA können nur in Eukaryonten, die übrigen Gene des Ti-Plasmids dagegen nur in Bakterien exprimiert werden. Nach der Verwundung der Pflanze werden phenolische Substanzen freigesetzt, die von dem Protein VirA erkannt werden. Daraufhin lagern sich die Bakterien unter Zuhilfenahme von Genprodukten der chromosomalen Bakterien-DNA an die Pflanzenzelle an. VirG wird durch VirA phosphoryliert und aktiviert die Promotoren der übrigen Vir-Gene. Durch die Endonukleaseaktivität der Proteine VirD1 und VirD2 wird der T-Strang aus dem Plasmid getrennt und am 5'Ende mit VirD2 verbunden. Der Rest des einzelsträngigen Moleküls wird wahrscheinlich durch VirE2Proteine vor dem Abbau geschützt. Diese als T-Komplex bezeichnete Verbindung gelangt in die Pflanzenzelle. Es wird vermutet, dass VirB-Proteine dabei eine Art Kanal bilden (Rezmer, 1999). Der Ablauf der restlichen Transformationsschritte, der Weg zum pflanzlichen Zellkern und die Integration des T-Stranges in die Wirts-DNA ist bisher

2. Material und Methoden

noch nicht genauer geklärt. Die Expression der auf dem T-Strang befindlichen Gene beginnt, sobald der Strang in das Genom der Pflanze integriert ist. Da für den Transfer der T-DNA nur die Borderregionen benötigt werden, kann die übrige DNA durch andere Gene ersetzt werden. Dies macht sich das Vektorsystem pSoup/pGreenII zunutze. Der Vektor pGreenII enthält zwischen den Borderregionen eine modifizierbare T-DNA mit einer „multiple cloning site“. An dieser Stelle können DNA-Sequenzen eingeführt werden, die nach der Integration ins pflanzliche Genom zur Expression gebracht werden. Die für den Transfer benötigten *Vir*-Gene werden von einem modifizierten Agrobakterien-Stamm bereitgestellt, der selbst aber keine T-DNA besitzt.

2.2.2.1. Transformation, Selektion und Aufzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die durch eine Plasmid-Minipräparation (s. Kapitel 2.1.9.) aufgereinigten Vektoren pMDC32 wurden durch Elektroporation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV3103 transformiert. Dazu wurde zuerst die DNA-Konzentration auf 400ng/μl eingestellt. 1μl der verschiedenen pMDC32 Konstrukte wurden zu den auf Eis stehenden, elektrokompetenten Agrobakterien pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde in eine vorgekühlte 2mm Gap Küvette pipettiert. Es wurden 2 Elektropulse von je 2500 Volt gegeben, wobei die Zeitkonstante über 4,5 liegen sollte. Durch diesen Elektroschock wurde die Zellmembran durchlässig für die Plasmide, die nun in die Zellen eindringen konnten. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml YEP-Flüssigmedium (s. Tab. 2.12.) aus der Küvette gespült, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert und zur Regeneration für 3h bei 30°C geschüttelt. 100μl der Bakteriensuspension wurden auf YEP-Selektionsagar (s. Tab. 2.14.) ausplattiert und für 2-3 Tage in einem Wärmeschrank bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml YEP-Selektionsmedium (s. Tab. 2.13.) überführt und für 2 Tage bei 30°C geschüttelt. Diese Flüssigkulturen konnten nun durch eine Behandlung mit Acetosyringon für die Infektion von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vorbereitet oder für eine Transfektion einer pflanzlichen Zellkultur herangezogen werden. Von den Flüssigkulturen wurden für die langfristige Lagerung ein Glycerin-Stock angefertigt, indem 0,5ml Bakteriensuspension mit 0,5ml Glycerin in einem 1,5ml Reaktionsgefäß intensiv vermischt und anschließend bei -80°C eingefroren wurden.

2. Material und Methoden

Tab. 2.12. YEP-Flüssigmedium

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM

Tab. 2.13. YEP-Selektionsmedium

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM
Gentamycin	25µg/ml
Rifampicin	10µg/ml
Kanamycin	50µg/ml

Tab. 2.14. YEP-Selektionsagar

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM
Agar Agar	1,5%
Gentamycin	25µg/ml
Rifampicin	10µg/ml
Kanamycin	50µg/ml

2.2.2.2. Infiltration von Agrobakterien in *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana Mesophyllzellen wurden durch die Agro-Infiltrationsmethode transformiert, wie bei Romeis *et al.* (2001) beschrieben. Der *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-Stamm mit dem gewünschten pMDC32 Plasmid und der

2. Material und Methoden

GV3101 Stamm mit der kodierenden Sequenz des "soil-borne wheat mosaic virus" 19K-Gens (einem Suppressor des posttranskriptionalen "Gensilencing", Liu et al., 2002) wurden für die transiente Transformation der Tabakblätter verwendet. Die Agrobakterien GV3101 beinhalten das virulenz Helferplasmid pCH32 (Hamilton *et al.*, 1996). Die Agrobakterien wurden bei 28°C in 15 ml YEP-Medium mit 0.5% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% Saccharose, 50 mM MgSO₄ und 50 mg/ml⁻¹ Kanamycin inkubiert. *Agrobacterium* Kulturen wurden auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 gebracht um toxische Nebeneffekte zu vermeiden (Voinnet *et al.*, 2000). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10min bei Raumtemperatur sedimentiert und in 5ml Agromixpuffer (10 mM MES (pH5.8), 10 mM MgCl₂ und 150 µM Acetosyringone) resuspendiert. Die Zellen wurden in dem Agromixpuffer für 2 Stunden in der Dunkelheit inkubiert. Vor der Infiltration wurden 1ml der Agrobakterien mit der kodierenden Sequenz des 19K Gens zu den 5ml der Agrobakterien hinzugefügt und mit Agromixpuffer auf 15ml aufgefüllt. Die Bakterienlösung wurden mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseite der Tabakblätter infiltriert. Nach 3-10 Tagen konnten die so exprimierten Proteine einer weiterführenden Analyse zugeführt werden.

2.2.2.3. Aufreinigung von pflanzlichen Proteinen

Um die Proteine aus Pflanzen zu isolieren, wurde 1g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Das Pulver wurde in 1ml Cold-H Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und mittels eines Glas-Potters auf Eis homogenisiert. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1000g und 4°C pelletiert. Aus dem Überstand konnte nun die mikrosomale Fraktion isoliert werden

Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100.000g und 4°C für 1 Stunde in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die so pelletierte mikrosomale Fraktion wurde entweder in 0,5ml Detergenz-Extraktions-Puffer (s. Anhang) oder in 0,5ml 10mM Hepes-KOH (pH7) mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt (s. Kapitel 2.3.1.) und die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

2. Material und Methoden

Tab. 2.24. Cold-H Puffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
Hepes	50mM
Saccharose	250mM
EDTA	1mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7 eingestellt. Vor dem Gebrauch wurden 1ml Cold-H Puffer mit 143 μ l 7x-Protease-Inhibitor-Stock-Lösung (Roche Diagnostics GmbH) hinzugefügt. Die Lagerung von Cold-H Puffer fand bei 4°C statt.

Tab.2.25. TE-Puffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
1M Tris-HCl pH 7,8	40ml \rightarrow 100mM
0,5M EDTA pH 8,0	0,8ml \rightarrow 1mM
ddH ₂ O	add. 400ml

Vor dem Gebrauch wurden 1ml TE-Puffer mit 143 μ l 7x-Protease-Inhibitor-Stock-Lösung (Roche Diagnostics GmbH) hinzugefügt. Die Lagerung von TE-Puffer fand bei 4°C statt.

2.3. Proteinanalytik

2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Roti[®]-Nanoquant beruht auf einer modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Als Arbeitslösung wurden 10ml des 5x Roti[®]-Nanoquant Konzentrat (Roth) mit 40ml ddH₂O vermischt. Eine definierte Konzentrationsreihe von BSA in ddH₂O diente als Proteinstandard. Diese wurde bei 450nm und 590nm photometrisch vermessen und es wurde der Quotient von OD₅₉₀/OD₄₅₀ gebildet. Zur Bildung einer Eichgeraden wurden diese Quotienten gegen die dazugehörigen BSA-Konzentrationen aufgetragen (s. Anhang). Durch die

2. Material und Methoden

Ermittlung der Steigung der Eichgeraden und ihres Schnittpunktes mit der Y-Achse konnte folgende Formel gebildet werden:

$$\text{Proteinkonzentration in } \mu\text{g/ml} = \frac{(\text{OD}_{590} / \text{OD}_{450} - \text{Y-Achsenschnittpunkt})}{\text{Steigung der Eichgerade}}$$

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden 800 μ l der Roti[®]-Nanoquant-Arbeitslösung in Plastikküvetten pipettiert und mit 2 μ l der Proteinprobe und 198 μ l ddH₂O vermengt. Nun wurden die Extinktionen der Proben bei 450nm und bei 590nm photometrisch gemessen und es wurde der Quotient von OD₅₉₀/OD₄₅₀ gebildet. Man konnte die Konzentration von Proteinen in der Probe an der Eichgerade ablesen oder durch die oben gezeigte Formel berechnen, wobei aber etwaige Vorverdünnungen der Probe mit einberechnet werden müssen.

2.3.2. SDS-Page

Die Größenfraktionierung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). SDS, eine negativ geladene Detergenz, bindet dabei an ca. jeden zweiten Aminosäurerest eines Proteins und so entsteht eine stark negative Ladung, die der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Da SDS an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle bindet, entfalten sich diese zu gestreckten Polypeptidketten und werden aus Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden entlassen und somit frei lösbar. SDS zerstört fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in den nativen Proteinen. Zur Reduktion der kovalenten Disulfidbrücken können die Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol oder DTT verwendet werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld ist abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung des Proteins und dem Reibungskoeffizienten, der von der mittleren Porengröße des Gels und der Proteingröße abhängt.

Bei den Polyacrylamidgelen wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit H₂O-gesättigten Isobutanol überschichtet. Dabei wurden bei geringerer Proteingröße höhere Acrylamid Konzentrationen verwendet. Auf das polymerisierte Trenngel wurde nun das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Das fertige Gel wurde nun in eine Elektrophoresekammer mit SDS-Elektrophoresepuffer gestellt. Je nach Größe der Geltaschen wurden 20-40 μ l Proteinlösung mit 6x SDS Probenpuffer versetzt und für 6 min bei 80°C gekocht und danach in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese wurde

2. Material und Methoden

mit 10mA gestartet. Sobald die Bromphenolblaubande des Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 20mA erhöht.

Tab. 2.26. Pipetierschema für Trenngel (10ml)

<u>Agens</u>	<u>Menge in für unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen</u>				
	8%	10%	12%	15%	20%
4x Tris-Cl/SDS, pH8,8 (1,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
H ₂ O	5,4ml	4,9ml	4,4ml	3,65ml	2,4ml
40% Acrylamid	2,0ml	2,5ml	3,0ml	3,75ml	5,0ml
10% Ammoniumpersulfat	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
TEMED	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl

Tab. 2.27. Pipetierschema für Sammelgel (10ml)

<u>Agens</u>	<u>Volumen</u>
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	2,5ml
H ₂ O	6,6ml
40% Acrylamid	0,8ml
10% Ammoniumpersulfat	100µl
TEMED	10µl

Tab. 2.28. 5x SDS Elektrophorese-Puffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
Tris	0,125M
Glycin	0,96M
SDS	0,5%
H ₂ O	add. 1000ml

Der pH-Wert des Puffers sollte bei 8,3 liegen. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert und konnte bis zu einen Monat verwendet werden.

2. Material und Methoden

Tab. 2.29. 6x SDS-Probenpuffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	7ml
Glycerol	24%
SDS	8%
DTT	0,2M
Bromphenolblau	0,012%
H ₂ O	add. 10ml

Der 6x SDS-Probenpuffer wurde in 0,5ml Aliquots bei -20°C gelagert.

2.3.3. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an die Elektrophorese konnten die Proteingele in Coomassielösung (Sigma; 0,006% Brilliant Blue R-250 in 10% Essigsäure) für 15 min bei Raumtemperatur unter Schwenken gefärbt werden. Coomassie bindet dabei unspezifisch an die Proteine und färbt diese blau. Die überschüssige Farbe in den Gelen wurde durch Erhitzen in ddH₂O für 5 min in der Mikrowelle bei 750 Watt entfernt. Nun wurden die Gele auf ein Whatman Papier gelegt und mit Cellophanfolie bedeckt und unter Vakuum auf einer Wärmeplatte für 1 Stunde getrocknet. So konnten die Gele langfristig haltbar gemacht werden.

2.3.4. Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese aus dem Gel auf eine Hybond-P PVDF-Membran (Amersham Biosciences) durch Elektro-Transfer bei 70 mA für 2h transferiert. Dazu wurden zuerst drei mit Transferpuffer getränkte Whatman Papiere luftblasenfrei auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Nun folgte die PVDF-Membran, welche vorher zuerst mit Methanol getränkt und mit H₂O für 5 min gewaschen und anschließend für 20 min in Transferpuffer inkubiert wurde. Als nächstes wurde das für 20 min in Transferpuffer inkubierte Proteingel auf die Membran gelegt. Das Gel wurde nun wiederum mit drei mit Transferpuffer getränkte

2. Material und Methoden

Whatman Papieren bedeckt. Die Luftblasen wurden vorsichtig mit einem 15ml Reaktionsgefäß ohne Deckel herausgedrückt. Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers diente der prestained-Proteinmarker (Invitrogen) zur Molekulargewichtsbestimmung oder die reversible Färbung der PVDF-Membran durch Ponceau (Serva; 0,5g Ponceau in 1ml Eisessig und 99ml H₂O). Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver in TBST (1 x TBS; 0,1% Tween 20) oder nur in TBST (für die colorimetrische Detektion) oder in TBST und 0,2% I-Block (Applied Biosystems; für die Detektion der Lumineszenz) geblockt. Im Anschluss daran wurden die primären Antikörper 1:5000 in TBST verdünnt zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10min in TBST wurden die entsprechenden sekundären Antikörper 1:30.000 in TBST verdünnt zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 10min in TBST gewaschen. Die Detektion der mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper erfolgte mit NBT-BCIP (Sigma) oder CDP-Star (Applied Biosystems). Dabei wurde für einen Nachweis mit NBT/BCIP die Membran zuerst für 5min in AP-Puffer inkubiert. Anschließend wurde 0,5ml NBT/BCIP-Lösung auf die Membran gegeben. Nach dem sichtbar werden der Banden wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt, die Membran unter fließendem Wasser gewaschen und bei 60°C getrocknet. Für den Nachweis mit CDP-Star wurde die Membran für 5min in Assay B-Puffer inkubiert und anschließend mit 0,5ml CDP-Star-Lösung (10µl CDP-Star/1ml Assay B-Puffer) überschichtet. Die mit Plastikfolie bedeckte Membran wurde nun für die Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak) verwendet. Die Belichtungszeiten schwankten dabei zwischen 10sec und 5min, wobei standardmäßig mit einer Belichtungszeit von einer Minute begonnen wurde. Der belichtete Film wurde für 2 min entwickelt und nach einem Waschschrift in einem Wasserbad für 2 min fixiert. Anschließend wurde der Film bei 60°C getrocknet.

Tab. 2.30. Transferpuffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
Tris	3g
Glycin	14,4g
Methanol	150ml
H ₂ O	add. 1l

2. Material und Methoden

Tab. 2.31. AP-Puffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
Tris	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	5mM

Der pH-Wert des AP-Puffers wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

Tab. 2.32: Assay B-Puffer

<u>Agens</u>	<u>Menge</u>
Diethanolamin	672µl
MgCl ₂	1mM
H ₂ O	add. 70ml

Der pH-Wert des Assay B-Puffers wurde mit HCl auf 10 eingestellt.

2.3.5. Affinitätsaufreinigung von Proteinen

Isolierte pGex-TT Vektoren mit der gewünschten GST::Insert -Fusion wurden in BL21-DE3-plys Zellen transformiert. Anschließend wurde eine 10ml Vorkultur in LB-Amp/Chloramp bei 37°C über Nacht hochgezogen. Diese Vorkultur wurde in 500ml LB-Amp bei 37°C zu einer optische Dichte 0,5-0,7 wachsen gelassen. Die Proteinexpression wurde mit 1mM IPTG für 2h bei 37°C induziert und danach wurden die Zellen für 15min bei 5000g und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40ml Resuspend-Buffer (50mM Tris pH8, 100-300mM NaCl; 1mM EDTA; +10µg/ml Leu; 10µg/ml Apo; 1mM Benz; 1mM PMSF; 10mM B-Mercapto) resuspendiert und die Zellen wurden durch 5x30sec Ultraschall auf Eis mit je 5x30sec Pause lysiert. Anschließend wurde die Zelldebris für 30min bei 27000g und 4°C Debris pelletiert. Der Überstand wurde für 1h bei 4°C mit 0,5ml Bed-Vol GSH-Sepharose im Überkopfschüttler inkubiert.

Für die Elution der GST::Protein-Fragmente wurde die Sepharose für 3min bei 1000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10min in 10ml

2. Material und Methoden

Resuspend-Buffer gewaschen. Dieser Schritt wurde 4mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet mit 1ml 20mM GSH in 50mM Tris pH8 für 10 min eluiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der Elution in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde 3x wiederholt.

Für die Abspaltung des GST-Tags vom Protein wurde eine Thrombinspaltung auf der Sepharose-Matrix durchgeführt. Dazu wurde die Sepharose 2mal mit 10ml Resuspend-Buffer und anschließend 4mal mit je 10ml RICK-Buffer (25mM HEPES pH8; 25mM b-Glycerophosphat; 10mM MgCl₂) gewaschen um Proteaseinhibitoren und EDTA zu entfernen. Die Matrix wurde mit 5U Thrombin in 1ml RICK für 1h bei RT geschüttelt und anschließend bei 1000g für 3min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gespaltenen Proteinen wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Spaltungsschritt wurde 3mal wiederholt.

2.3.6. Pull-down

Für die „Pull-down“-Analyse wurden 20µg eluierten GST::TPK1WT bzw. GST::TPK1WT+P bzw. GST::TPK1SA bzw. BSA mit 0,5µg gespaltenen GRF1 bzw. GRF6 auf 50µl Bed-Vol GSH-Sepharose in 1ml Pulldown-Buffer (10mM HEPES pH7,6; 150mM NaCl, 0,1% NP-40; 1mM PMSF; 1mM Benzamidin; 10µg/ml Leupeptin) für 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde für 3min bei 1000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 5mal in 1ml Pulldown-Buffer 10min bei 4°C im Überkopfschüttler gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100µl 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10min bei 80°C gekocht und anschließend für 5min bei 2000g zentrifugiert. Je 20µl des Überstands wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und anschließend geblottet. Die interagierenden 14-3-3 Proteine wurden mit einem Anti-14-3-3-Antikörper (St. Cruz Biotech. Inc, Santa Cruz, USA) nachgewiesen.

2.3.7. „surface plasmon resonance“

Um die Interaktion zwischen der putativen 14-3-3-Bindungsstelle von TPK1 und den GRF-Proteinen zu quantifizieren wurde die „surface plasmon resonance“ (SPR) Technik angewendet. Die Biosensor Messung wurde mit einem „BIAcore-X“- und

2. Material und Methoden

„BIAcore-J“-System (Biacore AB, Uppsala, Sweden) bei 25°C durchgeführt. CM5 Biosensor Chips wurden mit Streptavidin (100 µg/ml in 10 mM Na-acetate Puffer, pH 4.5) beladen durch kovalente Derivatisierung nach den Angaben des Herstellers. Nach Behandlung der Chips mit Ethanolamine-HCl (1 M, pH 8.5) wurde das biotinylierte TPK1 Fragment (20µM) im Biosensorpuffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.01% Nonidet P-40) mit einer Flussrate von 5µl/min injiziert. Das phosphorylierte Kanalfragment (RRLRRSRphosphoSAPRGDCMYNDDVGSGS-biocytidine-amide) wurde in Zelle 1 (Fc1) immobilisiert und das nichtphosphorylierte Fragment in Zelle 2 (Fc2). Aufgereinigte 14-3-3-Proteine (GRF1 und GRF6) wurden in ansteigenden Konzentrationen (50-400nM) mit einer Flussrate von 10µl/min injiziert. Die Werte für die unspezifische Bindung an das nichtphosphorylierte Fragment wurden in der Referenzzelle 2 (Fc2) gemessen. Die Bestimmung der kinetischen Parameter der 14-3-3-Interaktion an das TPK1-Fragment wurde durch nichtlineares „Fitting“ der Bindungsdaten mit der „BiaEvaluation-2.1-analysis-software“ durchgeführt.

Die apparenten Assoziations- (k_a) und Dissoziationskonstanten (k_d) wurden durch die differentiellen Bindungskurven (Fc2-Fc1) evaluiert. Die Affinitätskonstante (K_D) wurde durch die Gleichung $K_D = k_d / k_a$ kalkuliert.

2.3.8. Proteinphosphorylierung

Für die *in-vitro* Phosphorylierung von TPK1 wurden 20µg TPK1 mit 0,1µg PKB bzw. affinitätsaufgereinigten Kinasen der CDPK-Familie, 10mM Mg-ATP und 200µl Phosphorylierungs-Buffer (50mM HEPES pH7,85; 10mM MgCl₂, 0,5mM DTT) für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch Westernblot mittels eines phosphospezifischen Antikörpers (136BAD, Acris, Hiddenhausen, Germany) überprüft.

2.3.9. Proteindephosphorylierung

Für den Phosphataseassay wurden phosphorylierte GST::TPK1-N-Termini 2 Tage gegen Phosphatasepuffer (20mM Hepes pH 7,8; 1mM DTT, 5mM MnCl₂; 5mM MgCl₂) dialysiert. 20µg der Kanalfragmente wurden mit 5µg löslichen bzw. mikrosomalen *Arabidopsis thaliana* Blattproteinextrakten versetzt, welche ebenfalls

2. Material und Methoden

gegen Phosphatasepuffer dialysiert wurden. Um Calcium abzupuffern wurde zu diesem Ansatz 10mM EGTA hinzugefügt und im Proteinextrakt vorhandene Kinasen wurden mit 200nM K252b geblockt. Der Ansatz wurde mit Phosphatasepuffer auf 100µl aufgefüllt. Um die Phosphatasefamilie zu bestimmen wurden noch unterschiedliche Konzentrationen am Phosphataseinhibitor Okadaic Acid beigemischt, wobei bei einer Endkonzentration von 10µM nur Phosphatasen der PP2C-Familie aktiv sein sollten, bei 100nM zusätzlich Phosphatasen der PP1-Familie und bei 1nM Phosphatasen der PP2A-Familie. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und je 20µl durch Westernblotanalyse auf Phosphorylierung von TPK1 überprüft.

2.3.10. Calcium-binding-assay

Je 15µg rekombinante GST-Fusionen der N- und C-Termini von TPK1, BSA als Negativkontrolle und Calmodulin (Sigma) als Positivkontrolle wurden auf eine PVDF-Membran gedottet. Die Membran wurde über Nacht in 10mM Imidazol/HCl (pH6,8), 60mM KCl und 5mM MgCl₂ inkubiert. Die Blots wurden für 30min in frischen Puffer mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen aus einer Stocklösung von 100 µM CaCl₂ plus 2 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ (Amersham) inkubiert. Danach wurden die Membranen mit 70%igen Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und für die Belichtung eines Röntgenfilmes verwendet. Für die Quantifizierung wurde die Intensität mit einem Phosphoimager analysiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

Für die Analyse der Lokalisation von Proteinen innerhalb eines Organismus oder Gewebes und für die subzelluläre Lokalisierung innerhalb einer Zelle kann man das zu untersuchende Protein mit Markerproteinen wie GFP markieren und sichtbar machen. Durch die Markierung ist die Lokalisation von Proteinen optisch zugänglich.

2.4.1. "Particle-inflow-gun" PIG

Die Technik der „particle inflow gun“ basiert auf der Beschleunigung von Gold- oder Wolframpartikeln, um biologisch aktive DNA (Gene) in Pflanzenzellen einzubringen. Die Methode wurde bereits detailliert beschrieben, nachdem Klein et al. (1989) die

2. Material und Methoden

Beobachtung gemacht hatten, dass Wolframpartikel dazu benutzt werden können, DNA-Makromoleküle in Epidermiszellen der Zwiebel einzuschleusen. Diese waren infolgedessen in der Lage, Proteine, die durch die eingebrachte DNA codiert wurden, transient zu exprimieren. Christou und McCabe (Christou et al., 1988) demonstrierten, dass diese Technik auch dazu verwendet werden kann, stabil transformierte Zelllinien zu erzeugen (in der Biotechnologie kommt diese Methode häufig zum Einsatz, um Resistenzen in Pflanzen zu etablieren).

50µg Wolframpartikel wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup eingewogen und 500 µl EtOH (100 %) dazugegeben und gevortext um die Partikel zu sterilisieren. Anschließend wurde 2min zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und das Wolframpellet bei geöffneten Reaktionsgefäß getrocknet. Danach wurde soviel Wasser hinzugefügt, dass eine Konzentration von 50 µg/µl erreicht wurde.

Die DNA-Proben wurden im Vorfeld auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. 100µl des Wolframstocks wurden in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und 20µl der vorbereiteten Plasmid-DNA hinzugefügt; für „double-impact“-Versuche mit anschließender Kolokalisation wurden jeweils 10µl von 2 unterschiedlichen Plasmiden hinzugefügt. Anschließend wurden unter ständigem Schütteln je 100 µl 2,5M CaCl₂ ,40µl Spermidin-Lösung (0,1M in Wasser) dazu pipettiert und 3 min gevortext. Die Lösung wurde mit 200 µl kalten EtOH [100 %] versetzt, gevortext und dann weitere 400µl EtOH [100 %] zugegeben. Die DNA wurde 30 min bei –20°C gefällt, kurz zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die DNA-beschichteten Wolframpartikel wurden in 100 µl Wasser resuspendiert.

In der getrockneten Probenkartusche befindet sich ein Gitter, auf das die vor dem Auftragen gründlich gevortexte Wolfram-Suspension aufgetropft wurde (10 µl). Nach Einsetzen der Kartusche und Positionierung der Probe wurde der Heliumdruck auf 8-9 bar eingeregelt.

Nun konnte in der Probenkammer ein Unterdruck von –0,8 bar per Vakuumpumpe erzeugt werden.

Durch Drücken des Startknopfes konnte nun der erste Schuss ausgelöst werden.

Die beschossenen Proben wurden im weiteren Verlauf bei Raumtemperatur auf Agarplatten (2% Agar in Wasser, frisch gegossen) inkubiert und am darauf folgenden Tag hinsichtlich der Expression der Reportergene untersucht.

2. Material und Methoden

2.4.2. Konvokales Laser-Scanning-Mikroskop

GFP wurde Anfang der 60er Jahre erstmals beschrieben und kommt als Partnerprotein von Aequorin in der Qualle *Aequorea victoria* vor (Shimomura et al, 1962). Dieses Protein emittiert nach Anregung mit blauem Licht (zwei Absorptionsmaxima: 396 bzw. 475nm) intensiv grünes Licht der Wellenlänge 508nm. Das Chromophor von GFP (*p*-hydroxy-benzylidenimidazolinon) wird posttranslational aus einer Seitenkette des Proteins gebildet, die 3 AS lang ist. Diese Seitenkette kann durch Mutationen modifiziert werden, um die Absorptions- und Emissionseigenschaften des Reporterproteins zu verändern.

Neben GFP existieren mittlerweile die unterschiedlichsten fluoreszierenden Proteine die sich in Anregung und Emission unterscheiden. So wird unter anderem häufig das rot fluoreszierende Protein mRFP1 verwendet (abgeleitet aus einem Protein der Koralle *Discosoma*). Dieses Protein wird bei ca. 580nm angeregt und emittiert rotes Licht bei ca. 615 nm.

Beschossene Zwiebelepidermen bzw. infiltrierte Tabakblätter wurden auf Objektträgern fixiert und die GFP/RFP Fluoreszenz mit einem konvokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 5 Pascal Carl Zeiss Jena GmbH., Jena, Germany) aufgenommen. Angeregt wurde mit einem Argonlaser (Lasos RMC 7812Z) bei 488nm für GFP und 543nm für RFP. GFP-Emission wurde zwischen 505 und 530nm detektiert und RFP-Emission zwischen 580 und 650nm. Chlorophyllhintergrundfluoreszenz wurde über 635nm aufgenommen. Die Bildanalyse wurde mit der Zeiss AxioVision-Software durchgeführt.

2.5. Keimungs-Assay

In einem Keimungsassay wurde überprüft, welchen Einfluss Salzstress, Kaliummangel bzw. die Kombination aus beiden auf die Keimung von Wildtyp, TPK1 und CPK3-knockout-Pflanzen hat. Stratifizierte *Arabidopsis*-Samen der entsprechenden Linien wurden sterilisiert und auf Agarplatten mit unterschiedlichen Stressfaktoren verteilt (siehe unten). Über 5 Tage hinweg wurde jeden Tag die Anzahl der gekeimten Samen bzw. differenzierten Keimlinge unter dem Stereomikroskop bestimmt und die jeweiligen Durchschnittswerte für den jeweiligen

2. Material und Methoden

Tag auf die Keimung auf MS-Platten normalisiert, welche als 100% gesetzt wurde. Verwendung fanden folgende Agarmedien:

½ MS

½ MS +50mM NaCl

½ MS + 150mM NaCl

½ MS mit 50µM KCl

½ MS mit 50µM KCl +50mM NaCl

½ MS mit 50µM KCl +150mM NaCl

2.6. Stresstest an adulten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Hydrokulturpflanzen wurden für 2 Stunden unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Verwendung fanden dabei *Arabidopsis thaliana*-Col0-Wildtyppflanzen als Referenz und tpk1.3-knockout-Pflanzen. Die Pflanzen wurden 2 Stunden lang in eine Lösung aus 150mM KCl in ½ MS, 150mM NaCl in ½ MS, 150mM Sorbitol in ½ MS, ½ MS bzw. H₂O gestellt. Anschließend wurden mikrosomale Fraktionen aus den Blättern dieser Pflanzen hergestellt und die TPK1-Phosphorylierung mittels Westernblot überprüft.

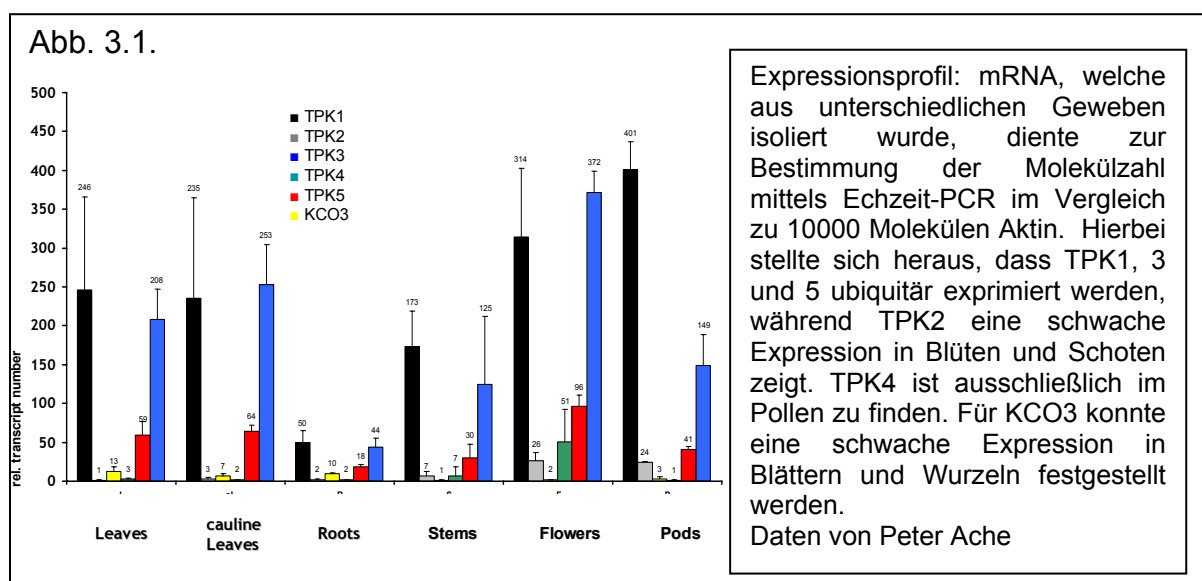
3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Targeting und Lokalisation der TPK-Familie

Untersuchungen zur Funktion und physiologischer Relevanz neu entdeckter Proteine beginnen häufig mit der Lokalisation dieser Proteine. Dabei unterscheidet man zwischen der gewebsspezifischen Lokalisation und der subzellulären Lokalisation. Bei ersterer kommt es auf das raumzeitliche Expressionsmuster des Proteins an, während man bei letzterer die Lokalisation des Proteins in unterschiedlichen Kompartimenten bzw. Membransystemen innerhalb der Zelle untersucht. Häufig werden solche Studien durch die Expression speziell markierter Proteine durchgeführt. Dazu müssen Pflanzen bzw. Zellen mit entsprechenden DNA-Konstrukten transformiert werden.

Bei der Familie der Tandem-Poren-Kaliumkanälen (TPK) handelt es sich um eine bisher weniger intensiv erforschte Klasse der pflanzlichen Kaliumkanäle. Im Gegensatz zu den *Shaker*-Kanälen war sehr wenig über Targeting, Regulation und Funktion der TPKs bekannt. Initiale Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (siehe 2.1.12.) wie auch Promotor-GUS-Studien (Czempinski et al., 2002) zeigten, dass die TPKs 1,3,5 ubiquitär exprimiert werden, während TPK2 in Blüten und Schoten und TPK4 im Pollen zu finden ist (Abb. 3.1.).



Über die subzelluläre Lokalisation dieser Kanäle war allerdings weitgehend nichts bekannt, mit Ausnahme der Lokalisation von TPK1 im Tonoplasten (Czempinski et

3. Ergebnisse

al., 2002). Aus diesem Grund wurden Kanal::GFP-Fusionskonstrukte in den Vektor pPily kloniert und mittels der „particle-inflow-gun“ in *Allium cepa* bzw. *Vicia faba* Epidermisstreifen übertragen, um nähere Erkenntnisse über die Lokalisation der TPKs innerhalb der Zelle zu erhalten (siehe 3.1.2.).

3.1.1. Klonierung und Fusion der TPKs mit GFP sowie Mutagenesen bzw. Deletionen

Aufgrund der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms sind die Sequenzen aller 5 Mitglieder der TPK-Familie bekannt.

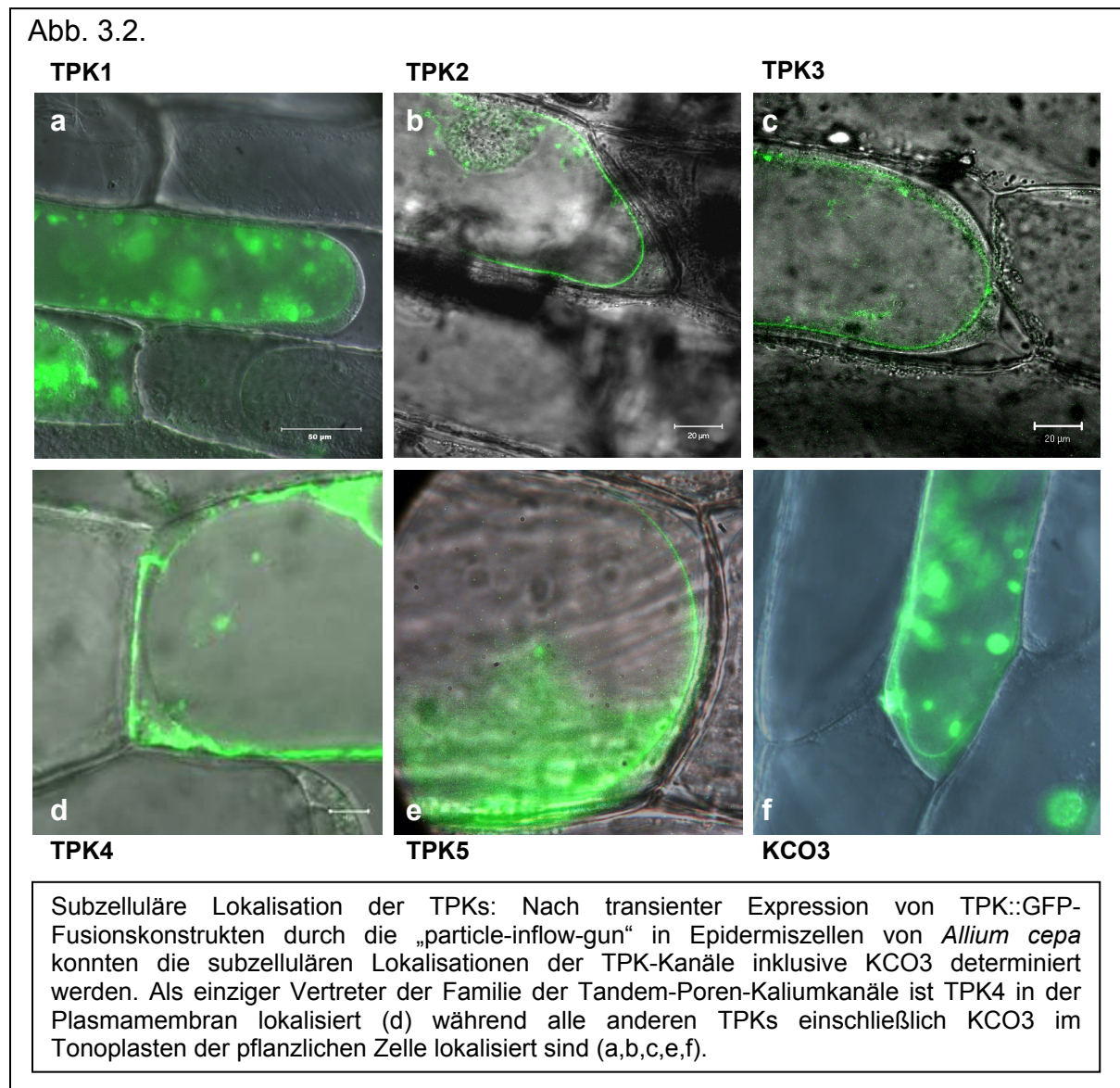
Zunächst wurden die TPK-Sequenzen mittels PCR (siehe 2.1.1., 7.3.2. und 7.3.3.) aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert und in den Vektor pcR11-Topo kloniert und das Stop-Codon durch „site-directed-mutagenesis“ deletiert. Die dabei eingeführten Schnittstellen BamHI und Eco47III dienten im nächsten Schritt zu Fusion der TPK-Sequenzen mit dem 5'-Ende von mGFP4 bzw. mRFP1 im Vektor pPily unter Kontrolle eines 2x35S Promotors (siehe 2.1.2. bis 2.1.7.). In ähnlicher Weise wurden Chimären und Deletionen dieser Konstrukte hergestellt (siehe 2.1.13.). Durch Mutagenesen wurden gezielt einzelne Basenpaare ausgetauscht, um eine andere Aminosäureabfolge in den mutierten Bereichen zu erhalten. Diese Vektoren wurden mittels der Helium getriebenen „particle-inflow-gun“ in Epidermiszellen von *Allium cepa* eingebracht (siehe 2.4.1.). Die transiente Expression erfolgte über Nacht auf Agarplatten mit ½MS. Die subzelluläre Lokalisation konnte am darauf folgenden Tag mit Hilfe des konvokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) beobachtet werden (siehe 2.4.2.).

3.1.2. Subzelluläre Lokalisation der Wildtyp TPKs

Nach der Bombardierung von Zwiebelepidermiszellen mit Wildtyp-Kanal::GFP-Fusionskonstrukten konnte nach 24 Stunden unter dem Laser-Scanning-Mikroskop die subzelluläre Lokalisation der markierten Proteine beobachtet werden. Die TPKs 1,2,3,5, genauso wie der K_{ir}-ähnliche KCO3 Kanal, konnten im Tonoplasten und in vakuolär-lysosomalen Vesikeln lokalisiert werden, während TPK4 in der Plasmamembran und Kompartimenten des sekretorischen „Pathways“ lokalisiert ist (siehe Abb. 3.2.). Dies steht im Gegensatz zu der Lokalisation der tierischen Tandem-Poren-Kaliumkanäle, die allesamt in der Plasmamembran zu finden sind.

3. Ergebnisse

Die vorherrschende Lokalisierung dieser Kanäle im Tonoplasten deutet auf eine wichtige Rolle dieser Kanäle in der vakuolären Kalium-Homeostase der Pflanze hin. Nachdem für die TPK-Familie eine dimere Struktur vorhergesagt wird, kann darüber spekuliert werden, ob es sich bei diesen Kanälen im Tonoplasten um Homo- bzw. Heterodimere handelt, wenn gleich neueste Studien (Völker et al., 2006) darauf hinweisen, dass die Kanäle als Homomere vorliegen.

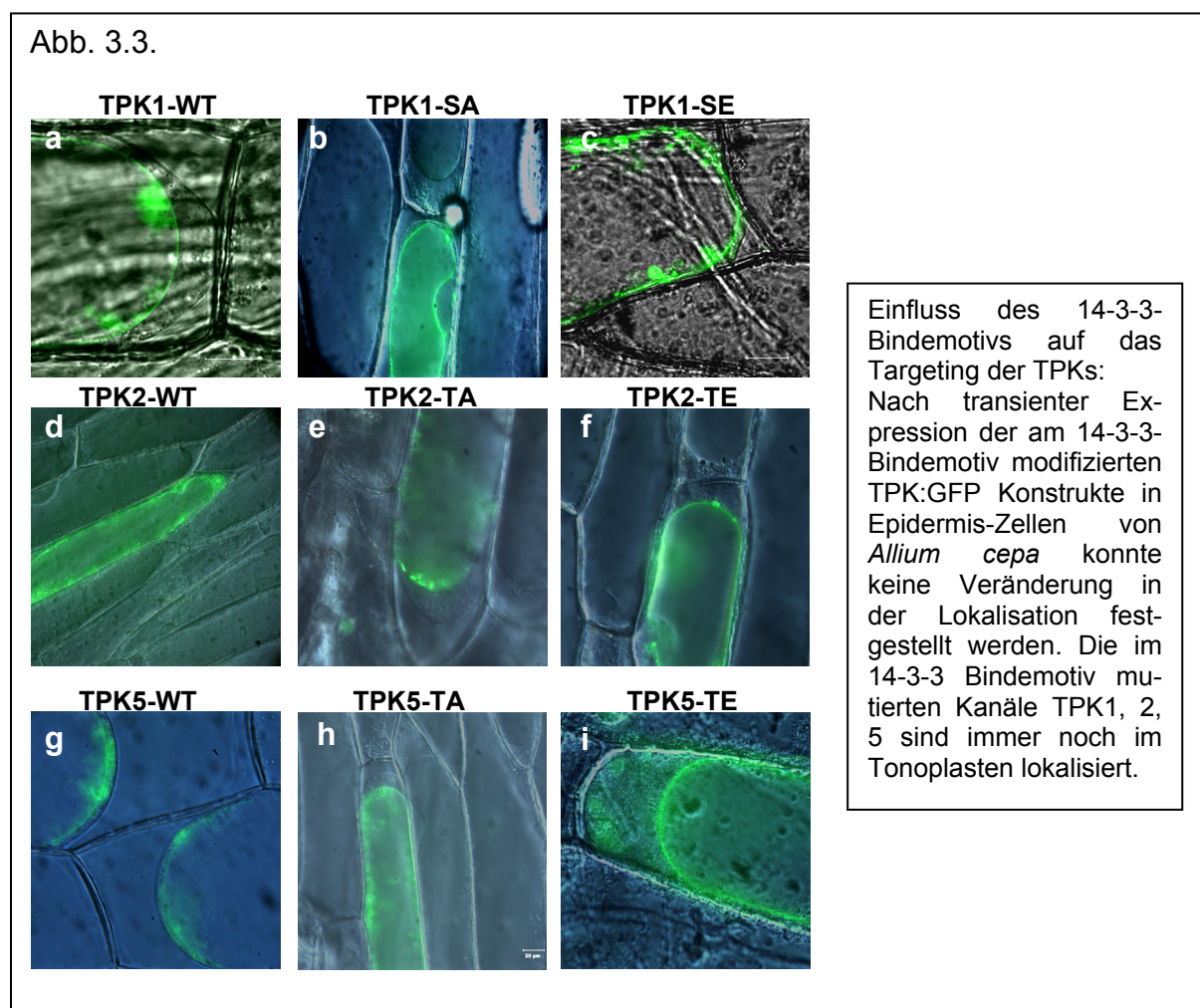


3.1.3. Einfluss des 14-3-3-Bindemotivs auf das Targeting

Im N-Terminus der im Tonoplasten lokalisierten Kanäle befindet sich ein putatives Typ1 14-3-3-Bindemotiv. Es ist bekannt, dass 14-3-3-Proteine am Targeting und Assembly von einigen Proteinen beteiligt sind. Auch bei tierischen Tandem-Poren-

3. Ergebnisse

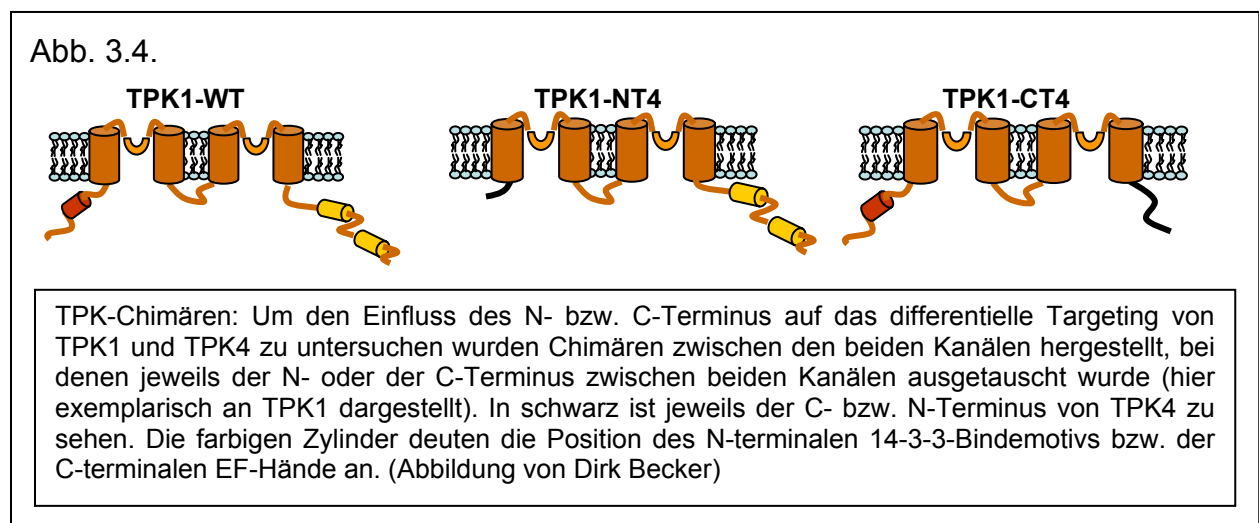
Kaliumkanälen wurde die 14-3-3-Interaktion in Zusammenhang mit dem Targeting dieser Kanäle gebracht. Unsere Experimente machen es aber unwahrscheinlich, dass dieses 14-3-3-Bindemotiv eine Rolle beim Targeting und Assembly der pflanzlichen TPK-Kanäle spielt. Durch den Austausch des Serins/Threonins (siehe 2.1.13.) im 14-3-3-Bindemotiv von TPK1, 2 und 5, welches für eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen phosphoryliert sein muss, mit Glutamat (täuscht möglicherweise eine Phosphorylierung vor) bzw. Alanin (lässt sich nicht phosphorylieren) und der damit einhergehenden putativen konstitutiven Aktivierung bzw. der Inhibierung der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen konnte keine Veränderung in der Lokalisation der Kanäle festgestellt werden. Trotz Mutationen im 14-3-3-Bindemotiv lokalisieren diese Kanäle immer noch in ihrer ursprünglichen Zielmembran, dem Tonoplasten (siehe Abb. 3.3.). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Gegensatz zu den tierischen Tandem-Poren-Kaliumkanälen, das 14-3-3-Bindemotiv für das Targeting der pflanzlichen Kanäle unerheblich ist.



3. Ergebnisse

3.1.4. C- und N-terminale Chimären und Einfluss dieser Proteindomänen auf das Targeting

Um das differentielle Targeting hinsichtlich Plasma- oder Vakuolenmembran zu untersuchen, wurden C- und N-terminale Chimären zwischen dem plasmamembranlokalisierten TPK4 und vakuolärlokalisierten TPK1 hergestellt (siehe 2.1.1.ff). Des Weiteren wurden am C-Terminus von TPK1 einige Aminosäuren entfernt, um deren Einfluss auf das Targeting zu untersuchen (siehe Abb. 3.4.).



Das Hinzufügen des N-Terminus (mit 14-3-3-Bindemotiv) von dem im Tonoplasten lokalisierten Kanal TPK1 an den in der Plasmamembran lokalisierten TPK4 ändert nichts am Targeting. TPK4-NT1 bleibt auch mit dem N-Terminus von TPK1 inklusive 14-3-3-Bindemotiv in der Peripherie der Zelle (siehe Abb. 3.5.b). Auch bei TPK1, mit dem N-Terminus von TPK4 und damit dem vollständigen Fehlen einer 14-3-3-Bindestelle, ändert sich nichts am ursprünglichen Targeting. TPK1-NT4 ist immer noch wie der Wildtypkanal im Tonoplasten lokalisiert (siehe Abb. 3.5.a).

Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass das 14-3-3-Bindemotiv bzw. der N-Terminus im Ganzen eine Rolle beim Targeting der TPK-Kanäle spielt. Auch wenn das 14-3-3 Bindemotiv komplett entfernt und der N-Terminus gegen den von TPK4 (ohne 14-3-3 Bindemotiv) ausgetauscht wird, bzw. wenn ein 14-3-3-Bindemotiv hinzugefügt wird, so ist immer noch keine Änderung der Lokalisation der TPKs zu beobachten.

Bei den letzten 19 Aminosäuren der C-Termini von den im Tonoplasten lokalisierten Kanälen (diese Sequenz fehlt bei TPK4) gibt es keine Unterschiede im Targeting.

3. Ergebnisse

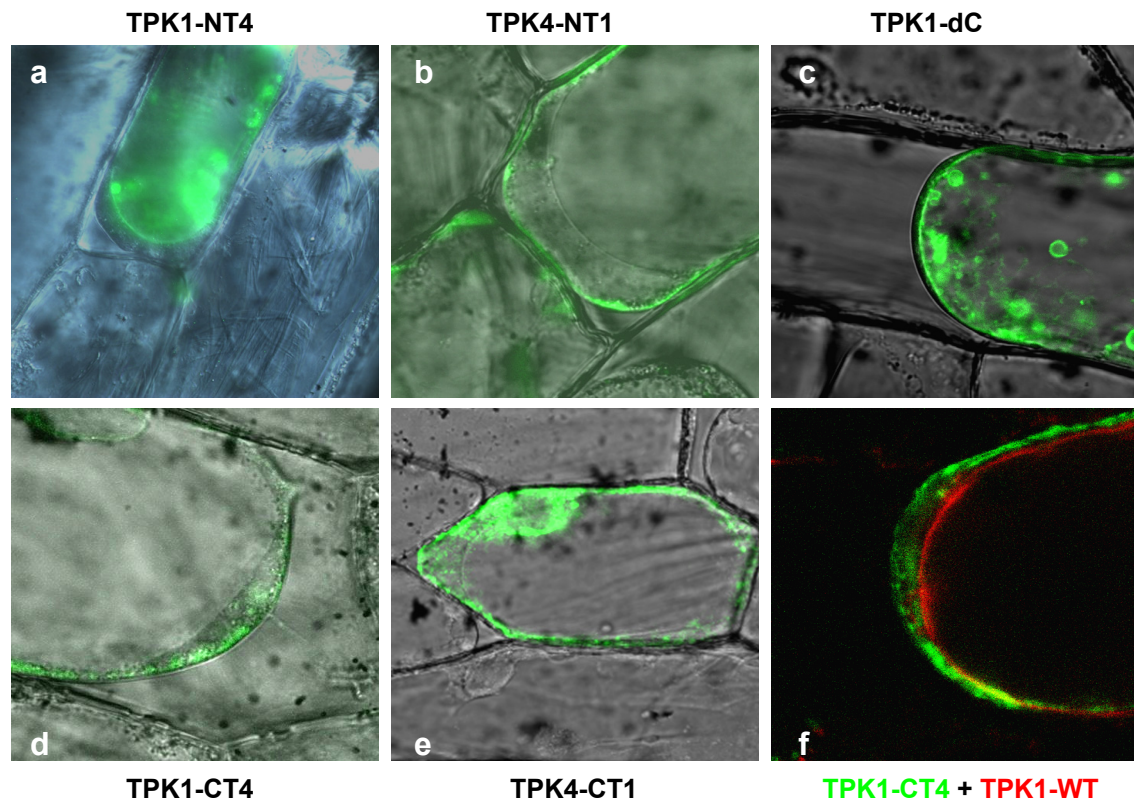
Der distale Bereich vom C-Terminus spielt also auch keine Rolle beim Targeting von TPK1. Auch mit dieser fehlenden Sequenz lokalisiert TPK1-dC immer noch im Tonoplasten (siehe Abb. 3.5.c).

Der Austausch des kompletten C-Terminus von TPK4 mit dem im Tonoplasten lokalisierten Kanal TPK1 ändert nicht das Targeting von TPK4. TPK4-CT1 bleibt auch mit diesem C-Terminus in der Peripherie der Zelle (siehe Abb. 3.5.e). Dieser chimäre TPK4-Kanal besitzt nun EF-Hände, die er normalerweise nicht hätte. Es scheint, als ob es weder im N-Terminus noch im C-Terminus von TPK1 eine Targeting-Sequenz gibt, welche in der Lage wäre, TPK4 von der Plasmamembran in den Tonoplasten zu lokalisieren.

Erst wenn man den C-Terminus von dem in der Plasmamembran lokalisierten TPK4 an TPK1 hängt, kann man Unterschiede im Targeting sehen. Der Kanal ist nun nicht mehr im Tonoplasten lokalisiert, sondern in der Peripherie der Zelle (siehe Abb. 3.5.e,f). Es ist wahrscheinlich, dass im C-Terminus von TPK4 ein Lokalisierungssignal für das Targeting existiert. Ob dieses Lokalisierungssignal von struktureller Natur ist oder ob es sich um eine bestimmte Erkennungssequenz handelt, ist bislang noch unbekannt. Es deutet einiges darauf hin, dass es sich um eine Kombination aus beiden handeln könnte. Im C-Terminus könnte auch die Assemblydomäne liegen, welche für den Zusammenbau der Kanaluntereinheiten verantwortlich ist. Der hierfür verantwortliche C-terminale Bereich wird derzeit weiter eingengt. Diese Arbeiten sind in Vorbereitung zur Publikation (Dunkel et al.)

3. Ergebnisse

Abb. 3.5.



Einfluss der N- und C-terminalen Domänen auf das Targeting der TPKs in chimären Konstrukten:

Der Austausch der N-Termini hat keinen Einfluss auf das Targeting der Kanäle. TPK1-NT4 lokalisiert immer noch in den Tonoplasten (a) und TPK4-NT1 ist immer noch in der Plasmamembran zu finden (b). Auch das Deletieren der letzten 19 Aminosäuren von TPK1 verändert das Targeting nicht (c). TPK1-dC bleibt im Tonoplasten. Auch mit dem C-Terminus von TPK1 erscheint TPK4 immer noch in der Peripherie der Zelle (e). Einzig bei TPK1-CT4 konnte eine Veränderung des Targetings beobachtet werden (d). TPK1-CT4 ist im Gegensatz zum rot dargestellten Wildtyp nicht mehr im Tonoplasten, sondern in der Peripherie der Zelle lokalisiert (f).

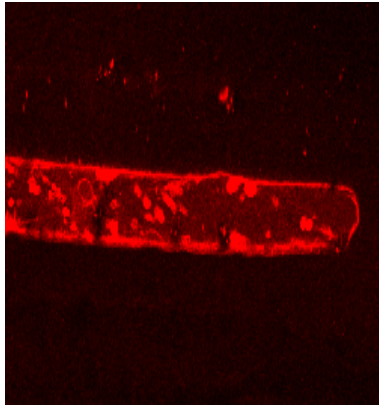
3.1.5. Koexpression von TPK1 und TPK3

Um zu überprüfen ob, es bei Koexpression von zwei im Tonoplasten lokalisierten TPKs durch etwaige gegenseitige Beeinflussung zu Änderungen im Targeting und der Expressionsstärke kommt, wurden die beiden unterschiedlich markierten Kanäle TPK1::mRFP1 und TPK3::mGFP4 in Epidermiszellen von *Allium cepa* transient exprimiert und die Expression und Lokalisation beider Kanäle mittels LSM analysiert (siehe 2.4.1. und 2.4.2.). Hierbei zeigte sich, dass die Koexpression beider Kanäle weder Einfluss auf das Targeting noch auf die Expressionsstärke hatte (siehe Abb. 3.6.).

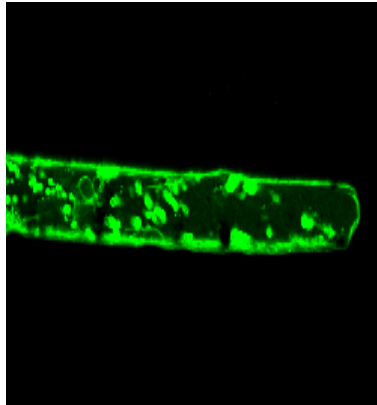
3. Ergebnisse

Abb. 3.6.

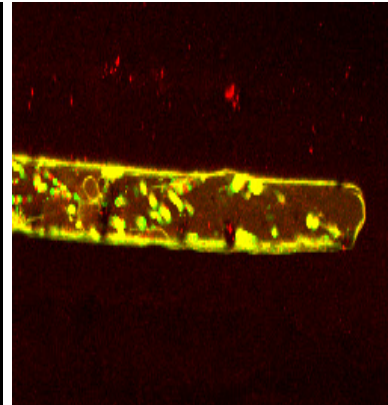
TPK1::mRFP1



TPK3::mGFP4



overlay



Nach der Expression von unterschiedlich markierten TPK1 und TPK3 Konstrukten konnte keine gegenseitige Einflussnahme der Kanäle auf die Lokalisation und Expressionsstärke festgestellt werden. Beide Kanäle sind innerhalb der Zelle immer noch bei gleicher Expressionsstärke im Tonoplasten und vakuolär-lysosomalen Vesikeln lokalisiert.

3.1.6. Zusammenfassung Targeting und Lokalisation der TPK-Familie

- Alle TPKs, bis auf TPK4, sind im Tonoplasten lokalisiert. TPK4 befindet sich in der Plasmamembran.
- Das 14-3-3-Bindemotiv bzw. der komplette N-Terminus spielt keine Rolle beim Targeting (und evtl. auch beim Assembly), da ein Austausch der N-Termini keinen Einfluss auf die Lokalisation hat.
- Im C-Terminus ist möglicherweise ein strukturelles Motiv bzw. eine Erkennungssequenz für das Targeting in unterschiedliche Zielmembranen lokalisiert. Eventuell ist hier auch eine Assemblydomäne für den Zusammenbau der unterschiedlichen Kanaluntereinheiten vorhanden.

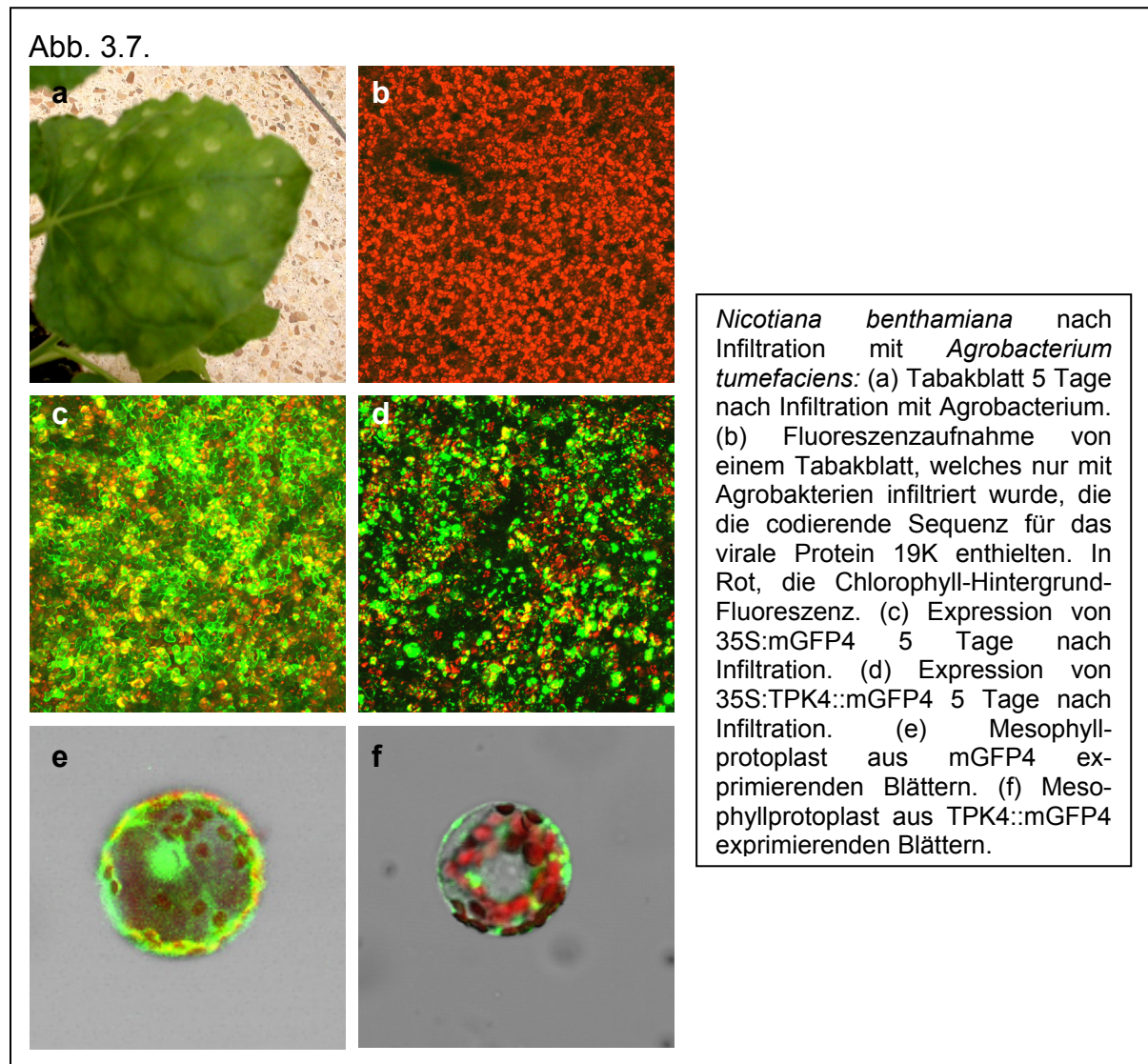
3.2. Transfektion von *Nicotiana benthamiana* durch Agro-Infiltration mit TPK4-Konstrukten

Um zu testen, ob TPK4 auch *in planta* die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie in Oocyten von *Xenopus laevis* aufweist, wurden TPK4::mGFP4 bzw. TPK4::V5 Fusionskonstrukte unter Kontrolle des Promotors 35S in den binären Vektor pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003) kloniert (siehe 2.1.1.ff). Nach Transformation dieser Plasmide in den Agrobakterienstamm GV3101 (siehe 2.2.2.1.),

3. Ergebnisse

wurden diese zusammen mit Agrobakterien, welche die kodierende Sequenz des viralen RNA-Silencing Supressor 19K enthielten, in die Interzellularräume von Blättern von *Nicotiana benthamiana* mit einer nadellosen Spritze infiltriert (siehe 2.2.2.2.). 4 Tage nach Infiltration waren an den Blättern Läsionen an den Aufsetzpunkten der Infiltrationsspritze zu beobachten (siehe Abb. 3.7.a). Mit Hilfe des LSM konnte nach Infiltration von 19K alleine nur die rote Chlorophyll-Hintergrundfluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.7.b). Nach Infiltration mit mGFP4 (Abb. 3.7.c) bzw. TPK4::mGFP4 (Abb. 3.7.d) war zusätzlich zur Chlorophyllfluoreszenz auch das zur Expression gebrachte GFP in den Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* zu beobachten (siehe 2.4.2.). Die Transformations-Effizienz betrug über 80% der Epidermiszellen in Bereichen um die Infiltrationsstelle. Nach der Generierung von Mesophyllprotoplasten konnte mGFP4 (Abb. 3.7.e) im Cytoplasma und TPK4::mGFP4 (Abb. 3.7.f) in der Plasmamembran und in den endogenen Transportvesikeln beobachtet werden. Transformierte Protoplasten wurden nun für weiteren „patch-clamp“-Analysen herangezogen (siehe 2.2.2.4.).

3. Ergebnisse

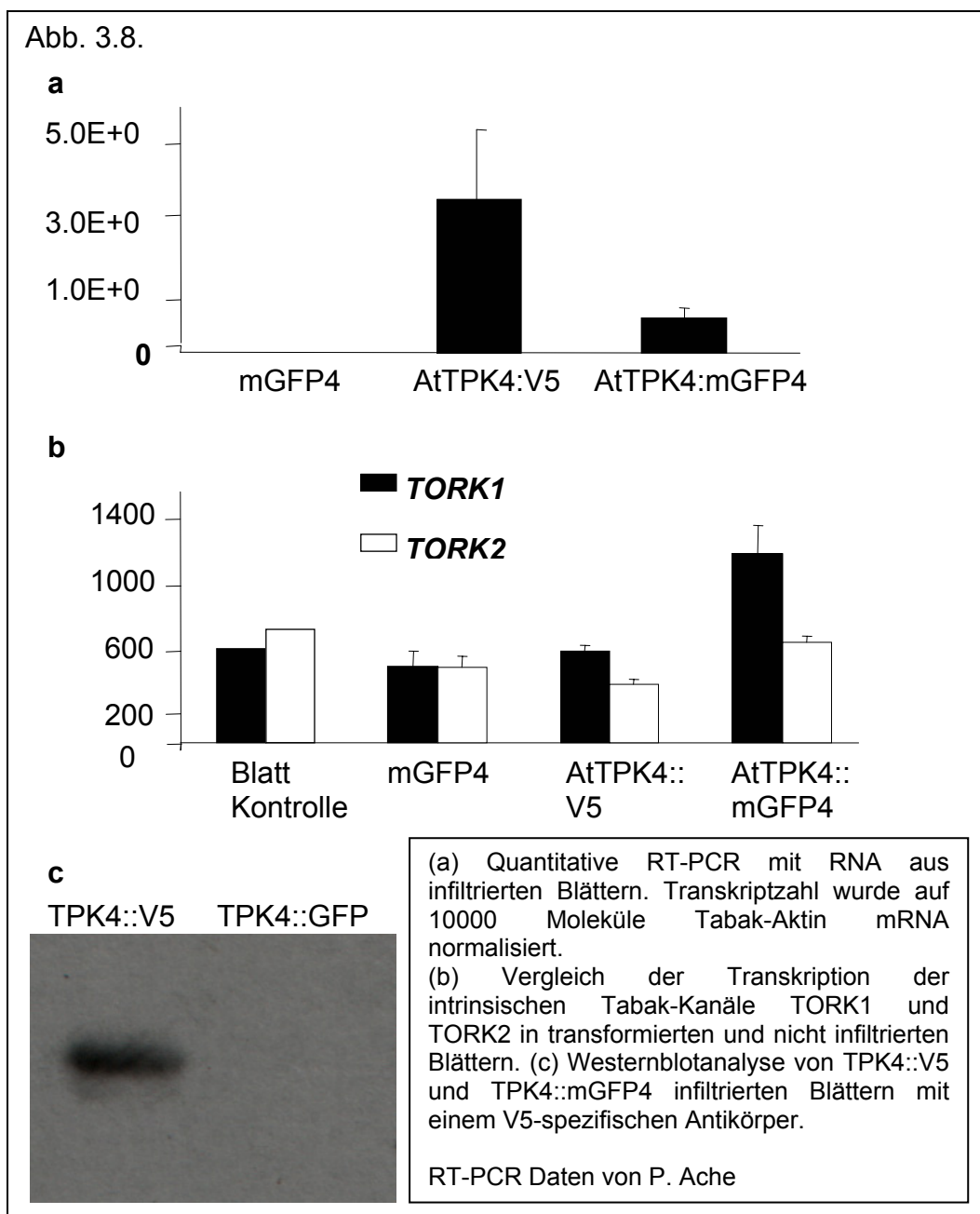


3.2.1. Analyse der TPK4-Expression nach Infiltration in *Nicotiana benthamiana* mittels quantitativer RT-PCR und Westernblot

Um zu überprüfen, ob TPK4 in *Nicotiana benthamiana* nach Infiltration exprimiert wird, wurde der Transkriptgehalt mittels quantitativer RT-PCR determiniert (siehe 2.1.12.). Gleichzeitig wurde die Proteinsynthese des TPK4::V5 Fusionskonstrukts mittels Westernblot überprüft (siehe 2.3.4.). Auch der Einfluss der TPK4-Expression auf die beiden intrinsischen auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (TORK1 und TORK2) von Tabak-Mesophyllzellen wurde mit Hilfe der RT-PCR-Technik analysiert (siehe 2.1.12.). Hierbei konnten TPK4-Transkripte in mit TPK4::V5 (500000 TPK4-Transkripte pro 10000 Aktin-Transkripte) bzw. TPK4::mGFP4 (100000 TPK4-Transkripte pro 10000 Aktin-Transkripte) infiltrierten Blättern nachgewiesen werden,

3. Ergebnisse

jedoch nicht in der mit mGFP4 infiltrierten Kontrolle (Abb. 3.8.a). Dies ist eine sehr hohe Expression im Vergleich zu den 250 TPK4-mRNA-Molekülen im Pollen von *Arabidopsis thaliana* (Becker et al 2004). Nach Expression von TPK4 zeigten sich leicht erhöhte Transkriptmengen von TOR1 während TOR2 eher unbeeinflusst blieb (Abb. 3.8.b). Auch das TPK4::V5 Fusionsprotein konnte im Gesamtproteinextrakt mit Hilfe eines Westernblots nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.8.c). Somit ist es möglich den Zweiporenkaliumkanal TPK4 mittels Agro-Infiltration in *Nicotiana benthamiana* zur Expression zu bringen und dabei nur geringen Einfluss auf die Expression von intrinsischen Kaliumkanälen auszuüben.

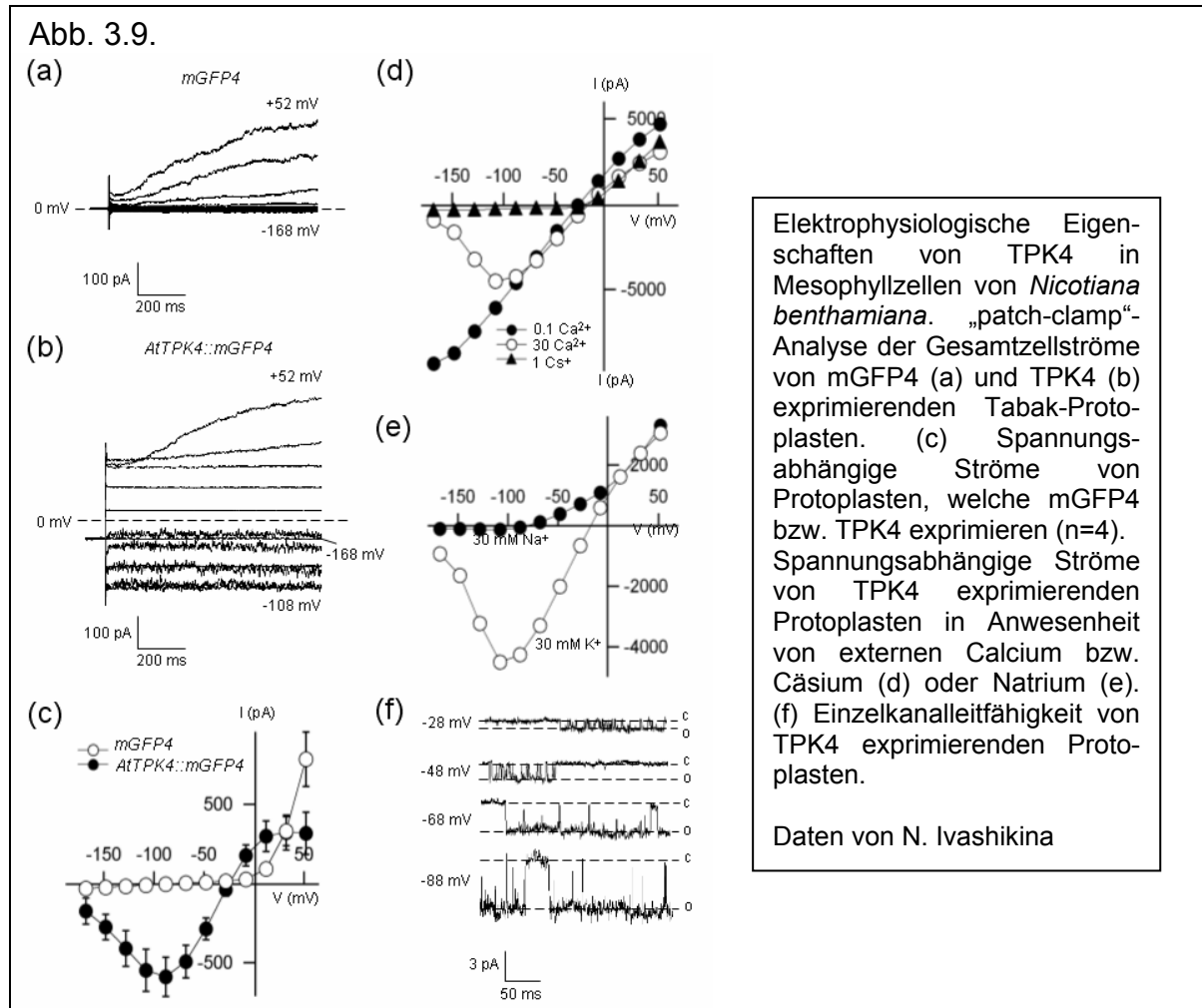


3. Ergebnisse

3.2.2. Elektrophysiologische Eigenschaften von TPK4 in *Nicotiana benthamiana* Mesophyllprotoplasten

Mesophyllprotoplasten von mit mGFP4 infiltrierten Tabakblättern zeigen bei 30mM Kalium in der Badlösung und 150mM in der Pipette (cytoplasmatische Seite) langsam aktivierende Auswärtsströme bei Spannungen positiver als -28mV (Abb. 3.9.a,c). Es konnten keine Einwärtsströme bei Spannungen bis -168mV gemessen werden. Im Gegensatz zu den mit mGFP4 transformierten Zellen, zeigten Protoplasten, welche TPK4::mGFP4 exprimierten, instantane Ströme bei positiven und negativen Spannungen, welche die langsam aktivierenden intrinsischen Auswärtsströme überlagerten (Abb. 3.9.b,c). In Anwesenheit von 30mM Calcium in der Badlösung wurden die instantanen Ströme bei Spannungen negativer als -88mV in einer spannungsabhängigen Weise geblockt (Abb. 3.9.d) und in Anwesenheit von 1mM Cäsium komplett geblockt. Tauscht man das Kalium durch Natrium aus, so ist ersichtlich, dass es sich bei TPK4 auch in Mesophyllprotoplasten um einen kaliumselektiven Kanal handelt (Abb. 3.9.e). Es konnte eine Einzelkanalleitfähigkeit von 47pS für TPK4 bestimmt werden (Abb. 3.9.f).

3. Ergebnisse



3.2.3. Zusammenfassung: Transfektion von *Nicotiana benthamiana* durch Agro-Infiltration mit TPK4-Konstrukten

- Der Kaliumkanal TPK4 wird nach Agro-Infiltration in dem pflanzlichen Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* exprimiert.
- TPK4 ist, wie in Oocyten von *Xenopus laevis* und *Allium cepa* Epidermiszellen, auch in diesen Expressionssystem in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert.
- Die Ströme, welche aus Mesophyllzellen von TPK4 infiltrierten Blättern abgeleitet wurden, gleichen denen, die in Oocyten von *Xenopus laevis* gemessen werden konnten. Somit hat TPK4 in beiden Expressionssystemen die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften.

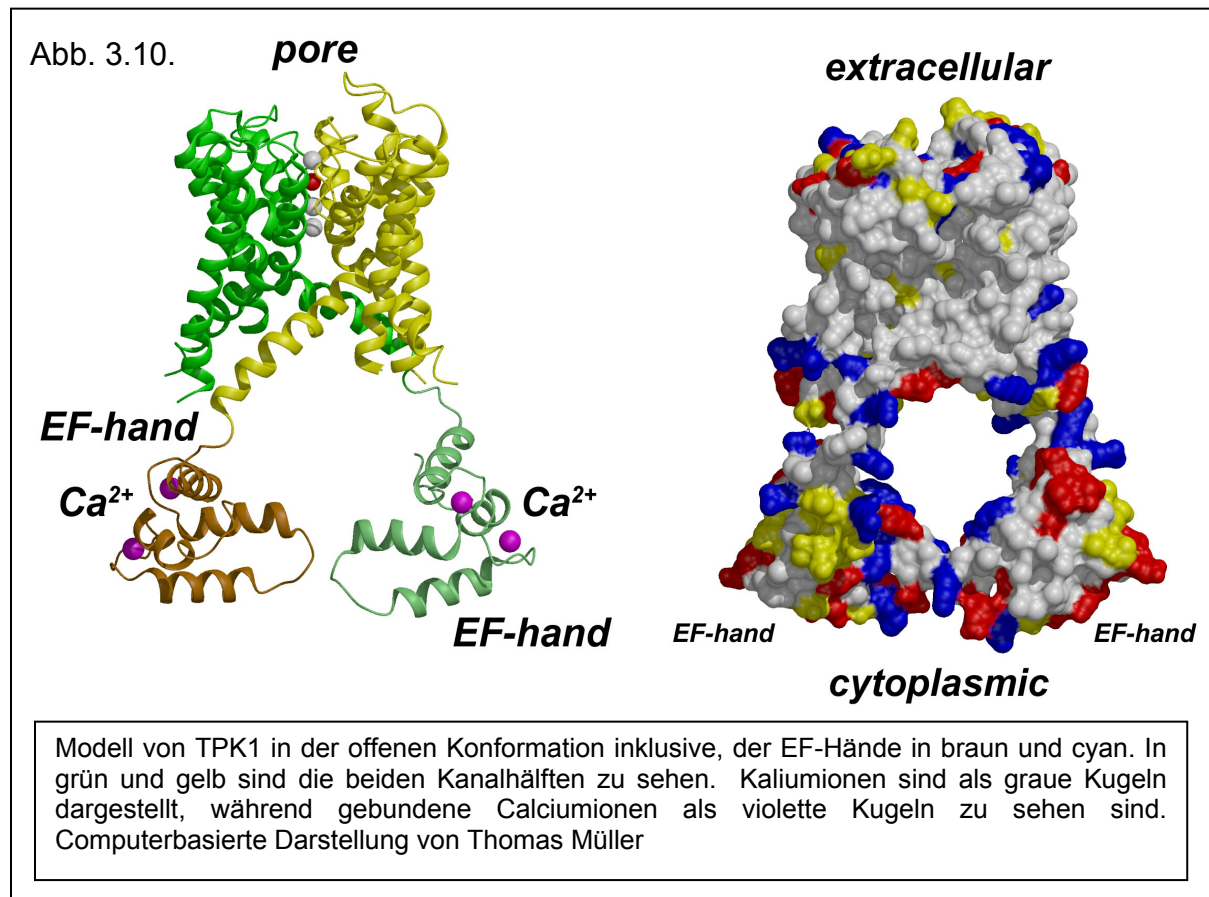
3. Ergebnisse

3.3. Funktion und Regulation von TPK1

Als zweiten Vertreter der Familie der Tandem-Poren-Kaliumkanäle wurde der im Tonoplasten lokalisierte TPK1 analysiert. Durch Kolo-kalisation von TPK1::GFP und 14-3-3::RFP Konstrukten, „Pull-down“-Assays (siehe 2.3.6.) und „Surface-Plasmon-Resonance“-Experimenten (siehe 2.3.7.) konnte gezeigt werden, dass dessen 14-3-3-Bindestelle isoformspezifisch 14-3-3-Proteine bindet. Die 14-3-3-Bindung ist von der Phosphorylierung der diesbezüglichen Bindestelle anhängig (siehe 2.3.8.). Weiterhin wurde anhand von "patch-clamp"-Studien an TPK1 überexprimierenden Hefezellen (siehe 2.2.3.3.) die Funktion der N-terminalen 14-3-3-Bindestelle und C-terminalen EF-Hände nachgewiesen. Aus diesen TPK1-überexprimierenden Hefen wurden Vakuolen isoliert und es zeigte sich, dass Calcium und 14-3-3 essentiell an der Aktivierung dieses Kanaltyps beteiligt sind.

Die bekannten Kristallstrukturen der Kaliumkanäle KcSA von *Streptomyces lividans* und *Methanothermobacter thermoautotrophicum* wurden verwendet, um die Struktur von TPK1 zu modellieren und die strukturellen Besonderheiten dieses Kanals näher analysieren zu können (Abb. 3.10.). Geht man von einer tetrameren Struktur des Kaliumselektivitätsfilters aus, so stimmt dies am besten mit einer dimeren Struktur des TPK1-Kanals überein. Das Fehlen einer *Shaker*-ähnlichen S4-Spannungssensor-Domäne macht es wahrscheinlich, dass es sich bei TPK1, wie auch bei TPK4, um einen spannungsunabhängigen, kaliumselektiven Kanal handelt. An dem im Cytoplasma lokalisierten N-Terminus befindet sich eine konservierte Typl 14-3-3-Bindungsstelle (nicht gezeigt) und am ebenfalls im Cytoplasma lokalisierten C-Terminus kommen zwei konservierte putative Calcium bindende EF-Hände vor. Dadurch reiht sich TPK1 in ein auf calcium- und 14-3-3-basierendes Signalnetzwerk ein.

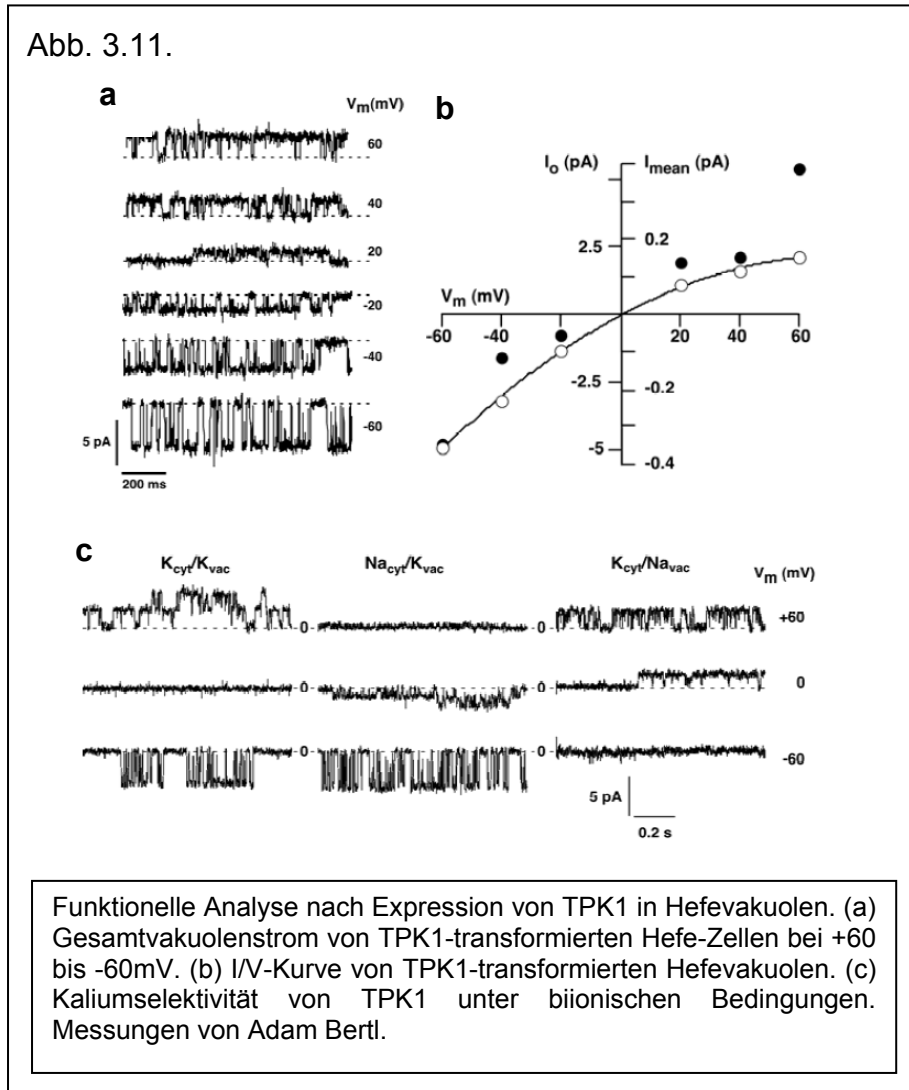
3. Ergebnisse



Nach Expression von TPK1 in Hefemutanten (*vvc1*) denen der nichtselektiven Kationenkanal fehlt (siehe 2.2.3.1.), konnte unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen (100mM Kalium) eine TPK1-Einzelkanalleitfähigkeit von 68pS bei Spannungen negativer als -40mV, und von 40pS bei Spannungen positiver als +20mV ermittelt werden (Abb. 3.11.a,b). Nach Austausch von Kalium durch Natrium auf cytosolischer Seite verschwand der Auswärtsstrom von der cytosolischen Seite in die Vakuole, während Einwärtsströme weiterhin beobachtbar waren (Abb. 3.11.c). Unter inversen ionischen Bedingungen konnten nur noch Auswärtsströme gemessen werden. Dies weist auf eine starke Selektivität von TPK1 gegenüber Kalium hin. Daher handelt es sich bei TPK1, genauso wie bei TPK4, jedoch im Gegensatz zu dem SV-Kanal, um einen spannungsunabhängigen, kaliumselektiven Kanal (Becker et al., 2004; Hedrich et. al., 2005).

3. Ergebnisse

Abb. 3.11.



3.3.1. Aktivierung von TPK1 durch Calcium

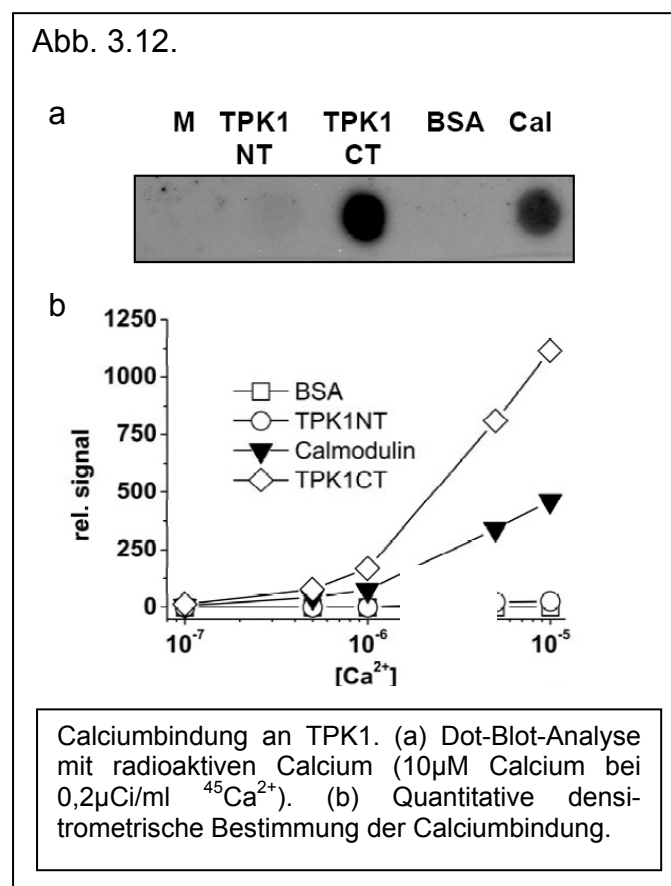
Aufgrund der Strukturvorhersage (Abb. 3.10.) konnten im C-Terminus von TPK1 zwei putative EF-Hände vorhergesagt werden. In weiteren Analysen sollte nun überprüft werden, ob der C-Terminus von TPK1 wirklich Calcium bindet und wie TPK1 durch Calcium reguliert wird.

3.3.1.1. Calcium-Bindungs-Test

15µg des rekombinanten und durch GST-Affinitätsaufreinigung isolierten C-Terminus von TPK1 wurde zusammen mit den entsprechenden Kontrollproteinen (Calmodulin als positive Kontrolle und TPK1-NT bzw. BSA als negative Kontrolle) auf eine PVDF-

3. Ergebnisse

Membran appliziert (siehe 2.3.10.). Die so behandelten Membranstreifen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calcium (Stock: 100µM Calcium mit 2µCi/ml $^{45}\text{Ca}^{2+}$ und Verdünnungen hieraus) behandelt. Die Dot-Blots wurden für die Belichtung eines Röntgenfilms benutzt. Nur bei TPK1-CT und Calmodulin konnte eine Schwärzung und damit die Bindung von Calcium nachgewiesen werden (Abb. 3.12.a). Die qualitative densitrometrische Analyse der einzelnen Proben ergab eine messbare Interaktion von TPK1-CT mit Calcium bis zu einer Calcium-Konzentration von 2,2µM freiem Calcium (Abb. 3.12.b).

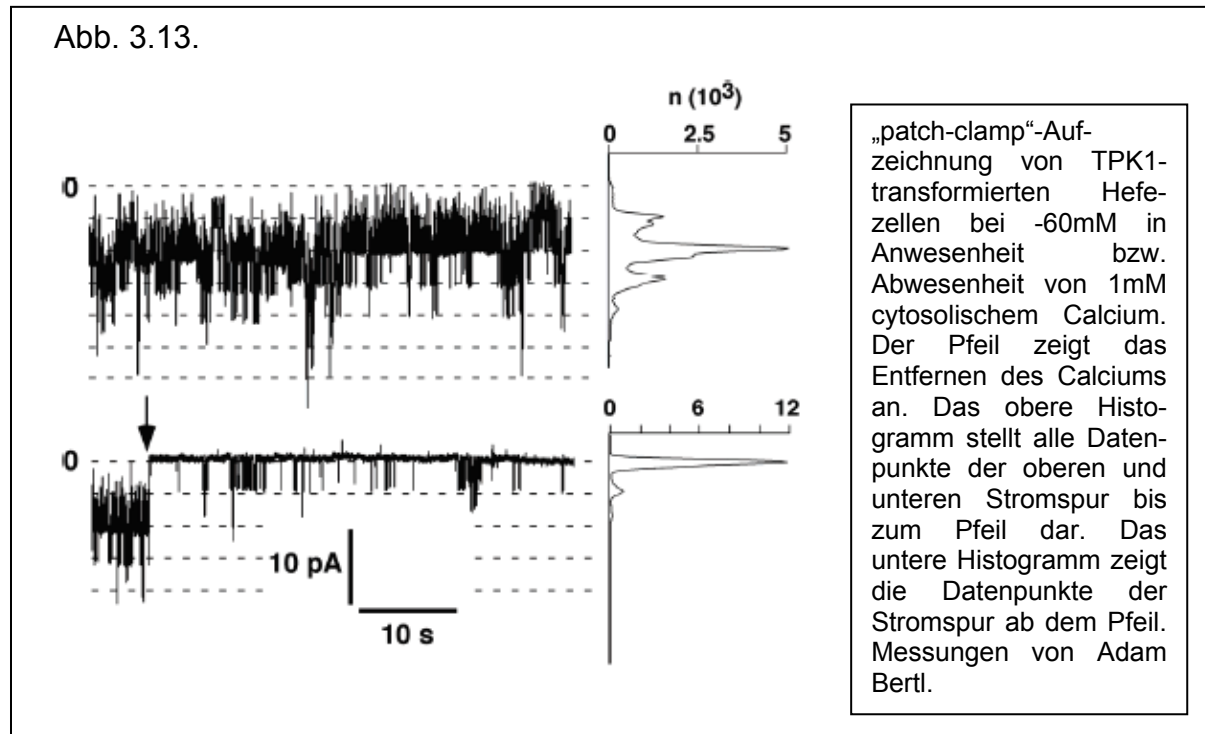


3.3.1.2. Aktivierung von TPK1 durch Calcium in Hefevakuolen

Um zu überprüfen, welche Rolle die Interaktion von TPK1 mit Calcium für die elektrophysiologischen Eigenschaften spielt, wurden die TPK1-Ströme in Hefevakuolen in An- bzw. Abwesenheit von Calcium gemessen (siehe 2.2.3.3.). Hierbei konnte eine deutliche Steigerung der Kanalaktivität in Anwesenheit von 1mM

3. Ergebnisse

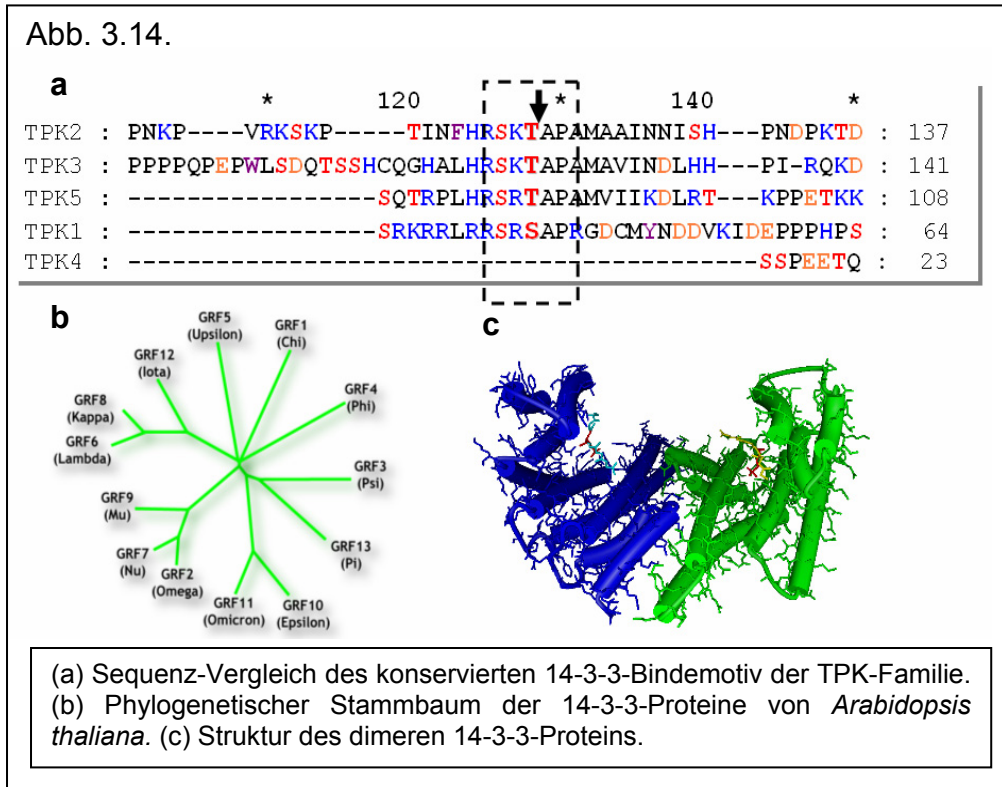
Calcium beobachtet werden (Abb. 3.13.). TPK1 wird also, im Gegensatz zu TPK4, durch Calcium aktiviert.



3.3.2. Interaktion von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen

Der N-Terminus aller im Tonoplasten lokalisierten TPKs weist eine konservierte Typ1 14-3-3-Bindedomäne auf (Abb. 3.14.a). 14-3-3-Proteine spielen eine Rolle bei Regulation und Targeting von unterschiedlichsten Zielproteinen. In *Arabidopsis* sind dreizehn 14-3-3-Proteine bekannt (Abb. 3.14.b). Diese können sowohl als Homo- wie auch als Heterodimer vorkommen (Abb. 3.14.c). Um zu überprüfen, ob TPK1 mit 14-3-3-Proteinen interagiert wurde zuerst durch Kolokalisationsexperimente (siehe 2.4.1.f) nach putativen 14-3-3-Interaktionspartnern von TPK1 gesucht. Positive Kolokalisation wurde durch „Pull-down“-Analysen (siehe 2.3.6.) von rekombinanten und GST-aufgereinigten Proteinen überprüft und die Interaktion durch "Surface-Plasmon-Resonance" (siehe 2.3.7.) in Zusammenarbeit mit Mirko Hekman quantifiziert. Mit dem dabei als Interaktionspartner gefundenen 14-3-3-Protein GRF6 wurde in Hefezellen die Rolle der 14-3-3-Interaktion bei der Regulation der Kanalaktivität überprüft.

3. Ergebnisse

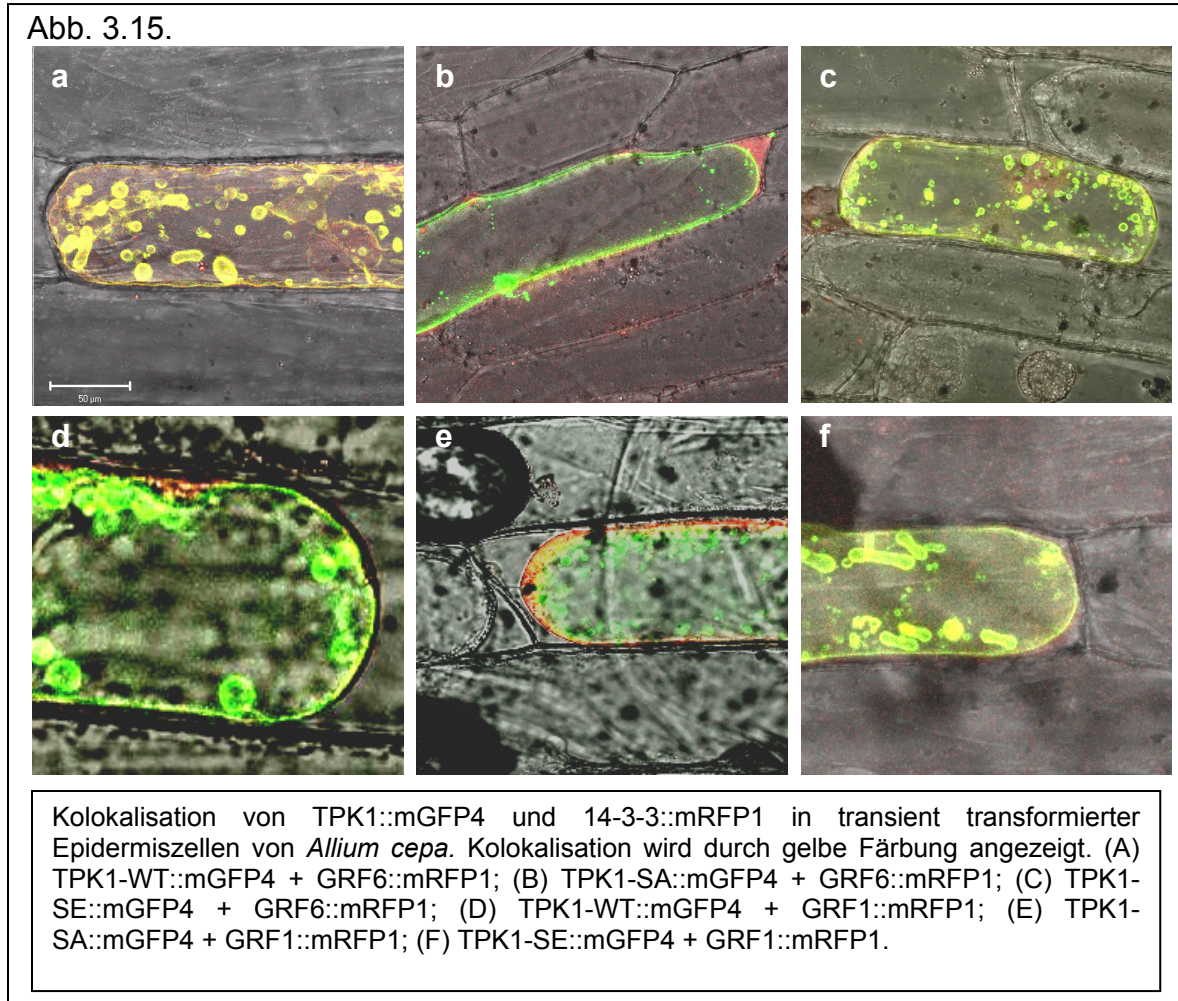


3.3.2.1. Lokalisation von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen

Bei Koexpression von TPK1::mGFP4 und dem 14-3-3-Protein GRF6::mRFP1 erkennt man eine Kolokalisation im Tonoplasten und in vacuo-lysosomalen Vesikeln (Bulbs) (Abb. 3.15.a). Dies ist ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Im Gegensatz dazu scheint das 14-3-3-Protein GRF1 nicht in der Lage zu sein, mit dem TPK1-Protein zu kolokalisieren (Abb. 3.15.d). In diesen Fall findet keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen statt.

Mutationen im 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 (siehe 2.1.13.), welche die Phosphorylierung dieser 14-3-3-Bindestelle verhindern (der Austausch von Serin mit Alanin), unterbinden auch die Kolokalisation von Kanal und 14-3-3-Protein (Abb. 3.15.b, e). Das 14-3-3-Protein bleibt in dieser Kombination im Cytoplasma. Mutiert man das 14-3-3-Bindemotiv hingegen so, dass eine Phosphorylierung vorgetäuscht wird (durch Austausch von einem Serin mit Glutamat), so ist wieder eine Kolokalisation zu beobachten (Abb. 3.15.c,f). Die Kolokalisation ist also phosphospezifisch und isoformspezifisch. Ein phosphorylierbares Serin innerhalb der 14-3-3-Bindedomäne ist also notwendig für die Kolokalisation und damit nötig für die Interaktion des Kanals mit dem 14-3-3-Protein.

3. Ergebnisse



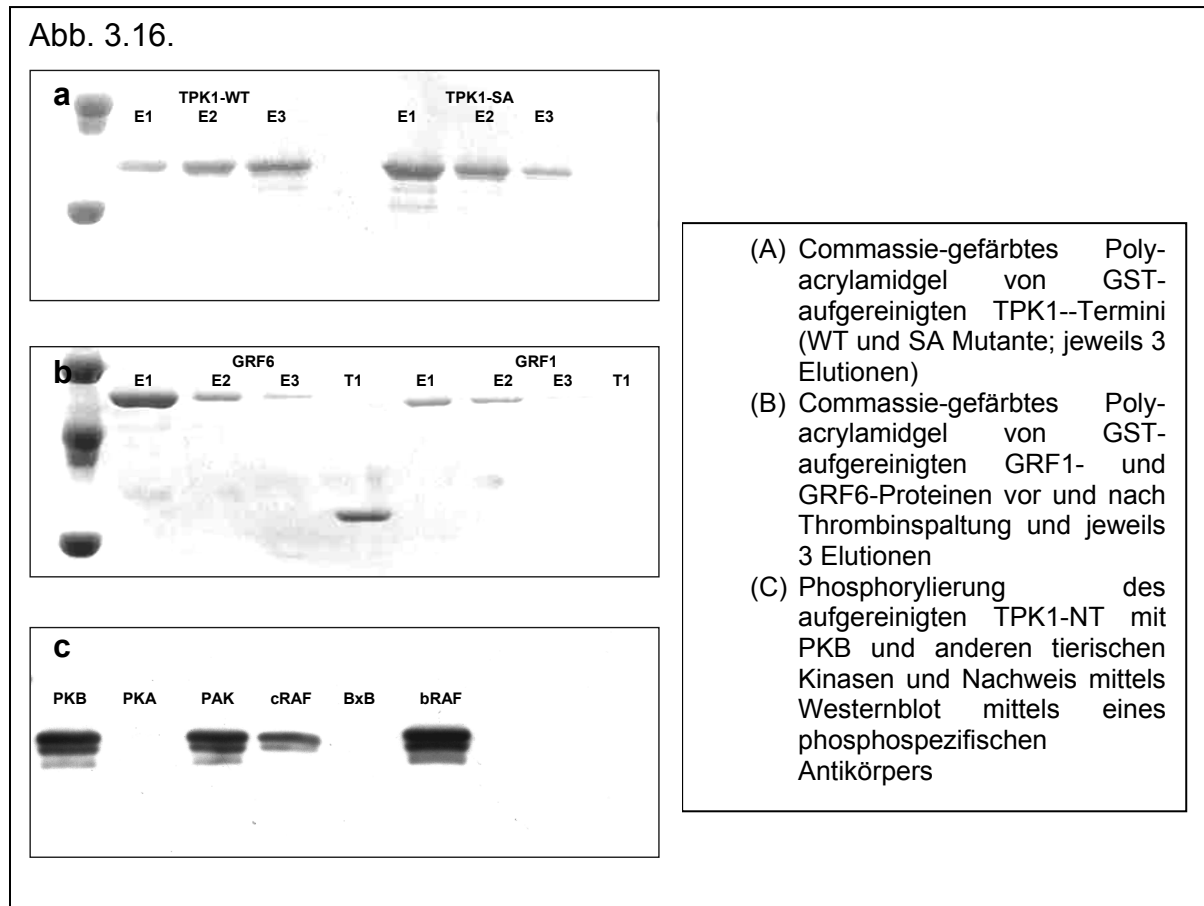
3.3.2.2. „Pull-down“ von 14-3-3-Proteinen mit TPK1

In „Pull-down“-Experimenten (siehe 2.3.6.) mit N-terminalen TPK1-Protein Fragmenten konnte die phosphospezifische Interaktion von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen gezeigt werden. Nur wenn das Kanalprotein-Fragment bzw. das Peptid am Serin der 14-3-3-Bindestelle phosphoryliert ist, kann im „Pull-down“-Experiment eine Interaktion zwischen Kanalprotein und 14-3-3-Protein nachgewiesen werden.

Für die Experimente wurden in *E. coli* Bakterien (siehe 2.2.1.2.) exprimierte und mittels GST-Aufreinigung (siehe 2.3.5.) isolierte 14-3-3-Proteine (GRF1 und GRF6) und TPK1-N-Termini verwendet (Abb. 3.16.a, b). Der GST-Tag wurde bei den 14-3-3-Proteinen vor Verwendung durch Thrombinspaltung entfernt (Abb. 3.16.b). Um eine Phosphorylierung zu ermöglichen wurden verschiedene tierische Kinasen auf die Fähigkeit getestet, TPK1 im 14-3-3-Bindemotiv zu phosphorylieren (siehe 2.3.8.). Dies wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper überprüft (siehe 2.3.4.).

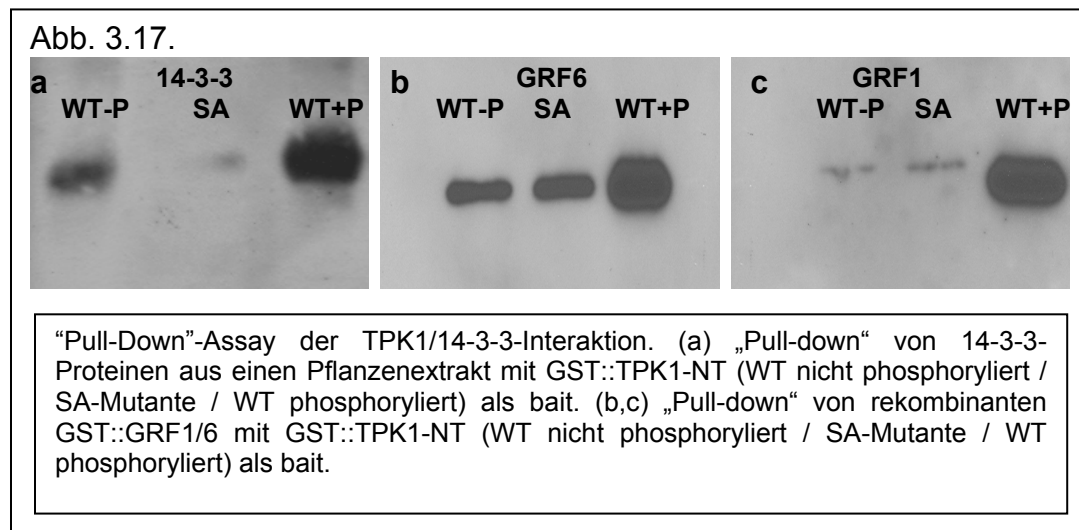
3. Ergebnisse

Hierbei stellte sich die Kinase PKB als geeignetes Enzym zur Phosphorylierung von TPK1 heraus (Abb. 3.16.c).



Anschließend wurde überprüft, ob TPK1 in phosphospezifischer Weise 14-3-3-Proteine aus einem Gesamtproteinextrakt von *Arabidopsis thaliana* binden kann (siehe 2.2.2.3.). Hierzu wurden der phosphorylierte bzw. nichtphosphorylierte GST::TPK1-N-Terminus bzw. die GST::TPK1-SA-Mutante an GSH-Sepharosebeads gekoppelt und mit pflanzlichem Proteinextrakt inkubiert. Dieser Ansatz wurde durch SDS-PAGE größenfraktioniert und der resultierende Westernblot mittels eines 14-3-3-Antikörpers auf Anwesenheit von 14-3-3-Proteinen geprüft (Abb. 3.17.a). Nur der im 14-3-3-Bindemotiv phosphorylierte N-Terminus von TPK1 ist in der Lage effektiv an 14-3-3-Proteine aus dem Pflanzenextrakt zu binden. Wird der pflanzliche Proteinextrakt mit den aufgereinigten 14-3-3-Proteinen GRF1 und GRF6 ersetzt, so ist ebenfalls eine phosphospezifische Interaktion mit dem TPK1-NT zu beobachten (Abb. 3.17.b,c). Allerdings scheint GRF6 besser an das nicht phosphorylierte TPK1 Kanalfragment zu binden als GRF1 (Abb. 3.17.b,c).

3. Ergebnisse

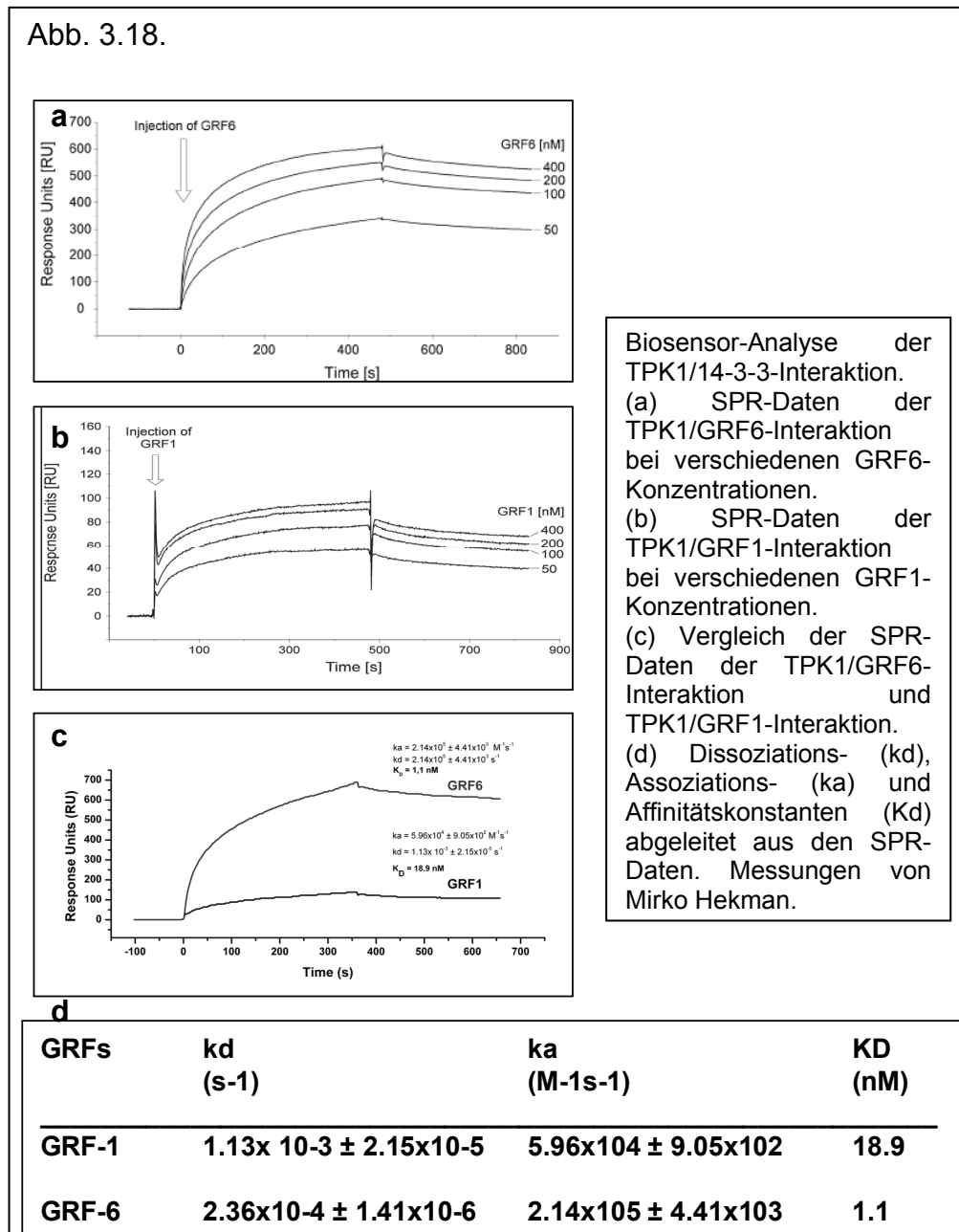


3.3.2.3. „Surface-Plasmon-Resonance“ (SPR) von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen

Mit Hilfe der SPR konnte die phosphospezifische und isoformspezifische Interaktion von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen bestätigt werden (siehe 2.3.7.). GRF6 besitzt eine bedeutend höhere Affinität zu TPK1 als GRF1 (Abb. 3.18.). Somit dürfte GRF6 der natürliche Interaktionspartner von TPK1 in der Pflanze sein. Für die Quantifizierung der 14-3-3-Interaktion wurden biotinylierte TPK1-Peptide auf der Sensoroberfläche immobilisiert, welche das phosphorylierte bzw. nicht phosphorylierte 14-3-3-Bindemotiv enthielten, und anschließend die Interaktion mit GRF1 bzw. GRF6 in Echtzeit gemessen (Abb. 3.18.a, b). Hier konnte eine schwache Assoziation von GRF1 und GRF6 zu dem nicht phosphorylierten Peptid gemessen werden (ca. 10% von der Gesamtbindung). Starke Interaktion mit schneller Assoziationskinetik konnte für das phosphorylierte TPK1-Peptid gemessen werden. Im Vergleich zu GRF1 zeigt GRF6 höhere Assoziations- und niedrigere Dissoziationsraten (Abb. 3.18.c) mit Kd-Werten von 1,1nM im Vergleich zu 18,9nM (Abb. 3.18.d). Die Komplexbildung von TPK1/GRF6 ist 3x schneller als die von TPK1/GRF1. Niedrige Dissoziationsraten deuten auf einen stabilen TPK1/14-3-3 Komplex hin.

3. Ergebnisse

Abb. 3.18.



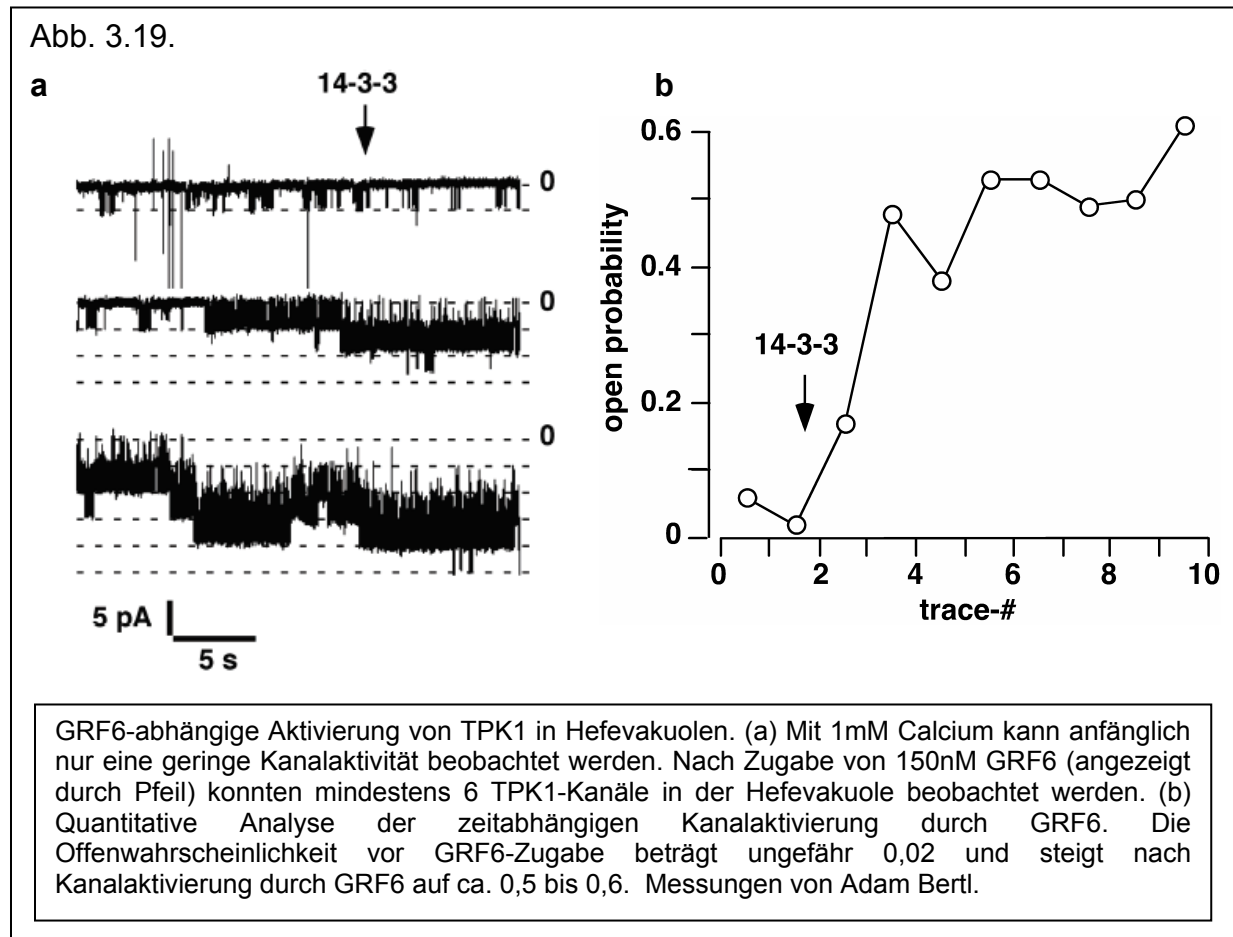
Biosensor-Analyse der TPK1/14-3-3-Interaktion. (a) SPR-Daten der TPK1/GRF6-Interaktion bei verschiedenen GRF6-Konzentrationen. (b) SPR-Daten der TPK1/GRF1-Interaktion bei verschiedenen GRF1-Konzentrationen. (c) Vergleich der SPR-Daten der TPK1/GRF6-Interaktion und TPK1/GRF1-Interaktion. (d) Dissoziations- (k_d), Assoziations- (k_a) und Affinitätskonstanten (K_D) abgeleitet aus den SPR-Daten. Messungen von Mirko Hekman.

3.3.2.4. Aktivierung von TPK1 durch 14-3-3-Proteine in Hefevakuolen

Es konnte in Hefe gezeigt werden, dass eine 14-3-3-Interaktion zur Aktivierung des TPK1-Kanals führt (siehe 2.2.3.3.). Der calciumaktivierte TPK1-Kanal wird auch hier nach Zugabe von GRF6 aktiviert. Somit wird erneut deutlich, dass die 14-3-3-Bindestelle nicht für das Targeting der Kanäle zuständig ist, sondern der Regulation der Aktivität des TPK1-Kanals dient. Bis zu sieben TPK1-Kanäle konnten in Hefevakuolen beobachtet werden; jedoch ist die Kanalaktivität äußerst gering (Abb. 3.19.a). Nach Zugabe von 150nM GRF6 konnte allerdings eine Erhöhung der

3. Ergebnisse

Kanalaktivität beobachtet werden (Abb. 3.19.a). Die Offenwahrscheinlichkeit steigt dabei von 0,02 auf ca. 0,6 (Abb. 3.19.b). Im Gegensatz dazu ist GRF1 nicht in der Lage TPK1 in der Hefevakuole zu aktivieren (nicht gezeigt).



3.3.3. Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1

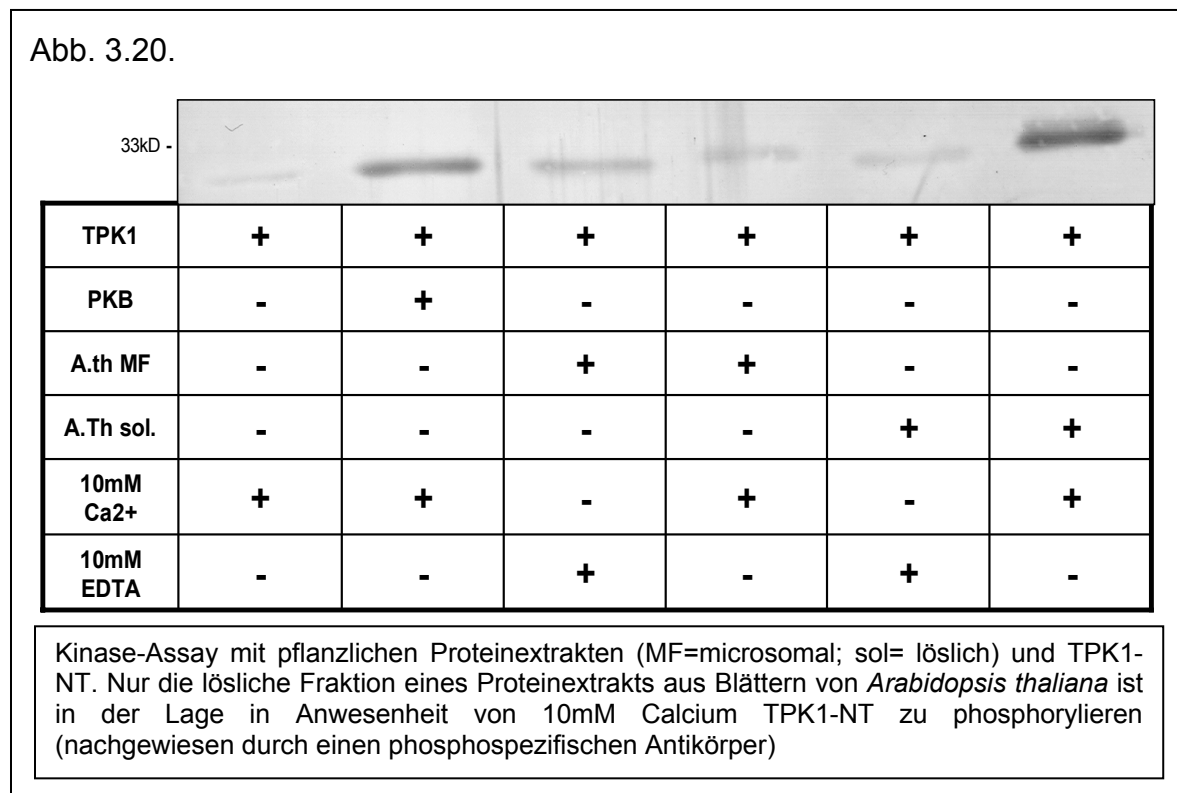
Für die Aktivierung von TPK1 ist nicht nur Calcium nötig, sondern auch die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen. Da dieser Interaktion eine Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs vorausgeht, wurde auf das Kinase/Phosphatase-System näher eingegangen, welches für den Phosphorylierungsstatus von TPK1 verantwortlich ist, um mehr über die Regulation der Kanalaktivität zu erfahren.

3.3.3.1. Kinase-Assay mit einem pflanzlichen Proteinextrakt

Zuerst wurde überprüft, ob in einem pflanzlichen Proteinextrakt Kinasen vorhanden sind, welche das 14-3-3-Bindemotiv des aufgereinigten TPK1-NT Fragments

3. Ergebnisse

phosphorylieren können, und ob diese löslich oder membrangebunden bzw. abhängig sind (siehe 2.2.2.3. und 2.43.8.). Dabei konnte nur bei der löslichen Fraktion in Anwesenheit von Calcium eine Phosphorylierung von TPK1-NT auf dem Westernblot mit einem phosphospezifischen Antikörper beobachtet werden (Abb. 3.20.). Die Kinase welche das 14-3-3-Bindungsmotiv phosphoryliert, ist eine lösliche, calciumabhängige Proteinkinase. Diese Eigenschaften lassen darauf schließen, dass es sich bei der Kinase um ein Mitglied der „calciumabhängigen-Proteinkinase-Familie“ (CDPK) handelt.

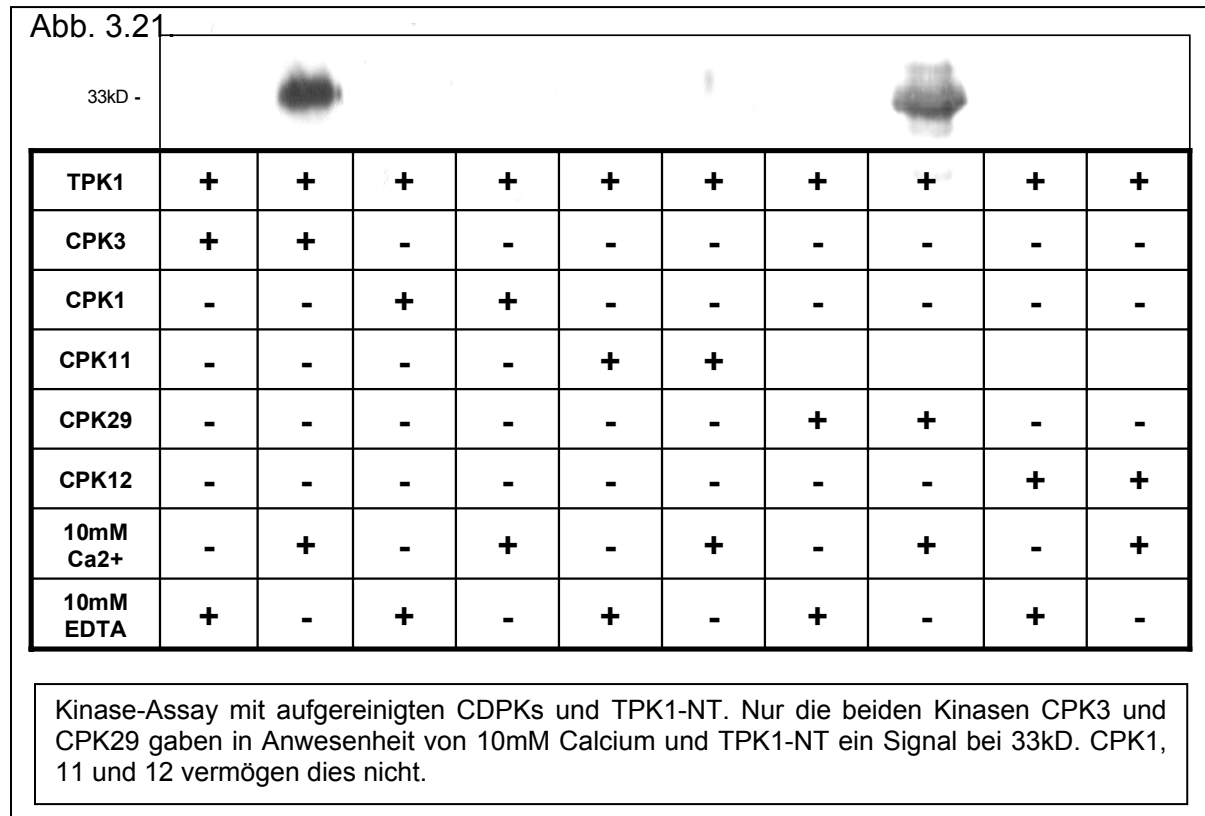


3.3.3.2. Kinase-Assay mit aufgereinigten Kinasen der CDPK-Familie

Bei näherer Betrachtung des Expressionsprofils und der subzellulären Lokalisation der CDPKs und der Zielsequenzen, die diese Kinasen phosphorylieren, konnten unter den 34 Mitgliedern dieser Familie einige putative Kandidaten ausgemacht werden, die möglicherweise für die Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1 verantwortlich sind. Diese Kandidaten wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert (siehe 2.2.1.2.) und über eine GST-Aufreinigung isoliert (siehe 2.3.5.) und anschließend wurde überprüft, ob diese Kinasen in der Lage sind, das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 zu phosphorylieren (siehe 2.3.8.). Zwei Mitglieder dieser

3. Ergebnisse

Familie (CPK3 und CPK29) waren in der Lage, das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 in Anwesenheit von Calcium zu phosphorylieren, während die ebenfalls getesteten Kinasen CPK1, 11 und 12 dies nicht vermochten (Abb. 3.21.).

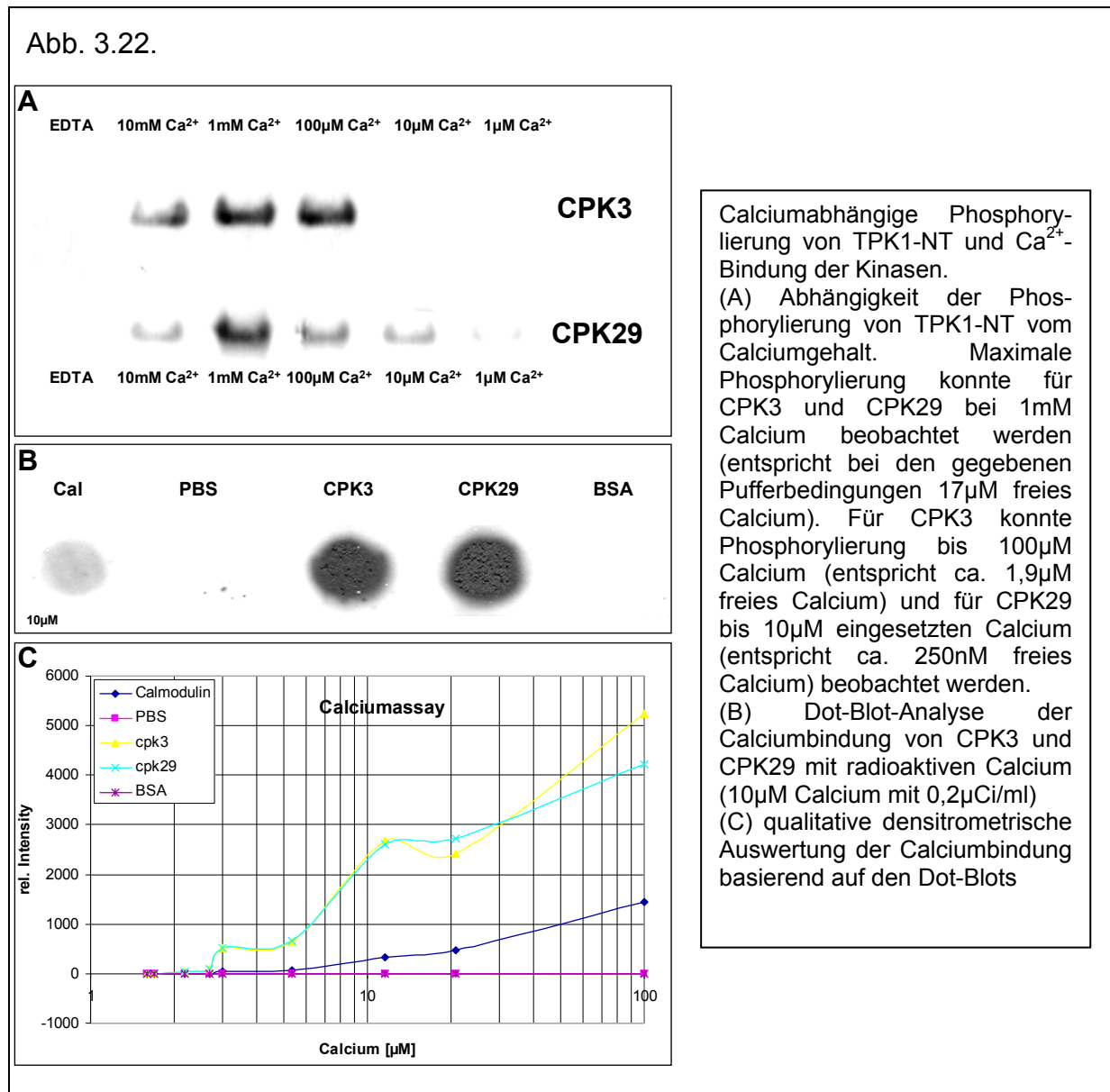


3.3.3.3. Calciumabhängigkeit der Phosphorylierung von TPK1 durch CDPKs

Um zu ermitteln, bei welchen Calciumkonzentrationen die beiden Kinasen CPK3 und CPK29 in der Lage sind das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 zu phosphorylieren, wurde der Kinase-Assay (siehe 2.3.8.) bei unterschiedlichen freien Calciumkonzentrationen durchgeführt. Eine maximale Kinaseaktivität konnte bei beiden Kinasen bei 1mM Calcium beobachtet werden (entspricht ca. 17 μ M freiem Calcium). Für CPK3 konnte Aktivität bis 100 μ M eingesetztes Calcium (entspricht ca. 1,9 μ M freiem Calcium) und für CPK29 sogar noch bei 10 μ M eingesetzten (entspricht ca. 0,25 μ M freiem Calcium) beobachtet werden (Abb. 3.22.a). Durch einen Calcium-Overlay-Assay (siehe 2.3.10.) konnte gezeigt werden, dass CPK3 und CPK29 noch bis zu einer freien Calciumkonzentration von 2,2 μ M nachweisbar mit Calcium interagieren (Abb. 3.22.b,c). Die Kinasen sind also unter physiologischen Bedingungen inaktiv und werden erst aktiviert, wenn der freie Calciumspiegel innerhalb der Zelle steigt,

3. Ergebnisse

womöglich induziert durch Stressfaktoren. Das Ansteigen des Calciumspiegels führt auch zu einer Aktivierung des Kanals über die EF-Hände (siehe 3.3.2.1). Durch die Phosphorylierung und die damit einhergehende Interaktion mit 14-3-3-Proteinen wird diese Kanalaktivität zusätzlich gesteigert.

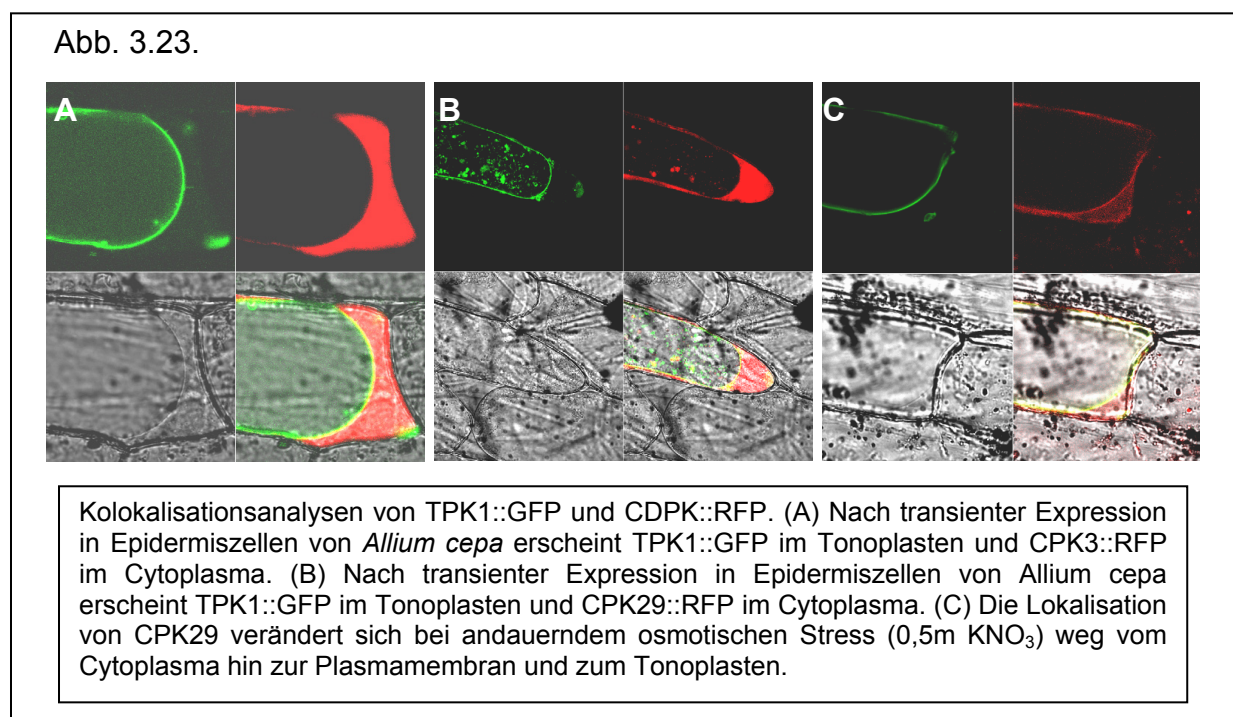


3.3.3.4. Kolokalisation von TPK1 mit CPK3 und CPK29

Um zu überprüfen, ob die beiden Kinasen CPK3 und CPK29 innerhalb der Zelle mit dem N-Terminus von TPK1 in Kontakt kommen, wurden Kolokalisationsstudien mit unterschiedlich markierten Kanal- und Kinase-Konstrukten in Epidermiszellen von *Allium cepa* vorgenommen (siehe 2.4.1. und 2.4.2.). CPK3::mRFP1 ist hierbei im

3. Ergebnisse

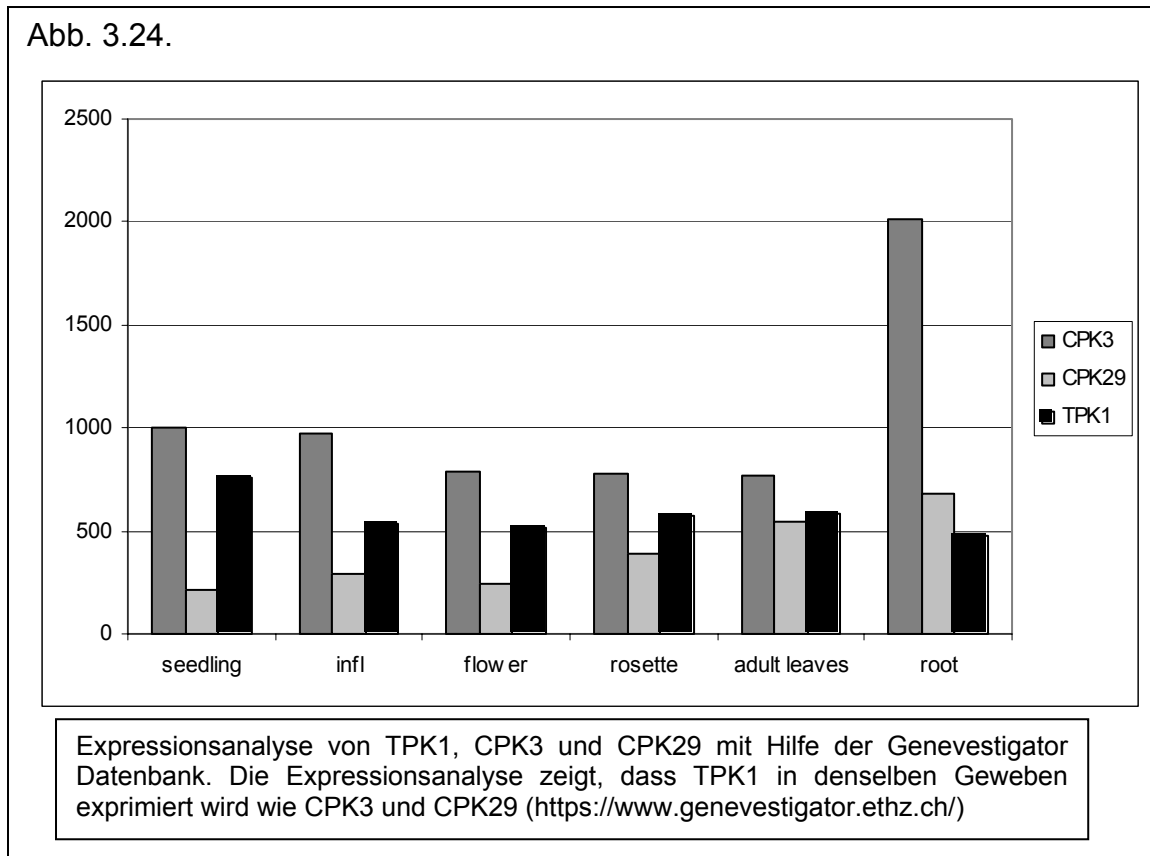
Cytoplasma lokalisiert (Abb. 3.23.a) und hat somit Zugang zu dem ebenfalls im Cytoplasma lokalisierten 14-3-3-Bindemotiv von TPK1. CPK29::mRFP1 ist auch im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 3.23.b). Allerdings ändert sich das Targeting nach osmotischem Stress in Richtung Plasmamembran und Tonoplasten (Abb. 3.23.c). Auch CPK29 hat somit Zugang zum 14-3-3-Bindemotiv von TPK1. Möglicherweise ist das veränderte Targeting von CPK29 nach osmotischen Stress darauf zurückzuführen, dass es so zu einer Konzentrierung der Kinase am Zielprotein kommt und somit zu einer verstärkten und schnelleren Phosphorylierung des Kanals und dadurch eine stärkere und schnellere Aktivierung von TPK1 resultiert.



3.3.3.5. Expressionsmuster von CPK3, CPK29 und TPK1

Die beiden Kinasen CPK3 und CPK29 werden in denselben Geweben wie TPK1 exprimiert (Abb.3.24.). Es ist also wahrscheinlich, dass diese Kinasen auch in der Pflanze den TPK1-Kanal in calciumabhängiger Weise phosphorylieren können.

3. Ergebnisse



3.3.4. Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1

Die induzierte Kanalaktivierung muss schließlich wieder ausgeschaltet werden. Dies kann durch Erniedrigung der transienten cytoplasmatischen Calciumerhöhung und durch die Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs geschehen (siehe 2.3.9.). Um mehr über das Kinase/Phosphatase-System zu erfahren, welches für die Regulation von TPK1 verantwortlich ist, wurde nach der korrespondierenden Phosphatase-Familie gesucht, welche für die Dephosphorylierung von TPK1 verantwortlich sein könnte.

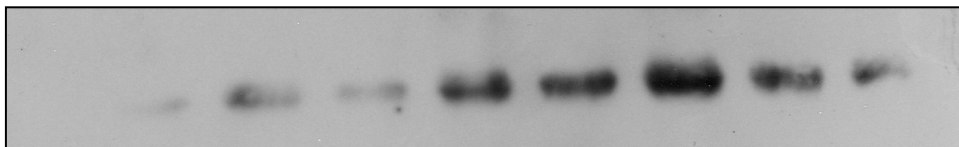
3.3.4.1. Phosphatasefamilie

Um die Familienzugehörigkeit der Phosphatase, welche für die Dephosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1 verantwortlich ist, zu identifizieren, wurden Phosphatase-Assays (siehe 2.3.9.) mit dem phosphorylierten TPK1 N-Terminus und pflanzlichen Proteinextrakten in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Phosphataseinhibitoren durchgeführt. Unterschiedliche Mengen von Okadaic Acid

3. Ergebnisse

dienten zur Bestimmung der Phosphatase-Familie, wobei Phosphataseaktivität bei 10µM Okadeic Acid für PP2C, bei 100nM Okadeic Acid für PP1 und bei 1nM Okadeic Acid für PP2A steht. Bei Okadeic Acid Konzentrationen von 100nM bzw. 10µM konnte eine Inhibierung der Phosphataseaktivität im Vergleich zu den Proben ohne Phosphataseinhibitor beobachtet werden (Abb. 3.25.). Erst bei einer Konzentration von 1nM Okadeic Acid wurde in der löslichen Fraktion des pflanzlichen Proteinextraktes Phosphataseaktivität gemessen, während bei dieser Inhibitorkonzentration in der mikrosomale Fraktion keine Dephosphorylierung von TPK1-NT beobachtet werden konnte (Abb. 3.25.). Somit dürfte es sich bei der Phosphatase um ein Mitglied der PP2As handeln. Diese Phosphatasefamilie besteht aus heterotrimeren Proteinen, was eine weitergehende Charakterisierung stark erschwert.

Abb. 3.25.



TPK1-P	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A.th MF	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A.th sol.	-	+	-	+	-	+	-	+	-
k252a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1nM Oka.	-	-	-	+	+	-	-	-	-
100nM Oka.	-	-	-	-	-	+	+	-	-
10µM Oka.	-	-	-	-	-	-	-	+	+

| PP2A | | PP1 | | PP2B |

Phosphatase-Assay auf TPK1-NT (+P_i) mit pflanzlichen Proteinextrakten (MF=Membranfraktion und sol=lösliche Fraktion) aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*. K252a diente zur Blockierung der Kinasen im Protein-Extrakt. Bei der Verwendung der löslichen Fraktion und 1nM Okadeic acid ist eine Reduktion der TPK1 Phosphorylierung zu beobachten und somit die Aktivität einer Phosphatase. Es dürfte sich bei der Phosphatase daher um ein lösliches Mitglied der PP2A-Familie handeln.

3.3.5. Einfluss von abiotischen Stressfaktoren auf TPK1

Um zu überprüfen, unter welchen physiologischen Bedingungen die Aktivierung der Kinase und damit die einhergehende Kanalaktivierung induziert wird, wurden

3. Ergebnisse

unterschiedliche Stress-Tests an *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vorgenommen (siehe 2.6.). Dabei wurde sowohl der Phosphorylierungszustand von TPK1 in unterschiedlich gestressten Pflanzen und Mutanten überprüft (siehe 2.3.4.), als auch ein Keimungsassay von Wildtyp und *tpk1.3*-knockout-Pflanzen auf unterschiedlichen Medien durchgeführt (siehe 2.5.).

3.3.5.1. Einfluss von Salzstress auf den Phosphorylierungszustand von TPK1

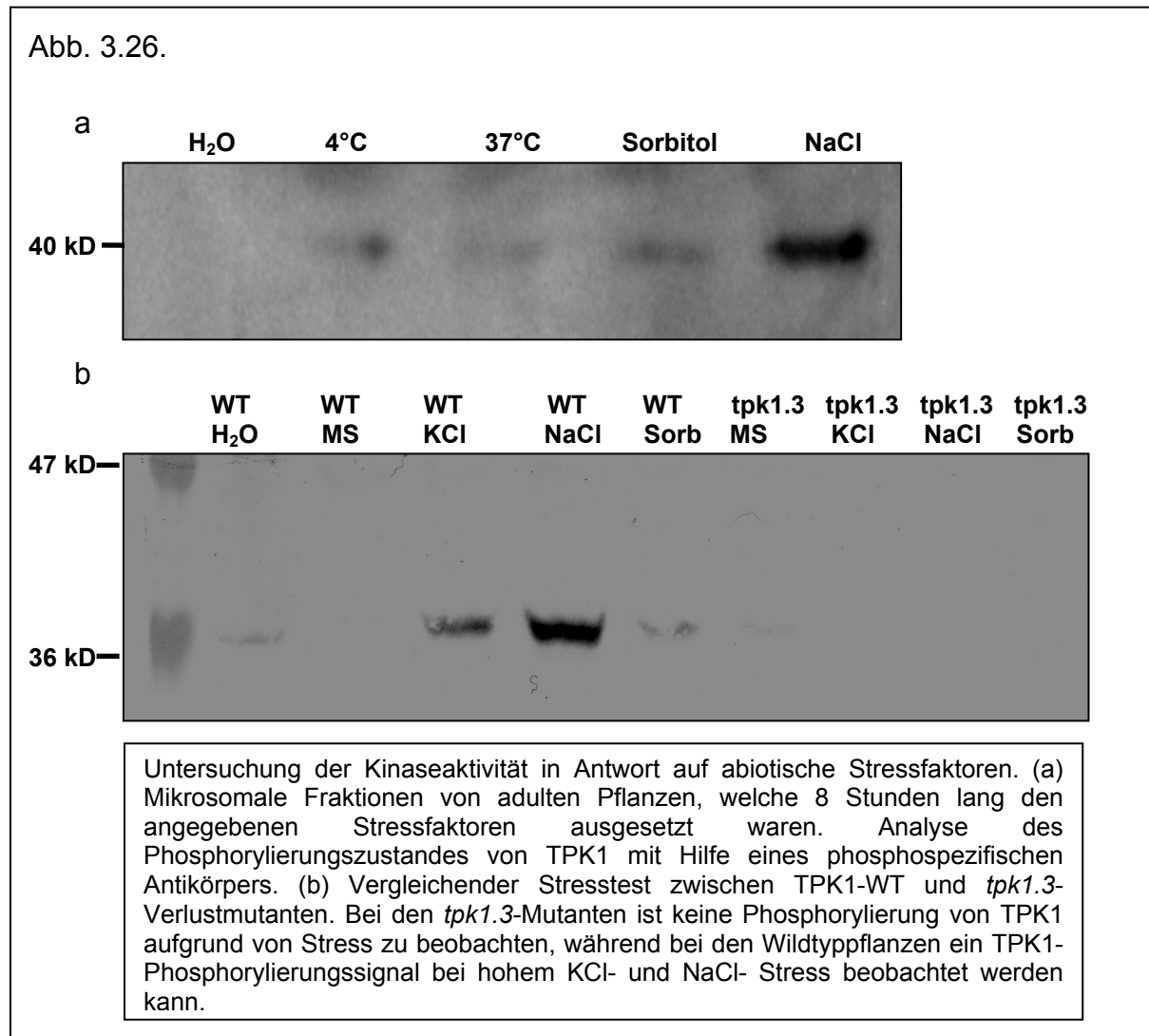
Getestet wurden Pflanzen, die mit unterschiedlichem Stress-Stimuli behandelt wurden:

Kontr.:	8h 50ml H ₂ O/RT
4°C:	6h 4°C/2h RT
37°C:	6h 37°C/2h RT
NaCl:	8h 50ml 500mM NaCl
KCl:	8h 50ml 500mM KCl
Sorbitol:	8h 50ml 500mM Sorbitol

Eine Phosphorylierung von TPK1 konnte nach Proteinextraktion und Westernblot-Analyse (siehe 2.3.4.) nur bei den mit NaCl gegossenen Pflanzen beobachtet werden (Abb. 3.26.a). Dies deutet darauf hin, dass die Kinase, welche TPK1 phosphoryliert, durch Salzstress aktiviert wird, was wiederum zur Kanalaktivierung führt.

In einem ähnlichen Experiment wurden Hydrokulturpflanzen für 2 Stunden unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Verwendung fanden dabei *Arabidopsis thaliana* Col-0-Wildtyppflanzen als Referenz und *tpk1.3*-Verlustmutanten. Die Pflanzen wurden 2 Stunden lang in eine Lösung aus 150mM KCl in ½ MS, 150mM NaCl in ½ MS, 150mM Sorbitol in ½ MS, ½ MS bzw. H₂O gestellt. Anschließend wurden mikrosomale Fraktionen aus den Blättern dieser Pflanzen hergestellt und die TPK1-Phosphorylierung mittels Westernblot überprüft. Nur bei Pflanzen, die mit KCl bzw. NaCl behandelt wurden, konnte eine Phosphorylierung des TPK1-Kanals beobachtet werden. In den *tpk1.3*-Verlustmutante ist ein solches Signal unter keinen der getesteten Bedingungen beobachtbar, was darauf hindeutet, dass der verwendete Antikörper spezifisch die Phosphorylierung von TPK1 anzeigt.

3. Ergebnisse



3.3.5.2. Einfluss von Salzstress auf die Keimung

In einem Keimungsassay (siehe 2.5.) wurde überprüft, welchen Einfluss Salzstress, Kaliummangel bzw. die Kombination aus beiden auf die Keimung von Wildtyp, TPK1 und *cpk3.1*-Verlustmutanten hat. Hierfür wurden Samen auf Agarplatten steril ausgesät, die mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen angesetzt wurde. Verwendung dabei fanden folgende Medien:

½ MS

½ MS +50mM NaCl

½ MS + 150mM NaCl

½ MS mit 50µM KCl

½ MS mit 50µM KCl +50mM NaCl

½ MS mit 50µM KCl +150mM NaCl

3. Ergebnisse

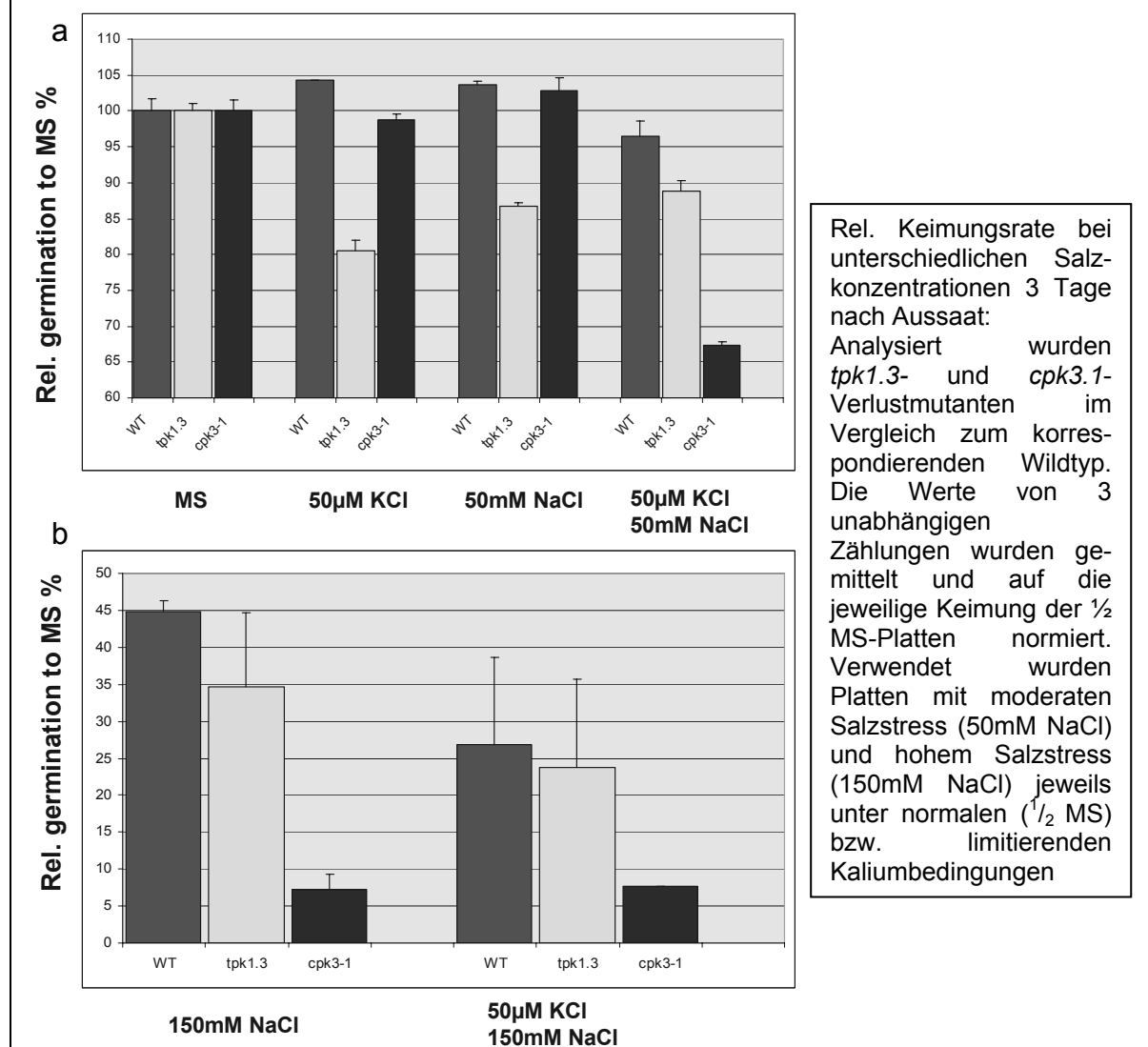
Die Keimungseffizienz wurde über 5 Tage jeden Tag von 3 Personen ausgezählt. Für die Analyse der Keimungseffizienz wurden die jeweiligen Durchschnittswerte für den jeweiligen Tag auf die jeweilige Keimungsanzahl auf MS-Platten normalisiert, welche als 100% gesetzt wurden. Für die Analyse wurden die Daten vom dritten Tag nach der Aussaat herangezogen.

Bereits bei moderatem Salzstress von 50mM NaCl konnte bei den *tpk1.3*-Verlustmutanten eine Reduktion in der Keimung im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp festgestellt werden (Abb.3.27.a). Unter diesen Bedingungen konnte nur noch eine Keimungsrate von ca. 81% für *tpk1.3* im Gegensatz mehr als 100% (normalisiert) beim korrespondierenden Wildtyp festgestellt werden. Auch eine Unterversorgung mit Kalium (50µM KCl) führt zu einer Verringerung der Keimungseffizienz auf ca. 87% bei *tpk1.3* gegenüber 100% bei Wildtyppflanzen. Bei moderaten Natriumkonzentrationen und wenig Kalium ist auch bei den Wildtyppflanzen eine leichte Reduktion in der Keimungseffizienz auf 97% zu beobachten, die allerdings bei den *tpk1.3*-Verlustmutanten mit nur ca. 88% deutlicher ausfällt. Bei hohen NaCl-Konzentrationen von 150mM ist auch bei den Wildtyppflanzen eine drastische Reduktion der Keimungseffizienz auf ca. 45% ersichtlich (Abb. 3.27.b). Unter diesen Bedingungen ist der Unterschied zu den *tpk1.3*-knockout-Keimlingen mit ca. 35% Keimungseffizienz nicht mehr ganz so prominent wie bei moderaten Salzstressbedingungen. Bei hohen Natriumkonzentrationen und wenig Kalium ist der Unterschied in der Keimungseffizienz zwischen Wildtyp mit ca. 27% und *tpk1.3*-knockout mit ca. 24% am geringsten (siehe Abb. 3.27.).

Im Gegensatz zu den *tpk1.3*-Verlustmutanten, weisen die *cpk3.1*-Verlustmutanten bei moderatem Salzstress bzw. limitiertem Kaliumangebot mit ca. 98% bzw. über 100% Keimungseffizienz keine Reduktion in der Keimung auf (Abb. 3.27.a). Allerdings konnte für die Kinase-Verlustmutante eine drastische Reduktion der Keimungseffizienz auf ca. 67% bei moderatem Salzstress und gleichzeitigem Kaliummangel beobachtet werden. Auch bei hohen NaCl-Konzentrationen bzw. hohem Salzstress bei gleichzeitiger Kaliumunterversorgung konnte für die *cpk3.1*-knockout eine dramatische Reduktion der Keimungseffizienz auf jeweils ca. 7% beobachtet werden (Abb. 3.27.b).

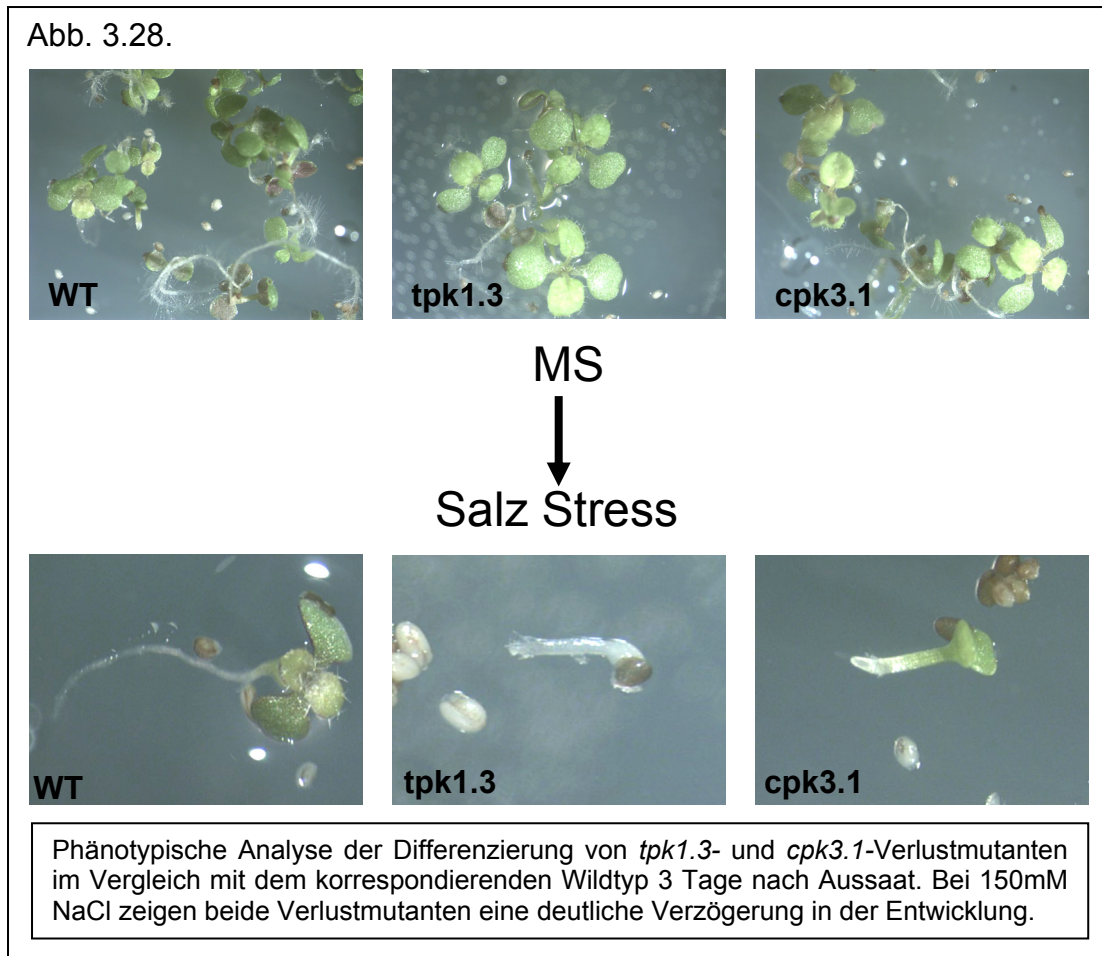
3. Ergebnisse

Abb. 3.27.



Bei genauerer Betrachtung der Wildtyp-, Kanal- bzw. Kinase-Verlustmutanten nach 3 Tagen lassen sich auch phänotypische Unterschiede bei den salzgestressten Keimlingen erkennen. Während die Keimlinge auf 1/2 MS relativ gleich gut entwickelt waren, zeigten die beiden knockout-Keimlinge eine Verzögerung in der Entwicklung. So waren z.B. im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp wenig bis keine Wurzelhaare bei den Keimlingen der Verlustmutanten zu erkennen und bei beiden ist die Entwicklung und Entfaltung der Keimblätter sowie die Differenzierung von Primärblättern verzögert. Auch die Chlorophyllsynthese scheint bei den *tpk1.3*-knockout-Keimlingen reduziert zu sein.

3. Ergebnisse



3.3.5. Zusammenfassung: Funktion und Regulation von TPK1

- TPK1 interagiert phosphospezifisch und isotypspezifisch mit dem 14-3-3-Protein GRF6.
- Diese Interaktion führt zur Aktivierung des Kanals.
- Die Kinasen CPK3 und CPK29, welche das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 phosphorylieren um eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen zu ermöglichen, gehören zur Familie der CDPKs
- Diese Kinasen sind selbst calciumaktiviert und aller Wahrscheinlichkeit nach unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Erst ein Anstieg der freien Calciumkonzentration führt zur Aktivierung der Kinase in der Zelle und damit zur Aktivierung des Kanals.
- Es ist möglich, dass die Kinase und damit auch der Kanal durch Salzstress und durch Kaliumunterversorgung aktiviert werden und somit die

3. Ergebnisse

Signalkaskade über Kinase/14-3-3/Calcium in einen stressphysiologischen Kontext involviert ist.

4. Diskussion

4.1. Targeting der TPKs

Strukturell und von der Sequenz her sind die tierischen Tandem-Poren-Kaliumkanäle der KCNK-Familie sehr ähnlich zu den pflanzlichen Homologen der TPK-Familie. Ob sich diese strukturellen Ähnlichkeiten auch in funktioneller Ebene fortsetzt, ist derzeit Gegenstand der Forschung. Um zu untersuchen, ob sich die Homologien auch im Expressionsmuster und der subzellulären Lokalisation manifestieren, wurden die Vertreter der TPK-Familie aus *Arabidopsis* näher betrachtet.

Die TPKs 1, 2, 3 und 5 werden ubiquitär in fast allen Gewebetypen der Pflanze exprimiert, auch wenn sich die Expressionsstärke zum Teil erheblich unterscheidet (siehe 3.1.; Abb. 3.1.). Dies wurde sowohl durch Promotor-GUS-Studien als auch durch RT-PCR gezeigt. So findet man von TPK1 und TPK3 annähernd gleich hohe Transkriptmengen in Blättern, Blüten, Infloreszenzachsen und Schoten von *Arabidopsis thaliana*, während das Expressionsniveau dieser beiden Kanäle in Wurzeln etwas reduziert ist im Vergleich zu den anderen Geweben. Auch TPK5 wird in allen untersuchten Geweben gefunden, wenn auch das Transkriptionsniveau unter dem von TPK1 und TPK3 liegt. Geringe Transkriptmengen von TPK2 lassen sich in Infloreszenzachsen, Blüten und Schoten finden. Der einzige Vertreter der K_{ir} -ähnlichen Kanäle in *Arabidopsis*, KCO3, wird in vielen Gewebetypen wie Blättern und Wurzeln schwach exprimiert. Somit ist es wahrscheinlich, dass diese Kanäle in der Pflanze eine eher generelle als eine auf ein Gewebe- bzw. einem Zelltyp spezialisierte Aufgabe übernehmen. Dies lässt gleichzeitig den Schluss zu, dass diese TPKs zusammen mit KCO3, ein überlappendes Aufgabenspektrum innerhalb der Pflanze übernehmen könnten, wobei TPK1 und TPK3 aufgrund ihrer hohen Expression zu den wichtigsten Vertretern dieser Kanalfamilie gehören dürften. Im Gegensatz dazu findet man TPK4, genau wie die tierischen Vertreter der KCNK-Familie, nur in bestimmten Geweben exprimiert. TPK4 wird (siehe 3.1.; Abb. 3.1.), zusammen mit den *Shaker*-Kanälen SKOR, GORK, AKT1, 5 und 6, ausschließlich im Pollen von *Arabidopsis* exprimiert. Es ist daher wahrscheinlich, dass TPK4 dort eine sehr spezialisierte Aufgabe erfüllen muss, genau wie die tierischen Vertreter, welche im Gehör, Herz bzw. ZNS exprimiert werden und dort eine sehr spezielle Aufgabe

4. Diskussion

erfüllen, wie z.B. die mechanosensitive Weiterleitung von Signalen im Gehör vermitteln.

Für das Verständnis der Funktion eines Proteins und dessen integrative Rolle im physiologischen System eines Organismus ist es häufig wichtig auch die subzelluläre Lokalisation zu kennen. Die TPKs 1, 2, 3 und 5 sind allesamt im Tonoplasten und in lysosomal-vakuolären Vesikeln lokalisiert (siehe 3.1.2.; Abb. 3.2.). Durch das überlappende räumliche Expressionsmuster und die überlappende subzelluläre Expression stellt sich die Frage, ob es sich bei den pflanzlichen TPKs um Homo- bzw. Heterodimere handelt. Diese Frage ist bis heute nicht befriedigend geklärt, genauso wenig wie die Frage, ob diese Kanäle wirklich als Dimere vorkommen. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass es sich bei den TPKs um dimere Proteine handelt, da 4 kaliumselektive Porenregionen benötigt werden, um einen funktionellen Kaliumkanal zu bilden und somit zwei TPK-Untereinheiten ausreichen würden. Erste Studien mit BIFC-Konstrukten deuten auf Homodimere hin (Völker et al., 2006). Dadurch stellt sich nun die Frage, welche unterschiedlichen Aufgaben und welche physiologische Relevanz die TPKs in der Pflanze zu erfüllen haben, die sowohl in dem selben Membransystem vorkommen, als auch in den selben Geweben exprimiert werden. Gerade TPK1 und TPK3 zeigen hohe transkriptionale Aktivität in Mesophyllzellen von Blättern und Schließzellen (siehe 3.1.; Abb. 3.1.). Im Falle einer Heterodimerisierung könnten unterschiedliche Kombinationen von Untereinheiten modulatorisch auf den vermittelten Strom wirken bzw. die differentielle Regulation durch second-messenger wie Calcium, Kinasen, Phosphatasen und 14-3-3-Proteinen beeinflussen.

TPK4 hingegen ist, wie alle tierischen Vertreter der KCNKs, in der Plasmamembran lokalisiert (siehe 3.1.2.; Abb. 3.2.). Zusammen mit der ausschließlichen Expression im Pollen ist somit eine spezialisierte Funktion im keimenden Pollenschlauch von *Arabidopsis* zu vermuten. Auch die tierischen Vertreter üben durch ihre begrenzte Expression in wenigen distinkten Gewebe- und Zelltypen eine spezialisierte Funktion aus, die über spezielle Mechanismen reguliert werden. Eventuell kommen ähnliche Regulationsmechanismen auch bei dem in der Plasmamembran der Pflanze lokalisierten TPK4 zum Tragen.

4. Diskussion

Eine weitere Frage, die sich stellt, ist, wie TPK4 und die restlichen TPKs zwischen den unterschiedlichen Membranen diskriminieren, also welche Merkmale die Kanäle auszeichnen, damit sie in die Plasmamembran bzw. den Tonoplasten integriert werden. Aus dem tierischen System ist bekannt, dass hier das Targeting der KCNKs von der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen abhängig ist. Da nur die im Tonoplasten lokalisierten pflanzlichen TPKs ein konserviertes „mode1“-Bindemotiv für 14-3-3-Proteine haben, welches dem Plasmamembran-lokalisierten TPK4 fehlt (siehe 3.3.2.; Abb. 3.14.), liegt die Vermutung nahe, dass auch im pflanzlichen System die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen eine wichtige Aufgabe bei der Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Membransystemen spielen könnte. Ferner ist von einigen pflanzlichen Proteinen bekannt, dass die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen eine Funktion beim Targeting dieser Proteine in Mitochondrien (Alam et al., 1994), Chloroplasten (Gong et al., 2006; Jarvis et al., 2002) und den Zellkern (Bihn et al., 1997, Fulgosi et al., 2002) hat. Allerdings zeigten weder Mutationen im 14-3-3-Bindemotiv von TPK1, 2 und 5 (siehe 3.1.3.; Abb. 3.3.) noch das Hinzufügen bzw. komplette Entfernen des 14-3-3-Bindemotivs bei chimären TPK1-NT4 und TPK4-NT1 (siehe 3.1.4.; Abb. 3.5.) eine Änderung in der subzellulären Lokalisation. Das Targeting der pflanzlichen TPKs und die Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Membransystemen ist also in der Pflanze, im Gegensatz zum tierischen System, komplett unabhängig von der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen. Das macht eine Funktion dieser Interaktion bei der Regulation der Kanalaktivität wahrscheinlich, ähnlich wie bei der ebenfalls im Tonoplasten lokalisierten Protonen-ATPase. Außerdem zeigen die Studien in dieser Arbeit, dass der komplette N-Terminus beim Targeting keine Rolle spielt (siehe 3.1.4.; Abb. 3.5.).

Ein weiterer Unterschied zwischen dem plasmamembranständigen Kanal TPK4 und den restlichen TPKs im Tonoplasten ist das Vorhandensein von calciumbindenden EF-Händen im C-Terminus der vakuolären Kanäle (siehe 3.3.; Abb. 3.10.). Dass diese EF-Hände allerdings einen Einfluss auf das differentielle Targeting haben, ist eher unwahrscheinlich. Bisher wurde kein Targeting-Mechanismus für Membranproteine beschrieben, der über Calcium als direkten Signalgeber funktioniert. Erste Studien deuten auch eher auf eine Rolle bei der Modulation der Kanalaktivität hin als auf eine Rolle beim Targeting. Somit sind die Mechanismen des Targetings und die Dimärstruktur der TPKs weiterhin unklar und werden aktuell durch die Arbeiten von Marcel Dunkel weitergehend analysiert.

4. Diskussion

4.2. Funktion von TPK1 und TPK4

In vivo Analysen haben unterschiedliche funktionelle Typen von Ionenkanälen in pflanzlichen Geweben und Zellen identifiziert. Das *Arabidopsis*-Genom enthält ca. 70 Gene für Ionenkanäle, von denen 57 möglicherweise kationenselektive Kanäle repräsentieren (K^+ ; Ca^{2+} oder schwach diskriminierende Kanäle). Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren ist die K^+ -Kanalaktivität die Hauptdeterminante der elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen. Die 57 putativen Kationenkanäle können 6 Familien zugeordnet werden, den *Shaker*-Kanälen, KCNK, K_{ir} , CNGC, GLR und TPC. Die tierischen Vertreter der KCNK-Familie besitzen einen hydrophoben Kern aus 4 transmembranen Segmenten (ohne einen Spannungssensor) und zwei Porendomänen mit einem Selektivitätsfilter für Kalium. Diese strukturellen Merkmale finden sich auch bei den pflanzlichen Vertretern der TPK-Familie. Für die meisten Mitglieder der KCNKs wurde gezeigt, dass es sich um Kalium-Leckstromkanäle handelt, ihre Offenwahrscheinlichkeit also unabhängig von der Membranspannung ist. Mitglieder dieser Familie wurden in Hefen, im Mensch und in *Drosophila* beschrieben (Goldstein et al., 1996; Ketchum et al., 1995; Lesage et al., 1996a) und als dimere Proteine diskutiert (Lesage et al., 1996b). In *Arabidopsis* teilen 5 Kanäle (TPK1, 2, 3, 4, 5) strukturelle Homologien mit diesen tierischen Kanälen der KCNK Familie. Die tierischen Vertreter der Tandem-Poren-Kalium-Kanäle sind, im Gegensatz zu den pflanzlichen Vertretern, allesamt in der Plasmamembran lokalisiert. Dort vermitteln diese Hintergrund- bzw. Leck-Kaliumströme. Die Kanäle TASK-1 (KCNK3) und TASK-3 (KCNK9), welche in Plasmamembranen von Herz und Hirn vorkommen, werden z.B. in ihrer Aktivität durch Protonen, Temperatur, Anästhetika und Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionswege moduliert (Goldstein et al., 2001; Patel et al., 2001). TREK1-Aktivität wird durch mechanische Membranspannung reguliert. TASK1 und TASK2 werden durch Lidocain und externe Ansäuerung inhibiert. Im Vergleich dazu ist zumindest für TPK4 ebenfalls eine Regulation über den cytosolischen pH-Wert und die Temperatur beschrieben worden (Becker et al., 2004). Allerdings zeigt TPK1 nur eine schwache Sensitivität gegenüber mechanischen Änderungen der Membranspannung.

4. Diskussion

4.1.2. TPK4 in der Plasmamembran

Der in der Plasmamembran lokalisierte TPK4 zeigt auffällige funktionelle Ähnlichkeiten mit den tierischen Vertretern der KCNKs in elektrophysiologischer Hinsicht. Es handelt sich bei TPK4 wie bei den tierischen Vertretern der KCNK-Familie um einen spannungsunabhängigen, kaliumselektiven, schwach gleichrichtenden Kanal, der sowohl bei hyperpolarisierenden als auch bei depolarisierenden Spannungen instantane Kaliumströme vermittelt mit einer Leitfähigkeit von 68-70pS. Der Grund für die schwache Gleichrichtung des Kanals dürfte nicht in der Spannungsabhängigkeit für die Offenwahrscheinlichkeit liegen, sondern eher in der geringen Einzelkanalleitfähigkeit von TPK4 bei positiven Spannungen (Becker et al., 2004).

TPK4 zeichnet sich durch eine hohe Selektivität gegenüber Kalium aus und kann durch Cäsium geblockt werden (siehe 3.2.2.; Abb. 3.9.). Für Natrium hingegen ist TPK4 fast komplett impermeabel. Extrazelluläres Calcium führt zu einer Inaktivierung des Kanals. Wie bei einigen tierischen Homologen wird TPK4 durch den pH-Wert reguliert, da er durch cytoplasmatische Protonen über eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit inhibiert wird. Allerdings werden die tierischen Vertreter der schwach einwärtsgerichteten TWIK-Familie (wie TREK-1) zwar auch über den cytosolischen pH-Wert reguliert, aber eine Ansäuerung des Cytoplasmas führt zu einer Aktivierung dieser Kanäle (Maingret et al., 1999). Zumindest der Mechanismus der pH-Wahrnehmung scheint bei tierischen und pflanzlichen Vertretern der Zweiporenkaliumkanalfamilie gleich zu sein, auch wenn die Auswirkungen in gegensätzliche Richtungen verlaufen. Anders als die TREK-Kanäle reagiert TPK4 wenig bis gar nicht auf mechanische Änderungen in der Membranspannung. TPK4 wird wie die TREK Kanäle durch Erhöhung der Temperatur aktiviert. Er übt eine Funktion bei der Kaliumhomeostase und der Kontrolle der Membranspannung im wachsenden Pollenschlauch aus. Die elektrischen Eigenschaften der Pollenschlauchplasmamembran zeichnen sich durch 3 Leitfähigkeiten aus:

4. Diskussion

1. langsam aktivierende, auswärtsgleichrichtende Ströme bei depolarisierten Membranspannungen;
2. zeit- und spannungsabhängige Einwärtsströme bei hyperpolarisierten Membranspannungen und
3. instantane, spannungsunabhängige Ströme.

Die instantane Komponente ist bei Pollen von *tpk4*-Verlustmutanten verschwunden (Becker et al., 2004), wodurch es wahrscheinlich ist, dass TPK4 für die Vermittlung der spannungsunabhängigen Hintergrundströme im Pollen verantwortlich ist.

4.2.2. Ionenkanäle der Vakuolenmembran

Pflanzliche Zellen besitzen eine große saure Zentralvakuole, die bis zu 90% des Volumens ausmachen kann. Dieses Organell spielt eine wichtige Rolle bei der Ionenhomeostasis, pH-Regulation, bei Calciumsignalen und beim Proteinabbau. Die Zentralvakuole spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation des Turgors durch die Aufnahme und Abgabe von Kalium (Humble and Raschke, 1971; MacRobbie, 1981,1990) und Anionen (MacRobbie, 1981). In der Vakuole gespeichertes Kalium ist einer der Hauptbestandteile des zellulären osmotischen Drucks, und trägt zur Regulation des Zellvolumens und Turgors bei. Dadurch spielt es eine wichtige Rolle beim pflanzlichen Wachstum, der Antwort auf osmotischem Stress und bei spezialisierten Funktionen wie der Stomatabewegung. In der Membran der Vakuole befinden sich eine Reihe von Ionenkanälen. Bei den kationenselektiven Kanälen kann aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften in der Vakuolenmembran zwischen SV-Kanälen, FV-Kanälen und VK-Kanälen unterschieden werden.

Zwei Hauptströme im Tonoplasten werden durch nichtselektive Kationenkanäle vermittelt, die so genannten SV-Kanäle (slowly-activating) und FV-Kanäle (fast activating) (Hedrich and Neher, 1987; Tikhonova et al., 1997; Allen et al., 1998; Dobrovinskaya et al., 1999).

FV-Kanäle sind permeabel für monovalente Kationen (Brüggemann et al., 1999) und werden durch erhöhte Konzentrationen von cytoplasmatischen Calcium inhibiert (Tikhonova et al., 1997). SV-Kanäle sind permeabel für mono- und divalente Kationen (Pottosin et al., 1997; Ward and Schroeder, 1994) wie Ca^{2+} und Mg^{2+} (Amodeo et al., 1994; Ward and Schroeder, 1994; Pottosin et al., 2001) und werden

4. Diskussion

durch erhöhte cytoplasmatische Calciumkonzentrationen aktiviert (Hedrich and Neher, 1987; Reifarth et al., 1994).

Die kaliumselektiven VK-Kanäle und die calciumpermeablen SV-Kanäle benötigen für die Aktivität erhöhte Konzentrationen von bis zu 100 μ M freiem cytosolischem Calcium (Ward and Schroeder, 1994; Allen and Sanders, 1996; Dobrovinskaya et al., 1999). Unter normalen cytosolischen Calciumbedingungen repräsentiert der FV-Kanal einen passiven Weg der Kaliumaufnahme/abgabe über die Vakuolenmembran (Allen and Sanders, 1996; Tikhonova et al., 1997; Allen et al., 1998; Brüggemann et al., 1999). Obwohl der FV-Kanal nur schwach zwischen monovalenten Kationen selektiert (Brüggemann et al., 1999), arbeitet er hauptsächlich als kaliumpermeabler Kanal. Die FV-Kanäle werden unter symmetrischen Kaliumbedingungen bei extremen Membranpotentialen aktiviert (Allen and Sanders, 1996; Tikhonova et al., 1997; Allen et al., 1998). Änderungen im cytosolischen Kalium verändern die Spannungsabhängigkeit der FV-Ströme in *Vicia faba* Schließzellen und Gerste-Mesophyll-Vakuolen (Allen and Sanders, 1996; Tikhonova et al., 1997). Alle vakuolären TPKs besitzen im C-Terminus Calcium bindende EF-Hände. Dies deutet auf eine direkte Regulation durch Calcium hin, wie sie auch für die SV-, FV- und VK-Kanäle beschrieben wurde. Gleichzeitig sind die TPKs wie die VK-Kanäle hochselektive Kaliumtransporter.

Die Schließung der Stomas benötigt den Efflux von Kalium aus der Zentralvakuole und über die Plasmamembran in das Cytosol. Mehr als 90% des freigesetzten Kaliums in Schließzellen während des Stomaschlusses kommen aus der Vakuole der Schließzelle. Erhöhte cytoplasmatische Calciumkonzentrationen scheinen ein Auslöser der Ionenefflux von Schließzellen zu sein. Ein spannungsunabhängiger, kaliumselektiver VK-Kanal scheint für diesen Ionenfluss verantwortlich zu sein (Ward 1994). Dieser Kanal zeigt eine Einzelkanalleitfähigkeit von 70pS bei symmetrischen Kaliumbedingungen von 100mM und eine hohe Selektivität von K^+ gegenüber NH_4^+ , Rb^+ , Na^+ , Li^+ und Cs^+ . Diese Eigenschaften decken sich mit denen von TPK1 (siehe 3.3. Abb. 3.11.). Vieles deutet auf eine zentrale Rolle des VK-Kanals bei der Initiation und Kontrolle des Kaliumefflux aus der Vakuole der Schließzelle und damit auch auf eine bei der Regulation des Stomaschlusses hin (Ward 1994). Unter der Annahme, dass TPK1 in der Vakuolenmembran von Schließzellen vorhanden ist, und viele Eigenschaften der VK-Kanäle teilt, kann man über die wichtige Rolle von TPK1 beim

4. Diskussion

Stomataschluss spekulieren. Untersuchungen am ABA-induzierten Stomataschluss in der *tpk1.3*-Verlustmutante könnten hierbei weitere Aufschlüsse ergeben. Die Aktivierung des VK-Kanals kann das Potential der Vakuolenmembran auf positivere Werte verschieben und dadurch den SV-Kanal aktivieren. Der SV-Kanal zeigt eine 3,1-fach höhere Leitfähigkeit von Ca^{2+} gegenüber K^+ , was darauf hindeuten könnte, dass er eine Rolle beim Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Efflux während des Stomataschlusses spielt.

SV-Kanäle werden nur bei Membranspannungen von mehr als 0mV aktiviert (Hedrich and Neher, 1987). Durch den großen Calciumgradienten über der Vakuolenmembran würde eine Aktivierung von Calciumkanälen zu einem Ausstrom von Calcium aus der Vakuole in das Cytoplasma bedeuten. Deshalb könnte die Aktivierung der VK-Kanäle ein wichtiger Schritt bei der Kontrolle des Stomataschlusses sein, durch den Efflux von Kalium und die Depolarisation der Vakuolenmembran zu positiveren Werten, welche den SV-Kanal aktiviert, und die dadurch Calcium- und zusätzlichen Kaliumefflux erlaubt. SV-Kanäle wurden als nichtselektive, Ca^{2+} -aktivierte, spannungsabhängige Kanäle der Vakuolenmembran beschrieben (Coyaud et al., 1987; Hedrich and Neher, 1987; Kolb et al., 1987; Colombo et al., 1988; Hedrich and Kurkdjian, 1988; Maathuis and Prins, 1990; Weiser et al., 1991).

VK-Kanäle werden ebenfalls durch erhöhte Calciumkonzentrationen aktiviert (Allen and Sanders, 1996; Ward and Schroeder, 1994). Der VK-Kanal ist wie TPK1 spannungsunabhängig und praktisch impermeabel für andere monovalente Kationen außer Kalium.

Weder FV-Kanäle noch SV-Kanäle können gut zwischen K^+ und Na^+ unterscheiden, TPK1 hingegen schon. Der einzige kaliumselektive Kanal im Tonoplasten ist der VK-Kanal (Ward and Schroeder, 1994; Allen et al., 1998). Kaliumefflux aus der Vakuole kann nur durch den spannungsunabhängigen VK-Kanal und dem SV-Kanal erfolgen, welcher bei nichtphysiologischen Potentialen des Tonoplasten öffnet (Cytoplasma positiv). Der SV-Kanal wird wie TPK1 ubiquitär exprimiert und wurde zuerst in Vakuolen von Gerste und Zuckerrüben vakuolen beschrieben (Hedrich und Neher 1987) und weiteren Analysen unterzogen (Ward & Schroeder 1994; Allen & Sanders 1995, 1996; Schulz-Lessdorf & Hedrich 1995; Ward et al. 1995).

Der SV-Kanal wird bei Werten zwischen 100-600nM cytoplasmatischen Calciums aktiviert und öffnet spannungsabhängig bei positiven Potentialen auf der

4. Diskussion

cytoplasmatischen Seite. Da unter physiologischen Bedingungen das Potential auf der cytoplasmatischen Seite negativ ist, ist der SV-Kanal unter Standardbedingungen geschlossen. Der Wechsel zu positiven Potentialen könnte durch den VK-Kanal induziert werden, einem, wie TPK1 auch, kaliumselektiven, calciumaktivierten, aber spannungsunabhängigen Kanal des Tonoplasten. Ein durch ABA-induzierter Anstieg des cytosolischen pH-Wertes könnte zuerst den VK-Kanal aktivieren. Dadurch wird ein Kaliumefflux aus der Vakuole ins Cytoplasma generiert, welches das Potential so verschiebt, dass der SV-Kanal nun aktiviert wird, was zu einem weiteren Ausstrom von Kalium führen könnte (Pottosin et al., 1997).

Der SV-Kanal wird durch eine Reihe weiterer Faktoren moduliert wie Calmodulin, Phosphatasen, 14-3-3-Proteinen und Polyaminen. Auch TPK1 besitzt im N-Terminus ein konserviertes „mode 1“-Bindemotiv für 14-3-3-Proteine.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des SV-Kanals sind ähnlich zu denen des Hefekanals Yvc1p. Auch dieser wird durch cytosolisches Calcium, dem pH-Wert und Redoxzustand moduliert. (Hedrich and Neher, 1987; Reifarth et al., 1994; Schulz-Lessdorf and Hedrich, 1995; Carpaneto et al., 1999; Pottosin et al., 2001).

Durch die Depolarisation der Vakuolenmembran wird die treibende Kraft für den Kaliumefflux reduziert. Demnach benötigt ein lang anhaltender Kaliumausstrom Mechanismen, wie Protonen ATPasen, die zu einem negativen Membranpotential an der Vakuolenmembran führen (Sze et al., 1992; Rea and Poole, 1993). Die anhaltende Aktivierung von Protonenpumpen könnte zu einer Alkalisierung des Cytosols führen, welche häufig als Antwort auf ABA beobachtet wurde (Irving et al., 1992). Die VK-Kanäle zeigen, wie der plasmamembranständige TPK4, eine pH-Abhängigkeit. Bei alkalischen Bedingungen von pH8 konnten nur 25% der Kaliumströme gemessen werden, die bei pH7 vorliegen (Ward 1994).

Da alle pflanzlichen TPKs die typische Kaliumselektivitätssignatur (GYG) tragen, ist es unwahrscheinlich, dass diese Proteine, ob als Homomer oder Heteromer, zur nichtselektiven Leitfähigkeit der SV-Kanäle beitragen könnten.

Ein Verlust der SV-typischen Ströme in Mesophyllvakuolen von *Arabidopsis* konnte vor kurzem bei einer TPC1-Verlustmutante beobachtet werden. Diese SV-Ströme konnten durch Komplementation in den knockout-Pflanzen mit dem Wildtyp TPC1 rekonstituiert werden (Peiter et al., 2005). TPC1 besitzt kein GYG

4. Diskussion

Kaliumselektivitätsmotiv, was mit den nichtselektiven Strömen durch den SV-Kanal konform geht. TPC1 könnte eine Rolle bei der ABA-sensitiven Samenkeimung und Stomatabewegung spielen, da für beides cytoplasmatische Calciumsignale benötigt werden.

An isolierten Hefevakuolen konnte TPK1-Kanalaktivität von bis zu 8 Kanälen pro Vakuole gemessen werden (siehe 3.3.; Abb. 3.11.). Diese Ströme zeigen eine schwache Asymmetrie mit größeren Einwärtsströmen und schwächeren gesättigten Auswärtsströmen. Die Leitfähigkeit von TPK1 unter symmetrischen Kaliumbedingungen von 100mM war ähnlich der des SV-Kanals bei 75pS für Einwärtsströme und 40pS für Auswärtsströme (Biehler 2005). TPK1 wird durch cytoplasmatisches Calcium moduliert (siehe 3.3.1.2.; Abb. 3.13.) und nur bei hohen Konzentrationen von Calcium (5mM) ist dieser Kanal aktiviert, ähnlich den Charakteristiken des SV-Kanals (Hedrich and Neher, 1987; Reifarth et al., 1994). Im Gegensatz zu den SV-Kanälen ist die Offenwahrscheinlichkeit von TPK1 jedoch unabhängig von der Membranspannung (siehe 3.3.; Abb. 3.11.). Dies macht es unwahrscheinlich, dass TPK1 zu den SV-vermittelten Strömen beiträgt. Es konnte auch gezeigt werden, dass TPK1 ein spannungsunabhängiger und kaliumselektiver Kanal ist (siehe 3.3.; Abb. 3.11.), der durch erhöhte Konzentrationen von cytoplasmatischem Calcium (siehe 3.3.1.2.; Abb. 3.13.) und durch 14-3-3-Proteine aktiviert wird (siehe 3.3.2.4.; Abb. 3.19.). Dies entspricht den elektrophysiologischen und regulatorischen Eigenschaften des VK-Kanals. Eine charakteristische Eigenschaft der SV-Kanäle ist die Spannungsabhängigkeit mit einer sehr ausgeprägten Auswärtsgleichrichtung, die zwar auch durch Calcium aktiviert wird, allerdings durch 14-3-3 Proteine inhibiert wird. Die Zugabe von 14-3-3-Protein führte zu einer Reduzierung der Amplitude der SV-Kanal-Ströme in Gerstevakuolen von bis zu 80% (Van den Wijngaard et al., 2001). In den pflanzlichen Tandem-Poren-Kaliumkanälen sowie den tierischen Vertretern der KCNK-Familie existiert kein typischer Spannungssensor.

Die Deletion des *TPC1*-Gens in *Arabidopsis* führt nicht zu einem Verlust der für den SV-Kanal typischen, langsam aktivierenden Auswärtsströme. Durch Na⁺-getragene Ströme können beim TPK1-Kanal nicht beobachtet werden, da Na⁺-Ionen den Kanal weder von der vakuolären Seite der Membran ins Cytosol noch in die Gegenrichtung passieren können (siehe 3.3.; Abb. 3.11.). Im Gegensatz dazu unterscheidet der SV-Kanal praktisch nicht zwischen K⁺ und Na⁺; die Selektivität ist hier sehr gering

4. Diskussion

ausgeprägt. Für SV-Kanäle wird auch der Transport von zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} und auch von Anionen diskutiert (Pottosin et al., 2001). Somit ist es wahrscheinlich, dass der VK-Kanal molekular TPK1 zuzuordnen ist und TPK1 eine Rolle bei der Kaliumhomeostase, Turgorregulation, Stomatabewegung und Abwehr von Salzstress spielen könnte. Da die VK-Kanäle mit TPK1 in den charakteristischen Eigenschaften übereinstimmen, ist es durchaus denkbar, dass das Genprodukt von *TPK1* für die Aktivität der VK-Kanäle in pflanzlichen Vakuolen verantwortlich ist.

4.3. Regulation von TPK1

Transporter und Kanäle unterliegen einer strikten funktionalen Kontrolle, die sich nach internen und externen Gegebenheiten richtet. Diese Regulation der Aktivität ist wichtig für die Adaption an Veränderungen im Laufe des Lebenszyklus der Pflanze. Leckstromkanäle sind im tierischen System wichtig für die Einstellung eines Membranpotentials. Diese Kanäle sind spannungsunabhängige Kanäle. Aufgrund dessen benötigen sie andere Regulationsmechanismen um die Kanalaktivität zu modulieren. Im tierischen System werden die TPKs durch eine Reihe von Substanzen und Stimuli in ihrer Aktivität reguliert. Für die Regulation der Kanalaktivität von pflanzlichen Tandem-Poren-Kaliumkanälen können prinzipiell unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein, wie

1. Kontrolle der Genexpression,
2. der Zusammenbau aus unterschiedlichen Untereinheiten in einem heteromeren Komplex,
3. das differentielle „Targeting“ und „Trafficking“ der Kanäle,
4. der Phosphorylierungszustand der Kanäle,
5. die Interaktion mit Kofaktoren, β -Untereinheiten, Ionen, wie Calcium und anderen Proteinen, wie 14-3-3-Proteinen.

Bei TPK1 lassen sich keine großen Unterschiede im Expressionsprofil durch geänderte äußere Bedingungen erkennen (siehe 3.1.; Abb. 3.1.). Es scheint auch keine Regulation beim Trafficking von TPK1 zu geben (siehe 3.1.3.; Abb. 3.3. und 3.1.4.; Abb. 3.5.). Die Studien von Völker et al. aus dem Jahre 2006 deuten auf einen homomeren Kanalkomplex hin.

4. Diskussion

In der Sequenz von TPK1 findet man im N-Terminus ein konserviertes „mode1“-Bindemotiv für 14-3-3-Proteine (siehe 3.3.2.; Abb. 3.14.). Dieses Motiv muss am Serin 42 phosphoryliert sein, um die Bindung von 14-3-3-Proteinen zu ermöglichen. Die Kinase, die diese Phosphorylierung katalysiert, gehört zur Familie der calciumabhängigen Proteinkinase (CDPK) und ist selbst durch Calcium aktiviert (siehe 3.3.3.3.; Abb. 3.22.). Im C-Terminus von TPK1 befinden sich außerdem zwei calciumbindende EF-Hände (siehe 3.3.; Abb. 3.11.). Dies alles deutet auf eine direkte Regulation von TPK1 und der Kinase durch Calcium hin. Letztere phosphoryliert das 14-3-3-Bindemotiv, was zu einer Interaktion mit 14-3-3-Proteinen führt.

4.3.1. Calcium:

Falls es sich bei TPK1 wirklich um das molekulare Äquivalent des VK-Kanals handeln sollte, so muss man davon ausgehen, dass auch TPK1 durch erhöhte Konzentrationen von cytoplasmatischen Calcium aktiviert wird. In der Tat weist TPK1 am C-Terminus zwei konservierte EF-Hände auf, welche Calcium binden können. Dies deutet auf eine direkte Interaktion von TPK1 mit Calcium hin. Tatsächlich konnte durch Overlay-Experimente eine direkte Interaktion von TPK1 mit Calcium nachgewiesen werden (siehe 3.3.1.1.; Abb. 3.12.). Messbar war die Interaktion mit Calcium bis zu einer freien Calciummenge von $2,2\mu\text{M}$. Dieser Wert entspricht den benötigten Konzentrationen für die Aktivierung des VK-Kanals, die je nach Bedingung zwischen $1\mu\text{M}$ und $6\mu\text{M}$ Calcium liegen. In elektrophysiologischen Untersuchungen an Hefevakuolen konnte gezeigt werden, dass TPK1-Kanalaktivität nur in Anwesenheit von $1\mu\text{M}$ Calcium messbar ist (siehe 3.3.1.2.; Abb. 3.13.). Dies deutet auf eine Aktivierung von TPK1 durch eine direkte Interaktion mit Calcium hin. Die gemessenen und verwendeten Werte liegen allerdings weit über den cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen, die im Ruhezustand der Zelle vorliegen und welche bei $50\text{-}100\text{nM}$ freien cytoplasmatischen Calciums anzusiedeln sind. Es werden also erhöhte Calciumkonzentrationen für die Kanalaktivierung benötigt. Erhöhte Calciumkonzentrationen lassen sich unter anderem als Reaktion auf Stressfaktoren beobachten und werden häufig durch das Phytohormon ABA induziert. Somit lässt sich darüber spekulieren, ob die Aktivierung von TPK1 durch biotischen bzw. abiotischen Stress ausgelöst wird und eventuell über einen durch ABA-vermittelten Anstieg im cytosolischen Calciumgehalt vermittelt wird.

4. Diskussion

4.3.2. 14-3-3-Proteine:

14-3-3-Proteine sind saure ca. 30kD große Proteine, die sich in allen Eukaryonten finden lassen. Zuerst beschrieben und benannt wurden die 14-3-3-Proteine von Ward (1967). Ihnen werden mannigfaltige modulatorische Funktionen zugesprochen, wie Aktivierung/Deaktivierung von Zielproteinen, Modulation der Proteinaktivität in Bezug auf Substratspezifität von Enzymen und Beeinflussung des „Targetings“ von Proteinen. Eine Regulation durch 14-3-3-Proteine wurde auch am so genannten Slowpoke-K⁺-Kanal in *Drosophila* beobachtet (Zhou et al., 1999). Häufig werden sie auch in Zusammenhang mit der Modulation von Stressantworten gebracht.

Sowohl der SV-Kanal als auch der VK-Kanal wurden als Bindungspartner von 14-3-3-Proteinen beschrieben, wobei allerdings der SV-Kanal durch 14-3-3-Proteine inhibiert wird, während der VK-Kanal, wie TPK1 auch, durch 14-3-3-Proteine aktiviert wird.

TPK1 besitzt im N-Terminus ein typisches Bindemotiv für 14-3-3-Proteine. Durch „Pull-down“-Experimente (siehe 3.3.2.2.; Abb. 3.17.), Kolokalisationsstudien (siehe 3.3.2.1.; Abb. 3.15.) und „surface plasmon resonance“-Studien (siehe 3.3.2.3.; Abb. 3.18.) konnte eine Interaktion mit dem pflanzlichen 14-3-3-Protein GRF6 nachgewiesen werden, welche abhängig von der Phosphorylierung des Consensusmotivs ist. Der Austausch von Serin 42 mit Alanin im 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 resultierte in einer Inhibierung der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen in Kolokalisationsexperimenten (siehe 3.3.2.1.; Abb. 3.15.) und „Pull-down“-Analysen (siehe 3.3.2.2.; Abb. 3.17.). Dies konnte durch SPR-Daten mit einem mutierten SA-Peptid bestätigt werden (siehe 3.3.2.3.; Abb. 3.18.). Allerdings zeigten sich bei dem Austausch von Serin 42 mit Glutamat und den damit eingeführten negativen Ladungen, welche eine Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs vortäuschen könnten, widersprüchliche Daten. Sowohl in der Kolokalisation als auch in „Pull-down“-Analysen konnte eine Interaktion von GRF6 mit diesem mutierten 14-3-3-Bindemotiv nachgewiesen werden. Allerdings konnten diese Daten nicht durch SPR-Analysen mit einem SE-Peptid bestätigt werden (nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz mag sein, dass die Einführung von negativen Ladungen nicht ausreichend für die Interaktion ist, sondern auch flankierende Bereiche des Proteins die Interaktion bei der SE-Mutante stabilisieren müssen, welche bei dem verwendeten 24 Aminosäuren langen Peptid fehlen. Die Affinität von

4. Diskussion

GRF6 zu TPK1 ist mit einem KD-Wert von 1,1nM sehr hoch (siehe 3.3.2.3.; Abb. 3.18.), was auf eine sehr spezifische Interaktion schließen lässt, im Unterschied zu dem relativ hohen KD-Wert von GRF1 mit 18,9nM. Im Gegensatz zu einigen tierischen Vertretern der KCNK-Familie hat die Interaktion von TPK1 mit 14-3-3-Proteinen keine Auswirkung auf das Targeting der Kanäle (siehe 3.1.3.; Abb. 3.3.). Durch Mutationen im 14-3-3-Bindemotiv bzw. den Austausch der N-Termini zwischen TPK1 und TPK4 konnte keine Veränderung in der subzellulären Lokalisation der Kanäle erreicht werden (siehe 3.1.4.; Abb. 3.5.). In elektrophysiologischen Untersuchungen an Hefevakuolen konnte allerdings eine Aktivierung von TPK1 durch GRF6 beobachtet werden, welche in einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von 0,02 auf 0,6 resultierte (siehe 3.3.2.4.; Abb. 3.19.). GRF1 konnte keine Aktivierung von TPK1 bewirken (nicht gezeigt). Somit wird deutlich, dass TPK1 sowohl durch Calcium als auch durch das 14-3-3-Protein GRF6 aktiviert wird und damit die regulatorischen Eigenschaften des VK-Kanals besitzt. Diese Aktivierung ist nicht nur abhängig vom Phosphorylierungszustand der 14-3-3-Bindestelle von TPK1, sondern auch vom verwendeten 14-3-3-Isotyp. Die Regulation über 14-3-3-Proteine und Calcium ermöglicht es der Pflanze, in Abhängigkeit von Signalkaskaden über ein Kinase/Phosphatase System und einer Erhöhung des cytoplasmatischen Calciumspiegels, und womöglich über Phytohormone wie ABA, auf veränderte Umweltbedingungen mit einer Regulation des Kaliumstroms über die Vakuolenmembran zu reagieren.

4.3.3. Proteinkinasen:

Im Genom von *Arabidopsis* lassen sich 1085 Gene für typische Proteinkinasen finden. Dies sind ca. 4% der vorhergesagten 25500 Gene, was auf eine bedeutende funktionelle Rolle der Kinasen schließen lässt. Die Familie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPKs) besteht in *Arabidopsis* aus 34 Mitgliedern. Diese Serin/Threonin-Kinasen kommen nur in Pflanzen vor. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie bis zu 4 calciumbindende EF-Hände besitzen und somit über Calcium in ihrer Aktivität reguliert werden. Nur in Anwesenheit von Calcium kann bei Mitgliedern dieser Familie Kinaseaktivität gemessen werden (siehe 3.3.3.3.; Abb. 3.22.). Die Interaktion mit Calcium bewirkt eine Phosphorylierung in der autoinhibitorischen Domäne, was zur Aktivierung der Kinase führt. Diese Kinasen sind zwischen 43 und

4. Diskussion

72kD groß und weisen zum Teil Myristylierungs- und Palmitoylierungsstellen auf, was zur Interaktion mit Membranfraktionen führt (Ellard-Ivey et al., 1999; Martin and Busconi, 2000). Neben Calcium als Aktivator werden 14-3-3-Proteine und Phospholipide als putative Regulatoren diskutiert.

Einige Mitglieder der CDPKs werden ubiquitär exprimiert (Hong et al., 1996), während andere durch Hormone oder Stress induziert werden (Urao et al., 1994; Sheen, 1996). Die Expression der CDPKs kann durch Verwundung (Chico et al., 2002), Salz- oder Trockenstress (Botella et al., 1996; Patharkar and Cushman, 2000; Saijo et al., 2000), Kälte (Monroy and Dhindsa, 1995; Saijo et al., 2000), Phytohormone (Abo-El-Saad and Wu, 1995; Botella et al., 1996; Davletova et al., 2001), Licht (Frattini et al., 1999) und Pathogene (Murillo et al., 2001; Romeis et al., 2001) induziert werden. Daher werden diese Kinasen häufig mit einem durch Stress-induzierten Signaltransduktionsweg in Zusammenhang gebracht.

Durch erste Versuche konnte gezeigt werden, dass die Kinase, welche für die Phosphorylierung von TPK1 verantwortlich ist, ein Mitglied der CDPK-Familie ist (siehe 3.3.3.1.; Abb. 3.20.). Im weiteren Verlauf konnte *in vitro*-Kinaseaktivität bei rekombinanten und aufgereinigten Kinasen CPK3 und CPK29 festgestellt werden (siehe 3.3.3.2.; Abb. 3.21). Beide Kinasen zeigen ein überlappendes Expressionsmuster mit TPK1 (siehe 3.3.3.5.; Abb. 3.24.) und sind laut Kolokalisationsstudien im Cytoplasma lokalisiert (siehe 3.3.3.4.; Abb. 3.23.). Dadurch können sie mit dem N-Terminus von TPK1 interagieren und das 14-3-3-Bindemotiv in Anwesenheit von Calcium phosphorylieren. In Overlay-Experimenten konnte gezeigt werden, dass CPK3 und CPK29 direkt mit Calcium interagieren (siehe 3.3.3.3.; Abb. 3.22.). Kinaseaktivität konnte bis zu einer Konzentration von 1,9µM freiem Calcium für CPK3 und 0,25µM für CPK29 beobachtet werden. Die maximale Kinaseaktivität war bei 17µM freiem Calcium messbar. Dies deutet darauf hin, dass die Kinasen im Ruhezustand wie TPK1 auch, inaktiv sind und erst durch eine Erhöhung des cytosolischen Calciumspiegels aktiviert werden. Dies wird möglicherweise durch Faktoren wie Salzstress und Phytohormone wie ABA ausgelöst.

4.3.4. Proteinphosphatasen:

Die Regulation von Ionenkanälen bedarf neben der Aktivierung ebenso der Inaktivierung. Die über Calcium direkt gesteuerte Aktivierung von TPK1 und die

4. Diskussion

indirekte Aktivierung durch Kinasen, welche das 14-3-3-Bindemotiv phosphorylieren, dürfte von transienter Natur sein. Erhöhte Calciumwerte tauchen als Signal nur kurzfristig im Cytosol der Zelle auf und werden durch Calciumtransporter und Kanäle wieder ausgeglichen. Die Interaktion von GRF6 mit TPK1 bei einem K_d Wert von ca. $2,34 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und die Phosphorylierung des 14-3-3-Bindemotivs von TPK1 dürfte relativ stabil sein. Um die Aktivierung von TPK1 über die phosphorylierungsabhängige Interaktion mit GRF6 rückgängig zu machen, bedarf es einer Proteinphosphatase, welche das 14-3-3-Bindemotiv wieder dephosphoryliert. Bei dieser Kinase muss es sich um eine Serin/Threonin-Proteinphosphatase handeln. Die wichtigsten Vertreter dieser Phosphatasen in Arabidopsis sind die Vertreter der Familien der PP1, PP2A, PP2B und P2C. Mitglieder der PP1-Familie sind heterodimere Proteine und dafür bekannt, dass sie 14-3-3-Bindemotive dephosphorylieren können. Die Familie der PP2A setzt sich aus heterotrimeren Proteinen zusammen. Auch bei diesen Proteinphosphatasen ist bekannt, dass sie 14-3-3-Bindemotive dephosphorylieren können, wenn sich ein Arginin an Position -4 oder -3 befindet, was bei TPK1 mit dem Bindemotiv „RSRpSAP“ der Fall ist. Dieses Motiv ist häufig der Angriffspunkt für basophile Kinasen wie die CDPKs. Im tierischen System dephosphorylieren die PP2A die 14-3-3-Bindemotive von Kanälen und Transportern und werden zum Teil selbst durch Calcium und Magnesium in ihrer Aktivität reguliert. Mitglieder der PP2B Familie sind in ihrer Aktivität von Calmodulin abhängig. Die monomeren Mitglieder der PP2C werden häufig im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von Stresssignalen diskutiert. So ist bekannt, dass Mitglieder der PP2C in der Lage sind, die autoinhibitorische Domäne der CDPKs zu dephosphorylieren und dadurch die Kinase zu inaktivieren. Die Mitglieder dieser Familien lassen sich durch unterschiedliche Konzentrationen des Phosphataseinhibitors, Okadaic Acid, blockieren. Man benötigt bei den PP2C relativ hohe Konzentrationen im mikromolaren Bereich, um diese zu inhibieren, während bei den PP2A schon relativ geringe Konzentrationen im nanomolaren Bereich ausreichen, um diese zu inhibieren. Durch einen Phosphatase-Assay bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen konnte festgestellt werden, dass es sich bei der Phosphatase, welche das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 dephosphoryliert, um ein Mitglied der PP2A-Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen handelt (siehe 3.3.4.1.; Abb. 3.25.). Genau diese sind auch dafür bekannt, im tierischen System Ionenkanäle am 14-3-3-Bindemotiv zu dephosphorylieren. Da sie zum Teil

4. Diskussion

selbst durch Calcium und Magnesium reguliert sind, lässt sich diese Phosphatasefamilie gut in das Schema der Regulation von TPK1 über Calcium, Phosphorylierung und 14-3-3-Interaktion einpassen. Weil es sich bei den PP2A um heterotrimere Proteine handelt, ist eine weitere Evaluation auf molekularer Ebene äußerst schwierig. Möglicherweise könnte ein Ansatz über die katalytische Untereinheit hier Erfolg bringen, da in Arabidopsis nur 5 katalytische Untereinheiten beschrieben sind. Durch Verlustmutanten dieser Untereinheiten wäre man in der Lage, eventuell die katalytische Untereinheit zu identifizieren und könnte auch die für den Zusammenbau notwendige und die regulatorische Untereinheit identifizieren. Im Falle der PP2C wäre es denkbar, dass ein Mitglied dieser monomeren Phosphatasen in der Lage ist, die Kinasen CPK3 und CPK29, welche das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 phosphorylieren, zu inaktivieren und dadurch eine weitere Aktivierung des Kanals zu verhindern. Dies bedarf allerdings weiterführender Analysen.

4.4. Eingliederung von TPK1 in die Kaliumhomeostase und Stressphysiologie der Pflanze

Kälte, Trockenheit und Salzstress sind die üblichen abiotischen Stressbedingungen, welchen Pflanzen ausgesetzt sind, die das Wachstum negativ beeinflussen. Die zellulären und molekularen Antworten auf Stress sind seit langem Bestandteil intensiver Forschungen (siehe z.B. Thomashow, 1999; Hasegawa et al., 2000). Das Verstehen der Mechanismen, durch welche die Pflanze den Stress wahrnimmt und diese Signale an die zelluläre Maschinerie weiterleitet, ist von fundamentaler Bedeutung.

Kältestress kann die Aktivität von Makromolekülen beeinflussen und das osmotische Potential der Zelle reduzieren. Salzstress hat sowohl eine ionische (chemische) als auch osmotische (physikalische) Komponente. Viele Stressfaktoren führen zu einer transienten Erhöhung des cytoplasmatischen Calciumlevels. Dieses Signal kann durch verschiedene Calcium-bindende-Proteine wahrgenommen und verarbeitet werden. Im Falle von abiotischem Stress könnten Proteinkinasen wie die CDPKs und die SOS3-Familie Sensoren für dieses Calciumsignal sein und die Information in einer spezifischen Proteinphosphorylierungs-Kaskade weiterverarbeiten. Eine Reihe von Studien belegen, dass die CDPKs durch abiotischen Stress aktiviert werden, und dass sie eine Rolle bei der Signaltransduktion von Stresssignalen spielen (Urao et

4. Diskussion

al., 1994; Pei et al., 1996; Tahtiharju et al., 1997; Hwang et al., 2000). In Reis wird eine CDPK durch Kälte aktiviert (Martin and Busconi, 2001) und die Überexpression von OsCDPK7 führt zu Toleranz gegenüber Kälte- und osmotischem Stress (Saijo et al., 2000). Für eine Proteinphosphatase der PP2C-Familie wurde gezeigt, dass sie den Effekt der AtCDPK1-Aktivierung blockieren kann (Sheen, 1996, 1998), wobei unklar ist, ob die Phosphatase direkt auf die Kinase wirkt oder down-stream Prozesse in der Phosphorylierungs-Kaskade reguliert. Die Inaktivierung dieser Phosphatase führt zu einer besseren Akklimatisierung der Pflanze gegenüber Kälte (Tähtiharju and Palva 2001).

Die SOS3-Familie ist eine weitere Gruppe wichtiger Calciumsensoren. SOS3 ist homolog zur regulatorischen Untereinheit des Hefe-Calcineurins (CNB) und zu tierischen neuronalen Calciumsensoren (Liu and Zhu, 1998). Loss-of-function Mutanten im SOS3-Gen zeigen eine Hypersensitivität gegenüber NaCl. Dieser Effekt lässt sich durch erhöhte Konzentrationen von extrazellulärem Calcium ausgleichen (Liu and Zhu, 1997a). Calcium inhibiert die Natrium-Toxizität, wahrscheinlich durch eine Blockierung der nicht-selektiven Kationenkanäle. Nach Aktivierung des Calcium-bindenden-Proteins SOS3, stimuliert die Proteinkinase SOS2 die Na^+/H^+ -Austauschaktivität von SOS1 in der Plasmamembran. Überexpression von SOS1 führt zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress (Ward 2003). Auch der Na^+ -Transporter AtHKT1 könnte Ziel der SOS-Maschinerie sein (Uozumi et al., 2000). In *Arabidopsis* unterdrücken Mutationen im AtHKT1-Gen den hypersensitiven *sos3*-Phänotyp auf Salzstress (Rus et al., 2001), was bedeuten könnte, dass SOS3 die AtHKT1-Aktivität als Natrium-Influxtransporter inhibieren könnte.

Die vakuoläre Kaliumkonzentration weist *in vivo* höhere Schwankungen auf als die cytoplasmatische. Unter Kaliummangelbedingungen wird der Kaliumgehalt im Cytosol relativ konstant gehalten auf Kosten des vakuolären Kaliumgehalts (Leigh and Wyn Jones, 1984; Walker et al., 1996). Abgänglich von der Verfügbarkeit von Nährstoffen und dem metabolischen Status der Pflanze kann Kalium auch durch andere Kationen und Nichtelektrolyten ausgeglichen werden (Leigh, 1997). Für die Aufrechterhaltung des osmotischen Zustandes kann Kalium z.B. durch Saccharose ersetzt werden (Talbot and Zeiger, 1996).

Transporter und Kanäle im Tonoplasten sind an der Salztoleranz, der Schwermetall-Homeostase, den Calciumsignalen, den Stomatabewegungen und der pH-Homeostase beteiligt. Vakuoläre Transporter und Kanäle wie TPK1 sind integraler

4. Diskussion

Bestandteil eines komplexen Netzwerks, welches es den Pflanzen erlaubt auf wechselnde äußere Bedingungen zu reagieren. In allen Vakuolen finden sich Protonen-ATPasen (V-ATPase; Sze et al., 1999), Protonen-translozierende anorganische Pyrophosphatasen (V-PPasen; Maeshima, 2000, 2001; Drozdowicz and Rea, 2001), TIP-ähnliche Aquaporine (King et al., 2004; Luu and Maurel, 2005), die Na^+/H^+ -Antiporter NHX (Yokoi et al., 2002; Aharon et al., 2003), Calcium-ATPasen (Geisler et al., 2000a, b) und die vakuolären Kaliumkanäle des SV-, FV-, und VK-Typs.

Unter Salzstressbedingungen muss das Natrium, welches durch Kationenkanäle der Plasmamembran in die Zelle eindringt, aus dem Cytosol entfernt werden, um das K^+/Na^+ -Verhältnis in diesem Kompartiment aufrechtzuerhalten. Salzstress ist darüber hinaus gleichbedeutend mit hypertonischem Stress. *Beta vulgaris* ist in der Lage Natrium gegen einen 10fachen Konzentrationsgradienten in der Vakuole zu speichern (Blumwald et al., 2000). Um den passiven Ausstrom von Natrium aus der Vakuole zu verhindern, dürfen nur kaliumselektive Kationenkanäle wie TPK1 unter Salzstressbedingungen in der Vakuole aktiv sein.

Für lang anhaltende Natriumakkumulation in der Vakuole muss die Ionentransportmaschinerie elektronenneutral agieren. Der Efflux von Kalium aus der Vakuole könnte nicht nur zu dieser Elektroneutralität beitragen, sondern auch das K^+/Na^+ -Verhältnis im Cytosol verbessern. In der Vakuole ist bisher nur der VK-Kanal als hochselektiver Kaliumkanal bekannt. Die VK-Kanäle benötigen für ihre Aktivität wie TPK1 auch erhöhte Calciumkonzentrationen, genauso wie SOS3 und andere Elemente der Salzstressabwehr (Halfter et al., 2000). Salzstress ist dafür bekannt eine transiente Erhöhung des cytosolischen Calciumlevels auszulösen (Knight et al., 1997). Der VK-Kanal könnte außerdem einen Ausgleichsstrom für die vakuolären Protonen-ATPase unter Salzstressbedingungen, wie auch für den Na^+/H^+ -Antiporter NHX1 bereitstellen (Darley et al., 2000). Überexpression von NHX1 führt zu einer erhöhten Salztoleranz (Apse et al., 1999), wobei die vakuoläre Na^+/K^+ -Austauschfunktion abhängig von der Anwesenheit von SOS1 und SOS2 ist (Qiu et al., 2004). Akkumulation von Natrium oder Kalium in der Vakuole beeinflusst den pH-Wert der Vakuole und führt zur Alkalisierung und Erhöhung des osmotischen Drucks.

Wie oben beschrieben ist es wahrscheinlich, dass TPK1 den VK-Kanälen des Tonoplasten zugeordnet werden kann, von denen bekannt ist, dass sie eine wichtige

4. Diskussion

Rolle bei der Verarbeitung von Stresssignalen ausüben. Behandelt man Pflanzen mit Salzstress wie 150mM NaCl oder KCl, so ist unter diesen Bedingungen eine Phosphorylierung im 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 zu beobachten (siehe 3.3.5.1.; Abb. 3.26.). Diese Phosphorylierung bewirkt eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen (siehe 3.3.2.2.; Abb. 3.17.) und dadurch eine Aktivierung von TPK1 (siehe 3.3.2.4.; Abb. 3.19.). Die Phosphorylierung von TPK1 wird womöglich ausgelöst durch eine Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration, vermittelt durch den Salzstress, was in einer Aktivierung der CDPKs resultiert (siehe 3.3.3.3.; Abb. 3.22.). Gleichzeitig aktiviert erhöhtes cytoplasmatisches Calcium TPK1 direkt über die EF-Hände (siehe 3.3.1.2.; Abb. 3.13.). Bei durch Salz gestressten Pflanzen kann deshalb von einem aktivierten TPK1-Kanal ausgegangen werden und damit einhergehend von einem Ausstrom von Kalium aus der Vakuole in das Cytoplasma, um das Na^+/K^+ -Verhältnis konstant zu halten und damit die cytoplasmatische Kaliumhomeostase zu gewährleisten und um bei Aufnahme von Natrium in die Vakuole, die Elektroneutralität sicherzustellen. Unter Normalbedingungen und bei 150mM Sorbitol ist keine Phosphorylierung von TPK1 zu beobachten (siehe 3.3.5.1.; Abb. 3.26.). Damit dürfte TPK1 unter diesen Bedingungen inaktiv sein, was bedeutet, dass der Kanal unter Standardbedingungen inaktiv ist, und dass osmotischer Stress und damit ein physikalischer Reiz allein nicht ausreicht, um TPK1 zu aktivieren, sondern dass zusätzlich eine chemische Komponente über Natrium- bzw. Kaliumionen vorhanden sein muss.

In Keimungsversuchen konnte gezeigt werden, dass *tpk1.3*-Verlustmutanten unter Salzstress deutlich schlechter keimen als der korrespondierende Wildtyp (siehe 3.3.5.2.; Abb. 3.27.). Ein geringer Effekt konnte bei *cpk3.1*-knock-out Pflanzen beobachtet werden. Dieser Effekt ist bei *tpk1.3* deutlicher bei moderaten Natriumkonzentrationen von 50mM NaCl als bei hohen Konzentrationen von 150mM NaCl ausgeprägt. Bei hohen Konzentrationen weist auch der Wildtyp eine Reduktion der Keimungsrate auf, während bei moderaten Konzentrationen die Keimung bei Wildtyppflanzen in etwa der der unbehandelten Pflanzen entspricht. Bei *cpk3.1* hingegen kommt die Reduktion der Keimungsrate besonders deutlich bei 150mM NaCl zum Tragen. Auch eine Limitierung des angebotenen Kaliums auf 50 μ M im Medium führt zu einer Reduktion der Keimung bei *tpk1.3*- und *cpk3.1*-Verlustmutanten wobei auch hier der Phänotyp bei den *tpk1.3*-Pflanzen deutlicher ausgeprägter ist als bei den *cpk3.1*-Pflanzen und sogar den Effekt von moderatem

4. Diskussion

Salzstress übertrifft. Wird nun Salzstress zusammen mit einem limitierten Kaliumangebot angewendet, so lässt sich bei moderatem Natriumstress eine deutliche Reduktion der Keimungsraten von *cpk3.1* erkennen, während die Keimungsrate von *tpk1.3* im Vergleich zu moderatem Salzstress bzw. zu limitiertem Kaliumangebot allein sogar etwas steigt, wenngleich sie nicht die Keimungsraten des korrespondierenden Wildtyps unter diesen Bedingungen erreicht. Bei hohem Salzstress und gleichzeitig limitiertem Kaliumangebot ist auch die Keimungsrate des Wildtyps extrem reduziert, so dass der phänotypische Unterschied in der Keimungsrate im Vergleich zu den Mutanten nicht mehr ganz so prominent ist. Auch unter diesen Bedingungen zeigen *tpk1.3*, und noch stärker *cpk3.1*, eine Reduktion in der Keimung auf.

Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass TPK1 sowohl für die Kaliumhomeostase als auch für das Na^+/K^+ -Verhältnis im Cytoplasma verantwortlich sein könnte. Darüberhinaus könnte TPK1 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Elektroneutralität des Tonoplasten bei Aufnahme von Natrium aus dem Cytoplasma in die Vakuole spielen, genau die Funktion, die für den VK-Kanal postuliert wurde. Dabei muss TPK1 mit den anderen Transportern und Kanälen des Tonoplasten funktional vernetzt sein. So wäre z.B. ein funktionaler Komplex aus TPK1 und dem SV-Kanal TPC1 unter Salzstressbedingungen denkbar.

Der SV-Kanal erlaubt die Aufnahme von Natrium aus dem Cytoplasma in die Vakuole, in gegenläufiger Richtung kann Natrium allerdings nicht TPC1 passieren, was auf eine Rolle von TPC1 bei der entgiftenden Speicherung von Natrium in der Vakuole hindeuten könnte.

Da SV-Kanäle durch 14-3-3-Proteine inhibiert werden (Van den Wijngaard et al., 2001), TPK1 aber durch 14-3-3 aktiviert wird, wäre hiermit ein Regulationsmechanismus gegeben, der die Leitfähigkeit der vakuolären Membran für Na^+ herabsetzt und für K^+ erhöht. Eine solche Verschiebung der Selektivität des Tonoplasten würde die K^+ -Homeostase zwischen Vakuole und Cytosol gewährleisten, während der Rückfluss von Na^+ -Ionen aus der Vakuole ins Cytosol verhindert wird.

4. Diskussion

4.5 Pflanzenbasiertes Expressionssystem

Informationen über die funktionellen Eigenschaften von Kanälen wurden meist über die Expression in heterologen Systemen (*Xenopus*-Oocyten; Insekten- und Säugerzellen und Hefe) gewonnen. Allerdings könnte diese Strategie dazu führen, dass einige funktionelle Eigenschaften nicht erfasst werden können, da native regulatorische Proteine und Signaltransduktionskaskaden nicht vorhanden sind bzw. durch endogene Strukturen im heterologen System die Funktionalität der Kanäle störend beeinflusst wird. Des Weiteren ist es vor allem bei vakuolären Kanälen häufig der Fall, dass diese nicht funktionell exprimiert werden können, da die Zielmembran im tierischen Expressionssystem nicht vorhanden ist. Auch einige pflanzliche Plasmamembrankanäle konnten bisher noch nicht erfolgreich heterolog im tierischen System exprimiert werden.

Um diese Probleme zu überwinden wurde versucht ein möglichst homologes System zur Expression von Transportern und Kanälen zu etablieren, welches sich gleichzeitig durch einfache Handhabung, hohe Transformationseffizienz und der Möglichkeit der Messung der funktionellen Eigenschaften der exprimierten Kanäle kennzeichnet.

Mit Hilfe der Agro-Infiltrationsmethode (siehe 2.2.2.) war es möglich TPK4 in Blattmesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* zu exprimieren (siehe 3.2.; Abb. 3.7.) und in diesen funktionell zu charakterisieren (siehe 3.2.2.; Abb. 3.9.). Dabei zeigte er die gleichen elektrophysiologischen Charakteristiken wie nach Expression in Oocyten von *Xenopus laevis*. Im Gegensatz dazu konnten bei AKT2 exprimierenden Tabakzellen Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals zu in Oocyten von *Xenopus laevis* exprimierten AKT2 festgestellt werden (Latz et al., 2006). Im pflanzlichen Expressionssystem zeigt AKT2 eine steilere Spannungsabhängigkeit, negativere Aktivierungspotentiale und eine langsamere Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik im Vergleich zu im tierischen Expressionssystem exprimierten AKT2. Die Cs⁺-, Ca²⁺- und pH-Sensitivität von AKT1 bleibt allerdings in beiden Systemen gleich. Dies deutet darauf hin, dass es Unterschiede in den verschiedenen Expressionssystemen gibt, die Einfluss auf die Kanaleigenschaften haben. Es also möglich, über diese Technik pflanzliche Kanäle in Tabak zu exprimieren und anschließend funktionell zu charakterisieren. Dies könnte gerade in Bezug auf die Charakterisierung vakuolärer Kanäle von Bedeutung

4. Diskussion

sein wie auch für die funktionale Charakterisierung von Kanälen in Bezug auf Kofaktoren, β -Subunits und Signaltransduktionskaskaden und könnte Aufschluss über die Rolle von Calcium, 14-3-3-Proteinen, Kinase-/Phosphatase-Kaskaden für die Regulation und Funktion von Proteinen geben. Da es mittlerweile *Arabidopsis*-Linien gibt, die dieser Methode zugänglich sind, dürfte es bald möglich sein, *Arabidopsis*-Kanäle in einem homologen System schnell und einfach überzuexprimieren. Durch Kreuzungen mit verschiedenen Mutanten könnte dies dann auch im Kanalverlust-Hintergrund erfolgen, um somit weitere Informationen über Funktion und Regulation der Kanalproteine zu erhalten, und zwar in einem homologen System in dem alle regulatorischen Faktoren enthalten sind.

5. Zusammenfassung

Lokalisation

- Alle TPKs bis auf TPK4, der in der Plasmamembran lokalisiert ist, sind im Tonoplasten lokalisiert.
- Das 14-3-3-Bindemotiv bzw. der komplette N-Terminus spielt im Gegensatz zu den tierischen TPK's keine Rolle beim Targeting (und evtl. auch beim Assembly), da ein Austausch der N-Termini bzw. Mutationen im 14-3-3-Bindemotiv keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation hat.
- Im C-Terminus ist möglicherweise ein strukturelles Motiv bzw. eine Erkennungssequenz für das Targeting in unterschiedliche Zielmembranen lokalisiert. Eventuell ist hier auch eine Assembly-Domäne für den Zusammenbau der unterschiedlichen Kanaluntereinheiten vorhanden.

TPK4

- Der Kaliumkanal TPK4 wird nach Agro-Infiltration in dem pflanzlichen Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* exprimiert.
- TPK4 ist auch in diesem Expressionssystem in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert.
- Die Ströme, welche aus Mesophyllzellen von TPK4 infiltrierten Blättern abgeleitet wurden, gleichen denen, von TPK4 exprimierenden Oocyten von *Xenopus laevis*. Somit hat TPK4 in beiden Expressionssystemen die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften.

TPK1

- TPK1 bindet über die C-terminalen EF-Hände Calcium und wird durch diese Interaktion aktiviert.
- TPK1 interagiert phosphospezifisch und isotypspezifisch mit dem 14-3-3-Protein GRF6. Diese Interaktion führt zur Aktivierung des Kanals.
- Die Kinasen CPK3 und CPK29, welche das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 phosphorylieren um eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen zu ermöglichen, gehören zur Familie der CDPKs
- Diese Kinasen sind selbst Calcium aktiviert und aller Wahrscheinlichkeit nach unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Erst ein Anstieg der freien

5. Zusammenfassung

Calciumkonzentration führt zur Aktivierung der Kinase in der Zelle und damit zur Aktivierung des Kanals.

- Das 14-3-3-Bindemotiv ist das einzige Target der CDPK's im N-Terminus von TPK1
- Die Phosphatase, welche das 14-3-3-Bindemotiv von TPK1 dephosphoryliert gehört zur Familie der PP2A-Proteinphosphatasen.
- Es ist möglich, dass die Kinase und damit auch der Kanal durch Salzstress und durch Kaliumunterversorgung aktiviert werden und somit die Signalkaskade für die Aktivierung von TPK1 über Kinasen/14-3-3/Calcium in einen stressphysiologischen Kontext involviert ist.
- *tpk1.3*- und *cpk3.1*-Verlustmutanten zeigen eine Reduktion in der Keimungsrate unter Salzstress und limitierten Kaliumangebot. Es kann über einen funktionalen Komplex bestehend aus TPK1 und TPC1 zur Aufrechterhaltung der Na⁺/K⁺-Homeostase und der elektroneutralen Aufnahme von Na⁺ in die Vakuole unter Salzstressbedingungen spekuliert werden.

6. Summary

6. Summary

Localization

- All TPK's with the exception of TPK4 are located in the tonoplast. TPK4 however is localized in the plasmamembrane.
- The 14-3-3 binding motif and the whole N-terminus does not play a role in the targeting process because swapping the N-termini has no effect on the targeting
- The C-terminus might harbour a targeting motif as well as an assembly domain

TPK4

- TPK4 is expressed in *Nicotiana benthamiana* after agro-infiltration and is localized in the plasmamembrane.
- The electrophysiological properties of TPK4 expressed in tobacco are similar to TPK4 expressed in oocytes of *Xenopus laevis*.

TPK1

- TPK1 interacts with the 14-3-3 protein GRF6 in a phosphospecific and isotypspecific manner.
- Interaction of TPK1 with GRF6 leads to channel activation.
- The kinases CPK3 and CPK29 are able to phosphorylate the 14-3-3 binding motif of TPK1 *in vitro*.
- These kinases are activated by elevated levels of free cytosolic calcium.
- The phosphatase responsible for the dephosphorylation of the 14-3-3 binding domain of TPK1 belongs to the family of the PP2A proteinphosphatases.
- It is possible that the kinases are activated under salt stress conditions and thereby phosphorylate the 14-3-3 binding domain of TPK1 leading to the interaction with GRF1 and activation of TPK1.
- Germination is reduced under salt stress conditions and limited K⁺ supply in *tpk1.3* and *cpk3.1* knockout plants

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- Abo-EI-Saad and Wu**, 1995; *A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin*. Plant Physiol. 1995 Jun;108(2):787-93
- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R.** 2000. *GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel*. FEBS Lett. 486: 93-98.
- Allen und Sanders** 1996 *Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium*. Plant J. 1996 Dec;10(6):1055-69
- Anderson Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF.** 1992 Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 1;89(9):3736-40.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz A, Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. and Hedrich, R.** 2004. *AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 15621-1526.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, G., and Hedrich, R.** (2003). *Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress*. FEBS Lett. 554, 119-126
- Bei, Q. and Luan, S.** 1998. *Functional expression and characterization of a plant K⁺ channel gene in a plant cell model*. Plant J. 13: 857-865.
- Berkowitz G, Zhang X, Mercie R, Leng Q, Lawton M.** 2000 *Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in Xenopus laevis oocytes*. Plant Cell Physiol. 2000 Jun;41(6):785-90.
- Bertl, A., Anderson, J.A., Slayman, C.L. and Gaber, R. F.** 1995. *Use of Saccharomyces cerevisiae for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of Kat1, an inward-rectifying K⁺ channel from Arabidopsis thaliana, and comparison with endogenous yeast channels and carriers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2701-2705.
- Bertl A, Bihler H, Reid JD, Kettner C, Slayman CL.** Bertl and Slayman, 1992 *Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ*. J Membr Biol. 1998 Mar 1;162(1):67-80.
- Bihn EA, Paul AL, Wang SW, Erdos GW, Ferl RJ.** *Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize*. Plant J. 1997 Dec;12(6):1439-45.
- Bihler H, Eing C, Hebeisen S, Roller A, Czempinski K, Bertl A.** *TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel*. Plant Physiol. 2005 Sep;139(1):417-24. Epub 2005 Aug 19.
- Binder BM, Harper JF, Sussman MR.** Blatt *Characterization of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase purified from Escherichia coli using an affinity sandwich technique*. Biochemistry. 1994 Mar 1;33(8):2033-41.
- Booij PP, Roberts MR, Vogelzang SA, Kraayenhof R, De Boer AH.** 1999 *14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells* Plant J. 1999 Dec;20(6):673-83.

- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN.** *Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (Vigna radiata).* Plant Mol Biol. 1996 Mar;30(6):1129-37
- Bradford MM.** (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem; 72:248-54
- Buschmann, P.H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W. and Schroeder, J.I.** 2000. *Enhancement of Na⁺ uptake currents, time-dependent inward-rectifying K⁺ channel currents, and K⁺ channel transcripts by K⁺ starvation in wheat root cells.* Plant Physiol. 122: 1387-1398.
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG.** *14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK).* FEBS Lett. 1998 Jul 3;430(3):381-4.
- Camoni L, Iori V, Marra M, Aducci P.** *Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H(+)-ATPase and 14-3-3 proteins.* J Biol Chem. 2000 Apr 7;275(14):9919-23.
- Chang HC, Rubin GM.** *14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in Drosophila.* Genes Dev. 1997 May 1;11(9):1132-9.
- Chaudhuri S, Seal A, Gupta MD.** *Autophosphorylation-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase from groundnut* Plant Physiol. 1999 Jul;120(3):859-66.
- Chen Z, Fu H, Liu D, Chang PF, Narasimhan M, Ferl R, Hasegawa PM, Bressan RA.** *A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homology that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein kinase C.* Plant J. 1994 Nov;6(5):729-40.
- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B.** 2002 *Physical and functional interaction of the Arabidopsis K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA.* Plant Cell 14: 1-14.
- Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM.** *A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants.* Plant Physiol. 2002 Jan;128(1):256-70.
- Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW.** *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis.* Cell. 1977 Jun;11(2):263-71.
- Christou P, McCabe DE, Swain WF. *Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles.* Plant Physiol. 1988 Jul;87(3):671-674.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** 2003. *A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta.* Plant Physiol. 133: 462-469.
- Czempinski, K., Zimmerman, S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B.** 1997. *New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency.* EMBO J. 16: 2565–2575.
- Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H, Cherel I.** *Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain.* EMBO J. 1997 Jun 16;16(12):3455-63.
- Darley, C. P.; van Wuytswinkel, O. C.; van der Woude, K.; Mager, W. H.; and de Boer, A. H.;** *Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers.* Biochem J. 2000 October 1; 351(Pt 1): 241–249.

- Davletova S, Meszaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, Dudits D, Deak M.** *Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells.* J Exp Bot. 2001 Feb;52(355):215-21.
- DeLille JM, Sehne PC, Ferl RJ.** *The arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators.* Plant Physiol. 2001 May;126(1):35-8.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R.** *The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity.* Science. 1998 Apr 3;280(5360):69-77.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B. and Hedrich, R.** 1997. *Plant K^+ channel α -subunits assemble indiscriminately.* Biophys. J. 72: 2143-2150.
- Dreyer, I., Michard, E., Lacombe, B. and Thibaud, J.-B.** 2001. *A plant Shaker-like K^+ channel switches between two distinct gating modes resulting in either inward-rectifying or 'leak' current.* FEBS Lett. 505: 233-239.
- Ellard-Ivey M, Hopkins RB, White TJ, Lomax TL.** *Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (Cucurbita pepo L.).* Plant Mol Biol. 1999 Jan;39(2):199-208.
- Farmer PK, Choi JH.** *Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (Daucus carota L.).* Biochim Biophys Acta. 1999 Sep 14;1434(1):6-17.
- Fischer, R., Emans, N. Schuster, F., Hellwig, S. and Drossard, J.** 1999a. *Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors.* Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 109–112.
- Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N. and Commandeur, U.** 1999b. *Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants.* Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 113–116.
- Formentin, E., Varotto, S., Costa, A., Downey, P., Bregante, M., Naso, A., Picco, C., Gambale, F. and Lo Schiavo, F.** 2004. *KDC2, a novel K^+ channel from carrot, forms functional heteromeric channels with KDC1.* FEBS Lett. 573: 61-67.
- Frattini M, Morello L, Breviario D.** *Rice calcium-dependent protein kinase isoforms OsCDPK2 and OsCDPK11 show different responses to light and different expression patterns during seed development.* Plant Mol Biol. 1999 Dec;41(6):753-64.
- Fuchs I., Stoelzle S., Ivashikina N. und Hedrich R.** (2005) *Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress.* Planta 221, 212-221
- Fulgosi H, Soll J, de Faria Maraschin S, Korthout HA, Wang M, Testerink C.** *14-3-3 proteins and plant development.* Plant Mol Biol. 2002 Dec;50(6):1019-29.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle G., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B.** 1996. *The baculovirus/insect cell system as an alternative to Xenopus oocytes. First characterization of the AKT1 K^+ channel from Arabidopsis thaliana.* J. Biol. Chem. 271: 22863-22870.
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H.** *Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap.* Cell. 1998 Sep 4;94(5):647-55.

- Gelvin, S.B.** 2003. *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: 16-37.
- Gheysen, G., Angenon, G. and Van Montagu, M.** 1998. *Agrobacterium-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications*. In: K. Lindsey (Ed.), Transgenic Plant Research, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 1–33.
- Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N.** Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. Nat Rev Neurosci. 2001 Mar;2(3):175-84. Review.
- Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K.** *Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression*. Mol Cell Biol. 2006 Apr;26(8):2947-54.
- Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K.** 1994 *MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria*. EMBO J. 1994 Nov 1;13(21):5146-54
- Hamilton, C.M., Frary, A., Lewis, S. and Tanksley, S.D.** 1996. *Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 9975-9979.
- Hansen, G. and Wright, M.S.** 1999. *Recent advances in the transformation of plants*. Trends Plant Sci. 4: 226-231.
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C.** *Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain*. Biochemistry. 1994 Jun 14;33(23):7278-87.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF.** *CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal?* Trends Plant Sci. 2000 Apr;5(4):154-9. Review.
- Harper JF, Binder BM, Sussman MR.** *Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in Escherichia coli*. Biochemistry. 1993 Apr 6;32(13):3282-90.
- Harper JF, Huang JF, Lloyd SJ.** *Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain*. Biochemistry. 1994 Jun 14;33(23):7267-77.
- Hartje, S., Zimmermann, S., Klonus, D. and Mueller-Roeber, B.** 2000. *Functional characterisation of LKT1, a K⁺ uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K⁺ channel SKT1 after expression in Xenopus oocytes*. Planta 210: 723–731.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R.** *Mutations in the K⁺ channel signature sequence*. Biophys J. 1994 Apr;66(4):1061-7.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P. and Sussman, M.R.** 1998. *A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition*. Science 280: 918-921.
- Hoshi T.** *Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors*. J Gen Physiol. 1995 Mar;105(3):309-28.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud J.-B. and Sentenac H.** 2003. *The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 5549-5554.
- Huang JZ, Huber SC.** *Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant*

SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. Plant Cell Physiol. 2001 Oct;42(10):1079-87.

- Ivashikina, N., and Hedrich, R.** (2005) *K⁺ currents through SV type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels.* Plant J. 41, 606-614
- Jarvis P, Soll J.** *Toc, tic, and chloroplast protein import.* Biochim Biophys Acta. 2002 Jun 12;1590(1-3):177-89. Review.
- Kapila, J., de Rycke, R., Van Montagu, M. and Angenon, G.** 1997. *An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves.* Plant Sci. 122: 101–108.
- Ketchum, K. A. and Slayman, C. W.** 1996. *Isolation of an ion channel gene from Arabidopsis thaliana using the H5 signature sequence from voltage-dependent K⁺ channels.* FEBS Lett. 378: 19-26.
- Klein TM, Kornstein L, Sanford JC, Fromm ME.** *Genetic Transformation of Maize Cells by Particle Bombardment.* Plant Physiol. 1989 Sep;91(1):440-444.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR.** *Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity.* J. 1997 Nov;12(5):1067-78.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ.** *Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium.* Nature. 1991 Aug 8;352(6335):524-6.
- Knight H, Knight MR.** *Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk.* Trends Plant Sci. 2001 Jun;6(6):262-7.
- Krysan PJ, Young JC, Tax F, Sussman MR.** *Identification of transferred DNA insertions within Arabidopsis genes involved in signal transduction and ion transport.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23;93(15):8145-50.
- Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SE, Harthill JE, Nielsen TH, MacKintosh C.** *Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.* Plant J. 2004 Mar;37(5):654-67
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B.** 2000. *A Shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis.* Plant Cell 12: 837-851.
- Layfield R, Fergusson J, Aitken A, Lowe J, Landon M, Mayer RJ.** *Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins.* Neurosci Lett. 1996 May 3;209(1):57-60.
- Laemmli, U.K.** 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227: 680–685.
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA.** *Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel.* Plant Physiol. 1999 Nov;121(3):753-61.
- Li, J., Lee, Y.-R. and Assmann, S. M.** 1998. *Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 K⁺ channel.* Plant Physiol. 116: 785-795.
- Liu H, Reavy B, Swanson M, MacFarlane SA.** *Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses.* Virology. 2002 Jul 5;298(2):232-9

- Liu, H., Reavy, B., Swanson, M. and MacFarlane, S.A.** 2002. *Functional replacement of the Tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses.* Virology 298: 232-239.
- Lorence, A. and Verpoorte, R.** 2004. *Gene transfer and expression in plants.* In: P. Balbas and A. Lorence (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 267, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 329-350.
- Lu M, Holliday LS, Zhang L, Dunn WA Jr, Gluck SL.** *Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump.* J Biol Chem. 2001 Aug 10;276(32):30407-13. Epub 2001 Jun 8.
- Lu SX, Hrabak EM.** *An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum.* Plant Physiol. 2002 Mar;128(3):1008-21
- Mackie S, Aitken A.** *Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease.* FEBS J. 2005 Aug;272(16):4202-10.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E.** *Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel.* J Biol Chem. 1999 Sep 17;274(38):26691-6.
- McMichael RW Jr, Bachmann M, Huber SC.** *Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase and Nitrate Reductase Are Phosphorylated/Inactivated by Multiple Protein Kinases in Vitro.* Plant Physiol. 1995 Jul;108(3):1077-1082.
- Martin ML, Busconi L.** *Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation.* Plant J. 2000 Nov;24(4):429-35. Review.
- Martin ML, Busconi L.** *A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature.* Plant Physiol. 2001 Mar;125(3):1442-9.
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Gueriot ML.** *Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis.* Plant Physiol. 2001 Aug;126(4):1646-67.
- Monroy AF, Dhindsa RS.** *Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C.* Plant Cell. 1995 Mar;7(3):321-31.
- Mori, I.C., Uozumi, N. and Muto, S.** 2000. *Phosphorylation of the inward-rectifying potassium channel KAT1 by ABR kinase in Vicia guard cells.* Plant Cell Physiol. 41: 850-856.
- Moshelion, M., Becker, D., Czempinski, K., Mueller-Roeber, B., Attali, B., Hedrich, R. and Moran, N.** 2002. *Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ.* Plant Physiol. 128: 634-642.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N. and Kaldenhoff, R.** (2002). *PIP aquaporins in the motor cells of Samanea saman: diurnal and circadian regulation,* Plant Cell 14 (3), 727-739
- Mouline, K., Very, A.A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H.** 2002. *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis.* Genes Dev. 16: 339-350.

- Murillo I, Jaeck E, Cordero MJ, San Segundo B.** *Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection.* Plant Mol Biol. 2001 Jan;45(2):145-58.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS.** *Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine.* Cell. 1996 Mar 22;84(6):889-97.
- Nakamura, R.L., McKendree, Jr.W.L., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, .F. and Sussman, M.R. 1995.** *Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells.* Plant Physiol. 109: 371-374.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B.** *alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins.* J Neurosci. 1999 Jul 15;19(14):5782-91
- Patharkar OR, Cushman JC.** *A stress-induced calcium-dependent protein kinase from Mesembryanthemum crystallinum phosphorylates a two-component pseudo-response regulator.* Plant J. 2000 Dec;24(5):679-91.
- Patel AJ, Lazdunski M, Honore E.** *Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels.* Curr Opin Cell Biol. 2001 Aug;13(4):422-8. Review.
- Paul AL, Sehnke PC, Ferl RJ.** *Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions.* Mol Biol Cell. 2005 Apr;16(4):1735-43. Epub 2005 Jan 19.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H. 2001.** *Guard cell inward K⁺ channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2.* J. Biol. Chem. 276: 3215-3221.
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M, Cerana R, Van Etten JL, Derst C, DiFrancesco D, Moroni A, Thiel G.** *A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1.* Science. 2000 Mar 3;287(5458):1641-4.
- Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu, C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. 2002.** *A grapevine gene encoding a guard cell K⁺ channel displays developmental regulation in the grapevine berry.* Plant Physiol. 128: 564–577.
- Putnam-Evans CL, Harmon AC, Cormier MJ.** *Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean.* Biochemistry. 1990 Mar 13;29(10):2488-95.
- Ramsperger-Gleixner, M., Geiger, D., Hedrich, R., and Sauer, N. (2004).** *Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of Plantago major companion cells.* Plant Phys., 134, 147-160.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. and Hedrich, R. 2002.** *AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 4079-4084.
- Rezmer C, Schlichting R, Wachter R, Ullrich CI.** *Identification and localization of transformed cells in agrobacterium tumefaciens-induced plant tumors* Planta. 1999 Oct;209(4):399-405.
- Rodriguez-Navarro A.** *Potassium transport in fungi and plants.* Biochim Biophys Acta. 2000 Mar 10;1469(1):1-30. Review.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. and Jones, J.D.G. 2001.** *Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response* EMBO J. 20: 5556-5567.

- Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, Sommarin M.** *Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes.* Plant Physiol. 2001 Sep;127(1):142-9.
- Rudd JJ, Franklin-Tong VE.** *Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of Papaver rhoeas.* J Exp Bot. 2003 Jan;54(380):141-8. Review.
- Ruge-Wehling B., Linz A., Habekuß A. & Wehling P.** *Mapping of Rym16Hb, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from Hordeum bulbosum* Theoretical and Applied Genetics (2006) 113:867-873
- Saha P, Singh M.** *Characterization of a winged bean (Psophocarpus tetragonolobus) protein kinase with calmodulin-like domain: regulation by autophosphorylation.* Biochem J. 1995 Jan 1;305 (Pt 1):205-10.
- Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K.** *Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants.* Plant J. 2000 Aug;23(3):319-27.
- Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, Hata S, Kyozuka J, Hayakawa T, Nakamura T, Shimamoto K, Yamaya T, Izui K.** *A Ca(2+)-dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles.* Plant Cell Physiol. 2001 Nov;42(11):1228-33.
- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P.** *Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase.* Science. 1999 Mar 26;283(5410):2083-5.
- Schaller GE, Harmon AC, Sussman MR.** *Characterization of a calcium- and lipid-dependent protein kinase associated with the plasma membrane of oat.* Biochemistry. 1992 Feb 18;31(6):1721-7.
- Schönknecht, G., Spormaker, P., Steinmeyer, R., Brüggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R. and Palme, K.** 2002. *KCO1 is a component of the slow-vacuolar SV ion channel.* FEBS Lett. 511: 28–32.
- Sehnke PC, Rosenquist M, Alsterfjord M, DeLille J, Sommarin M, Larsson C, Ferl RJ.** *Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins.* Plant Mol Biol. 2002 Dec;50(6):1011-8.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C.** *Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system.* Science. 1992 May 1;256(5057):663-5.
- Shih, T.M., Smith, R.D., Toro, L. and Goldin, A.L.** 1998. *High-level expression and detection of ion channels in Xenopus oocytes.* Methods Enzymol. 293: 529-556.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.* J Cell Comp Physiol. 1962 Jun;59:223-39.
- Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW.** *Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation.* J Gen Physiol. 1998 Mar;111(3):399-420.
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC.** *A plant cell factor induces Agrobacterium tumefaciens vir gene expression.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jan;83(2):379-383.
- Stadler, R., Büttner, M., Ache, P., Hedrich, R., Ivashikina, N., Melzer, M., Shearson, S.M., Smith, S.M., and Sauer, N.** (2003). *Diurnal and light regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis.* Plant Phys. 133, 528-537

- Sutton, F., Paul, S.S., Wang, X.-Q. and Assmann, S.M.** 2000. *Distinct abscisic acid signaling pathways for modulation of guard cell versus mesophyll cell potassium channels revealed by expression studies in *Xenopus laevis* oocytes.* Plant Physiol. 124: 223-230.
- Tang, H., Vasconcelos, A.C. and Berkowitz, G.A.** 1996. *Physical association of K⁺AB1 with plant K⁺ channel α -subunits.* Plant Cell 8: 1545-1553.
- Thomashow MF, Nutter R, Postle K, Chilton MD, Blattner FR, Powell A, Gordon MP, Nester EW.** *Recombination between higher plant DNA and the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Nov;77(11):6448-6452.
- Trewavas A.** *Le calcium, C'est la vie: calcium makes waves* Plant Physiol. 1999 May;120(1):1-6.
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K.** *Two genes that encode Ca(2+)-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*.* Mol Gen Genet. 1994 Aug 15;244(4):331-40.
- Uozumi N, Gassmann W, Cao Y, Schroeder JI.** *Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutant selection in yeast.* J Biol Chem. 1995 Oct 13;270(41):24276-81.
- Uozumi N, Nakamura T, Schroeder JI, Muto S.** *Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 18;95(17):9773-8.
- van der Hoeven PC, Siderius M, Korthout HA, Drabkin AV, de Boer AH.** *A calcium and free fatty acid-modulated protein kinase as putative effector of the fusicoccin 14-3-3 receptor.* Plant Physiol. 1996 Jul;111(3):857-65.
- Very, A.A., Gaymard, F., Bosseux, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.B.** 1995. *Expression of a cloned plant K⁺ channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents.* Plant J. 7: 321-332.
- Very AA, Sentenac H.** *Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants.* Annu Rev Plant Biol. 2003;54:575-603. Review.
- Vranová, E., Tähtiharju, S., Sriprang, S., Willekens, H., Heino, P., Palva, E.T., Inzé, D. and Van Camp, W.** 2001. *The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C.* J. Exp. Bot. 52: 181-182.
- Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K.** *Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta.* Plant J. 2006 Oct;48(2):296-306. Epub 2006 Sep 19
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC.** *A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*.* Cell. 2000 Sep 29;103(1):157-67.
- Wang, H.C., Beer, B., Sassano, D., Blume, A.J. and Ziai, M.R.** 1991. *Gene expression in *Xenopus* oocytes.* Int. J. Biochem. 23: 271-276.
- Ward JM, Schroeder JI.** *Calcium-Activated K⁺ Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure.* Plant Cell. 1994 May;6(5):669-683.
- Wiltfang J, Otto M, Baxter HC, Bodemer M, Steinacker P, Bahn E, Zerr I, Kornhuber J, Kretzschmar HA, Poser S, Ruther E, Aitken A.** *Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease.* J Neurochem. 1999 Dec;73(6):2485-90.

7. Anhang

- Wilker E, Yaffe MB.** *14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease.* J Mol Cell Cardiol. 2004 Sep;37(3):633-42. Review.
- Wu R, Abo-el-Saad M,** *A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin* Plant Physiol. 1995 Jun;108(2):787-93
- Xi-Qing Wang, Hemayet Ullah, Alan M. Jones, Sarah M. Assmann Baxter** 2002 *G Protein Regulation of Ion Channels and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis Guard Cells* Science 292 (5524): 2070-2072
- Yang Y, Yan Y, Sigworth FJ.** *How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?* J Gen Physiol. 1997 Jun;109(6):779-89.
- Yoon GM, Cho HS, Ha HJ, Liu JR, Lee HS.** *Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in Nicotiana tabacum, and the activity of its encoded protein.* Plant Mol Biol. 1999 Mar;39(5):991-1001
- Zambryski P, Tempe J, Schell J.** *Transfer and function of T-DNA genes from agrobacterium Ti and Ri plasmids in plants.* Cell. 1989 Jan 27;56(2):193-201.
- Zimmermann B, Walz B.** *The mechanism mediating regenerative intercellular Ca²⁺ waves in the blowfly salivary gland.* EMBO J. 1999 Jun 15;18(12):3222-31.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY.** *Mini-prep in ten minutes.* Biotechniques. 1990 Feb;8(2):172-3.

7. Anhang

7.2. Abkürzungen

A	<u>A</u>denin
Abb.	<u>A</u>bbildung
AKT	<u>A</u>rabidopsis thaliana <u>K</u>⁺-<u>T</u>ransporter
Amp	<u>A</u>mpizillin
AMP	<u>A</u>denosin<u>m</u>onophosphat
AS	<u>A</u>minosäure
At...	<u>A</u>rabidopsis thaliana...
AtKC1 engl.:	<u>A</u>rabidopsis thaliana <u>K</u>⁺ channel 1
ATP	<u>A</u>denosin<u>t</u>riphosphat
bp	<u>B</u>asen<u>p</u>aar
BCIP	5-<u>B</u>romo-4-<u>ch</u>loro-3-<u>I</u>ndolyl<u>p</u>hosphat
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: <u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin)
bzw.	<u>b</u>eziehung<u>s</u>weise
C	<u>C</u>ytosin
ca.	zirka
CaM	<u>C</u>almodulin
cAMP	<u>c</u>yclisches <u>A</u>denosin<u>m</u>onophosphat
cDNA	DNA-Kopie von einer mRNA (engl.: <u>c</u>opy-<u>D</u>NA)
cGMP	<u>c</u>yclisches <u>G</u>uanosin<u>m</u>onophosphat
CNGC engl.:	<u>c</u>yclic-<u>n</u>ucleotide-<u>g</u>ated <u>c</u>hannel
cm	Zentimeter
d	Tage
DEPC	<u>D</u>iethyl<u>p</u>yrocarbonat
DNA	<u>D</u>esoxyribon<u>n</u>ukleinsäure (engl.: <u>a</u>cid)
dCTP	<u>D</u>eoxycytidin<u>t</u>riphosphat
dNTP	<u>D</u>esoxy-<u>N</u>ukleotid-<u>T</u>riphosphat
dT	<u>D</u>eoxy<u>t</u>hymidin
DTT	<u>D</u>ithio<u>t</u>hreitol
E.coli	<u>E</u>scherichia <u>c</u>oli
EDTA	<u>E</u>thylendiamin<u>t</u>etraacetat
ER	<u>E</u>ndoplasmatisches <u>R</u>etikulum
EtBr	<u>E</u>thidium<u>b</u>romid
fw engl.:	forward (vorwärts, für 5'-3'-Primer)
FG	<u>F</u>risch<u>g</u>ewicht
g	Gramm
G	<u>G</u>uanin
GFP engl.:	green fluorescent <u>p</u>rotein
Gln	<u>G</u>lutamin
Glu	<u>G</u>lutaminsäure
GORK	guard cell <u>o</u>utward <u>r</u>ectifying <u>K</u>⁺ channel
GUS	β-<u>G</u>luconidase
h	Stunde (engl.: <u>h</u> our)

7. Anhang

HAK HEK293	engl.: high-affinity-K⁺ -transporter engl.: human embryonal kidney 293 (menschliche embryonale Nieren-zellen, Linie 293)
IAA	engl.: indole-3- acetic acid
K ⁺	Kalium
Kan	Kanamycin
KAT	K⁺ channel <i>Arabidopsis thaliana</i>
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KST1	K⁺ Kanal <i>Solanum tuberosum 1</i>
KT	K⁺ -Transporter
KUP engl.:	K⁺ - uptake -transporter
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCT1	engl.: low affinity cation transporter 1
m	milli-
M	molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl.: m ultiple c loning s ite)
MEN	MOPS-EDTA-Na -Acetat-Puffer
MES	2-N- M orpholino e thans s ulfonsäure
min	Minute
MOPS	3- M orpholinopropans s ulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: m essenger- RNA)
MS	Murashige und Skoog
NaAc	Natriumacetat
NBT-BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid / 5- B rom-4- c hlor-3- i ndolyl- p hosphat
NH ₃	Ammoniak
n	Nano-
NHX	engl.: Na⁺/H⁺ - ex changer (Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter)
NPA	engl.: 1-N- n aphthyl p hthalam a cid
Oligo (dT)	Oligo Deoxythymidin
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: p olymerase c hain r eaction)
Poly (A) ⁺	Poly-Adenin
p	Piko-
rev	rückwärts (engl.: reverse)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: -a cid)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rev	engl.: reverse (rückwärts, für 3'-5'-Primer)
rpm	engl.: rotations p er m inute
RT	1. Raumtemperatur / 2. Reverse Transkription / Reverse Transkriptase

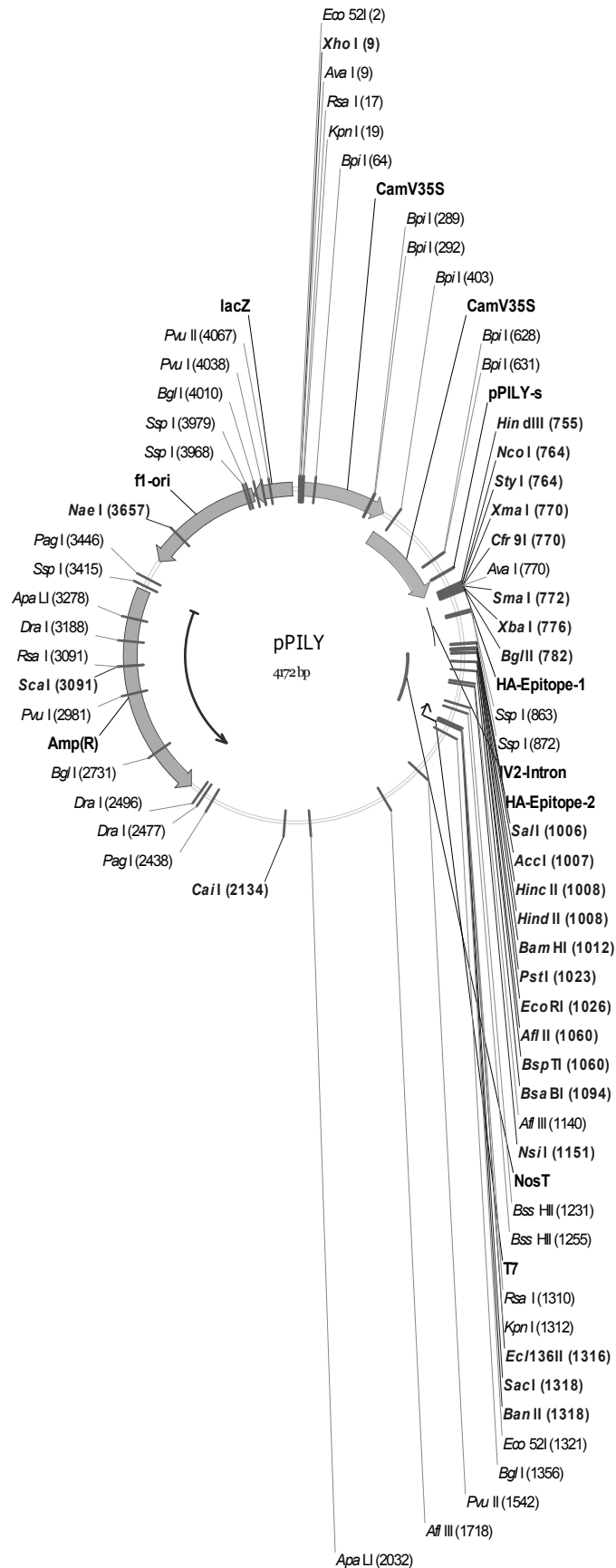
7. Anhang

s	Sekunde (engl.: <u>s</u> econd)
s.a.	<u>s</u> iehe <u>a</u> uch
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SF	S tandardfehler
s.o.	<u>s</u> iehe <u>o</u> ben
SOS1,2,3	engl.: s alt- o verly- s ensitive 1,2,3
SPIK	engl.: S haker pollen inward K + channel
SSC	Na-Citat-Puffer (engl.: <u>s</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate)
s.u.	<u>s</u> iehe <u>u</u> nten
T	<u>T</u> hymine
TA	<u>T</u> hymine- A denin
Taq	<u>T</u> hermophilus <u>a</u> quaticus
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer
TEA	<u>T</u> etraethylammonium
TEMED	N,N,N,N – T etramethyl- E thylendiamin
TENS	T E- N aOH- S DS-Puffer
tRNA	<u>T</u> ransfer- R <u>N</u> A
u	<u>u</u> nd
U	1. <u>U</u> nit (Einheit für Enzymaktivitäten) / 2. <u>U</u> racil
UREA	Harnstoff
V Volt	
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
°C	Grad C elsius
μ	Mikro-
1-NAA	1 -naphthaleneacetic acid
2,4-D	2,4 -Dichlorphenoxyessigsäure

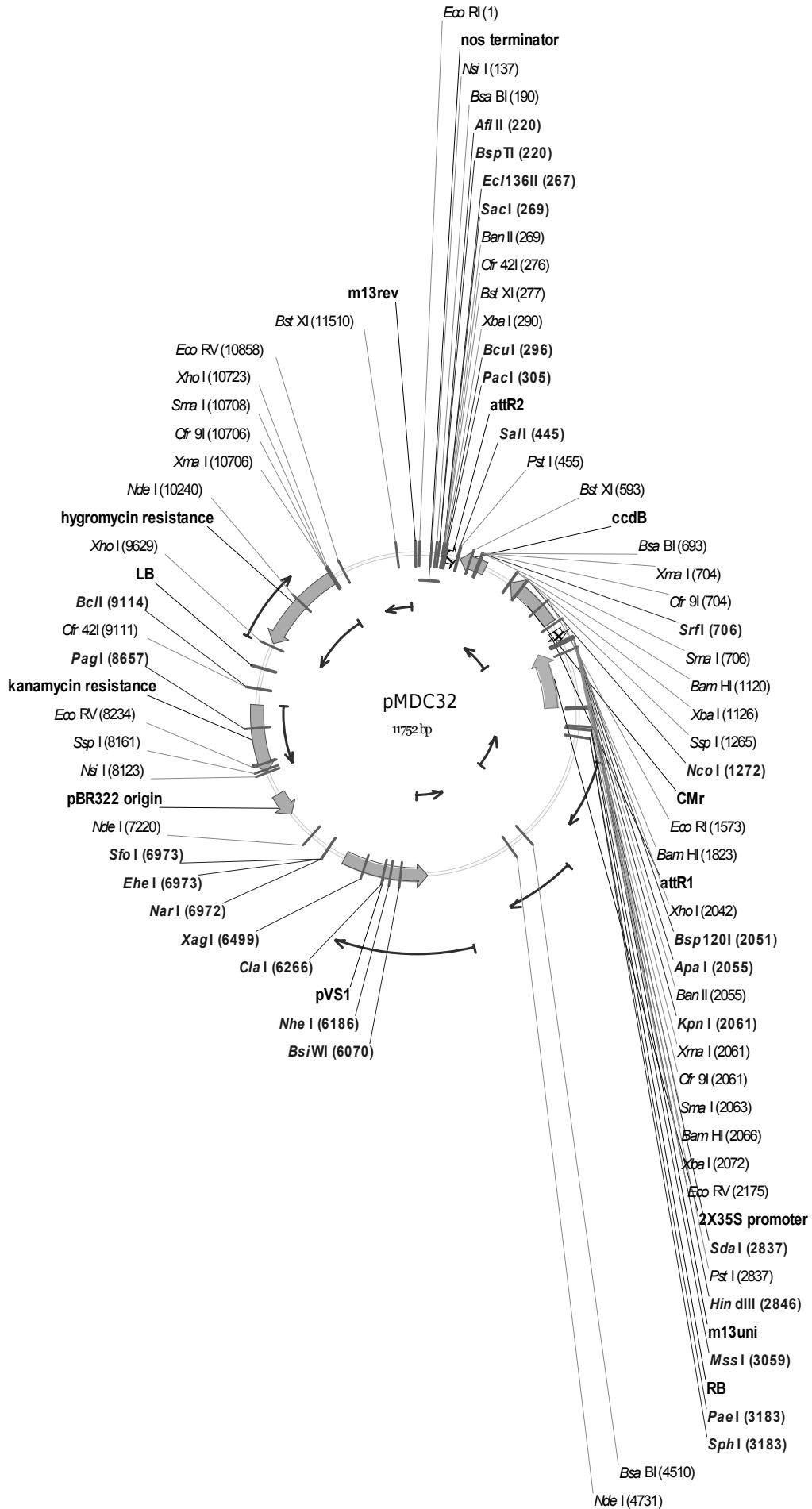
7. Anhang

7.3. Sequenzen und Vektoren

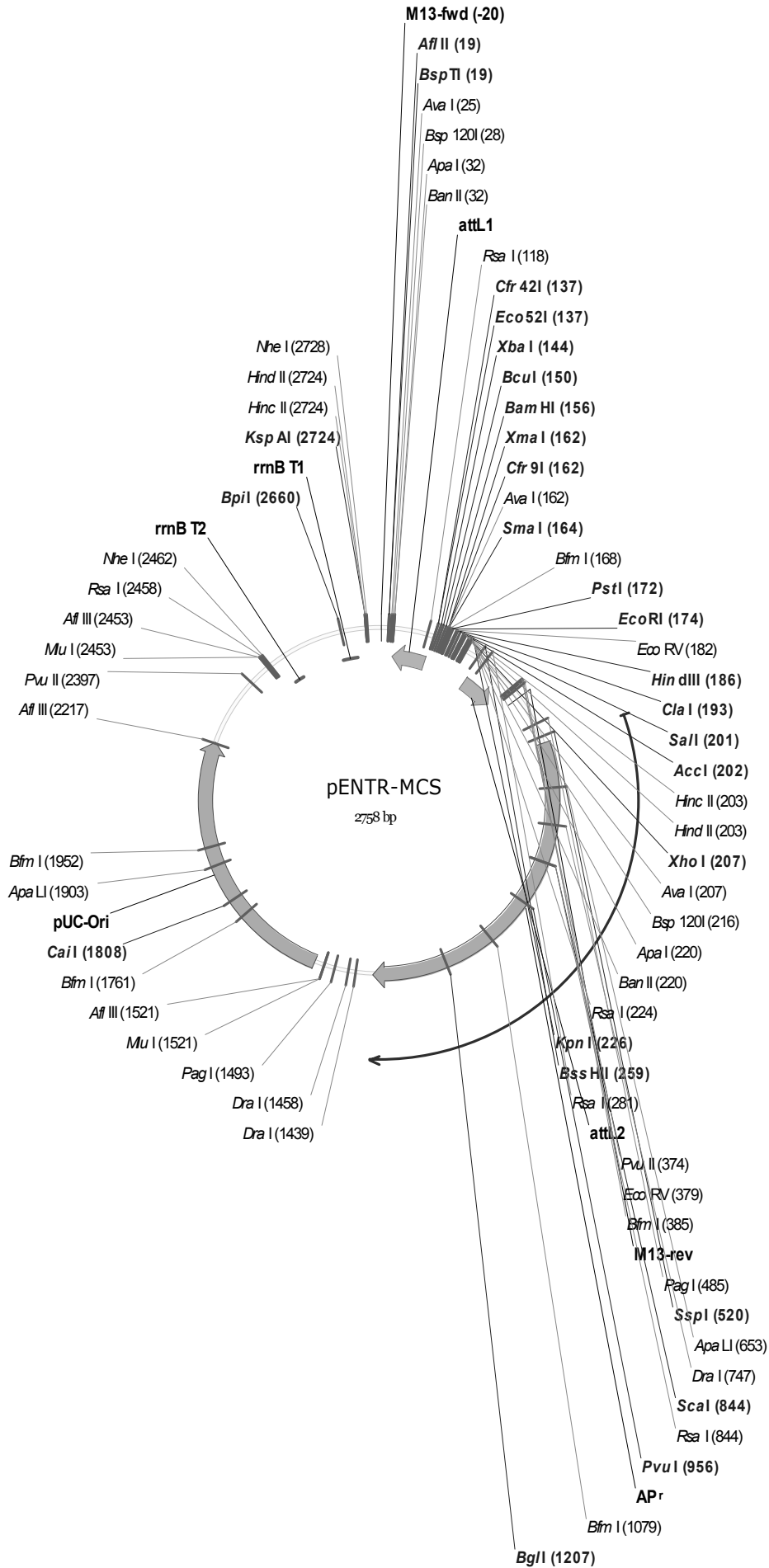
7.3.1. Vektoren



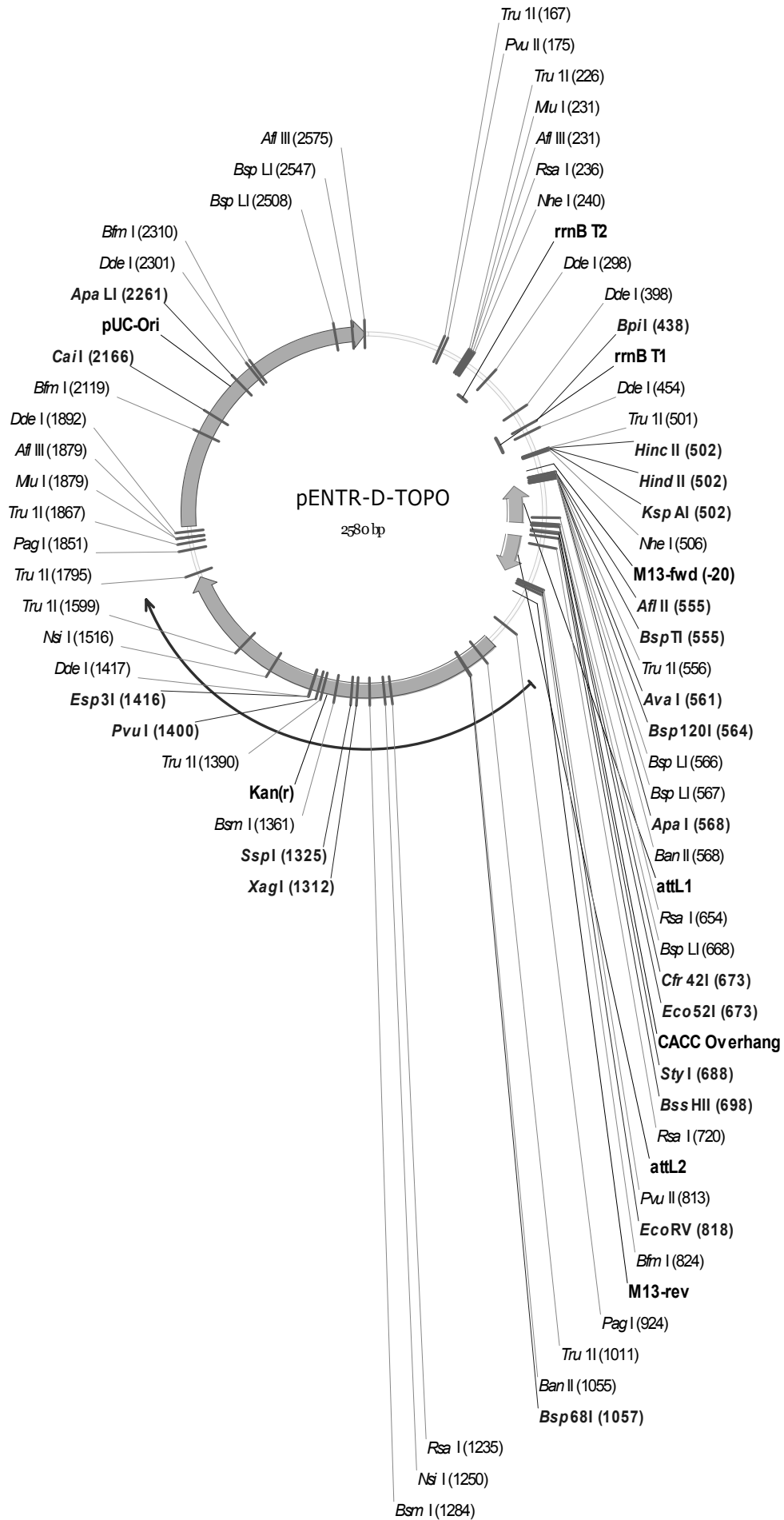
7. Anhang



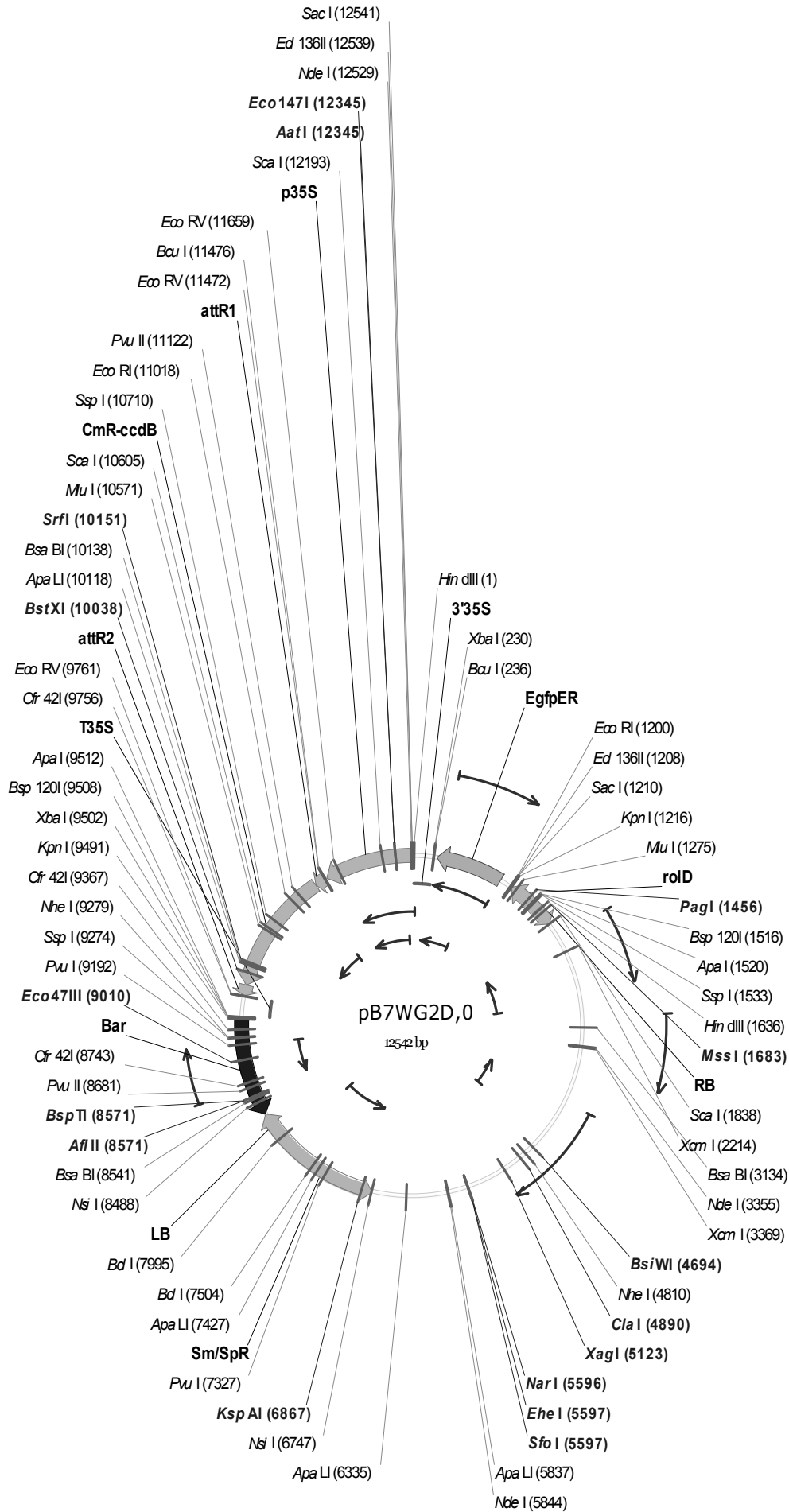
7. Anhang



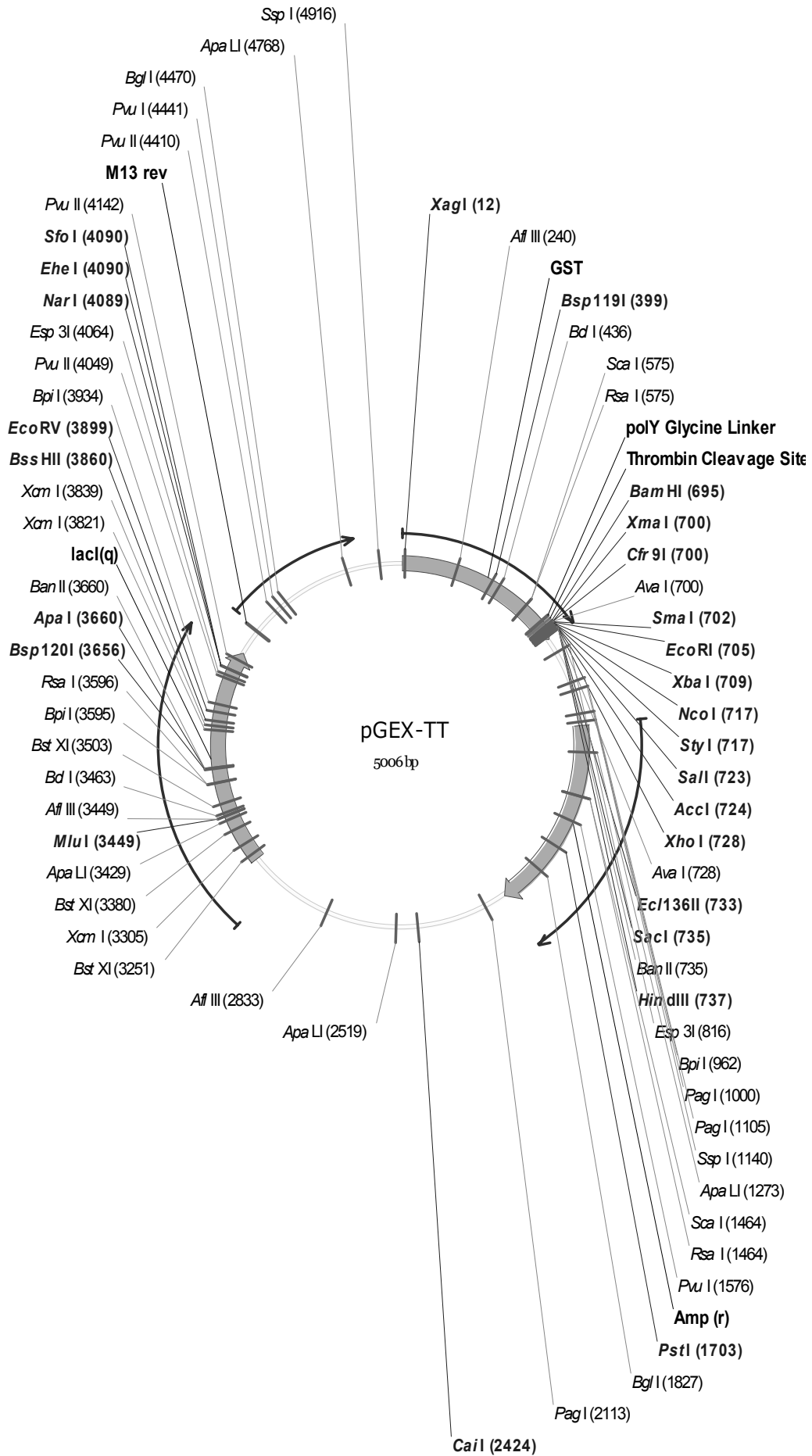
7. Anhang



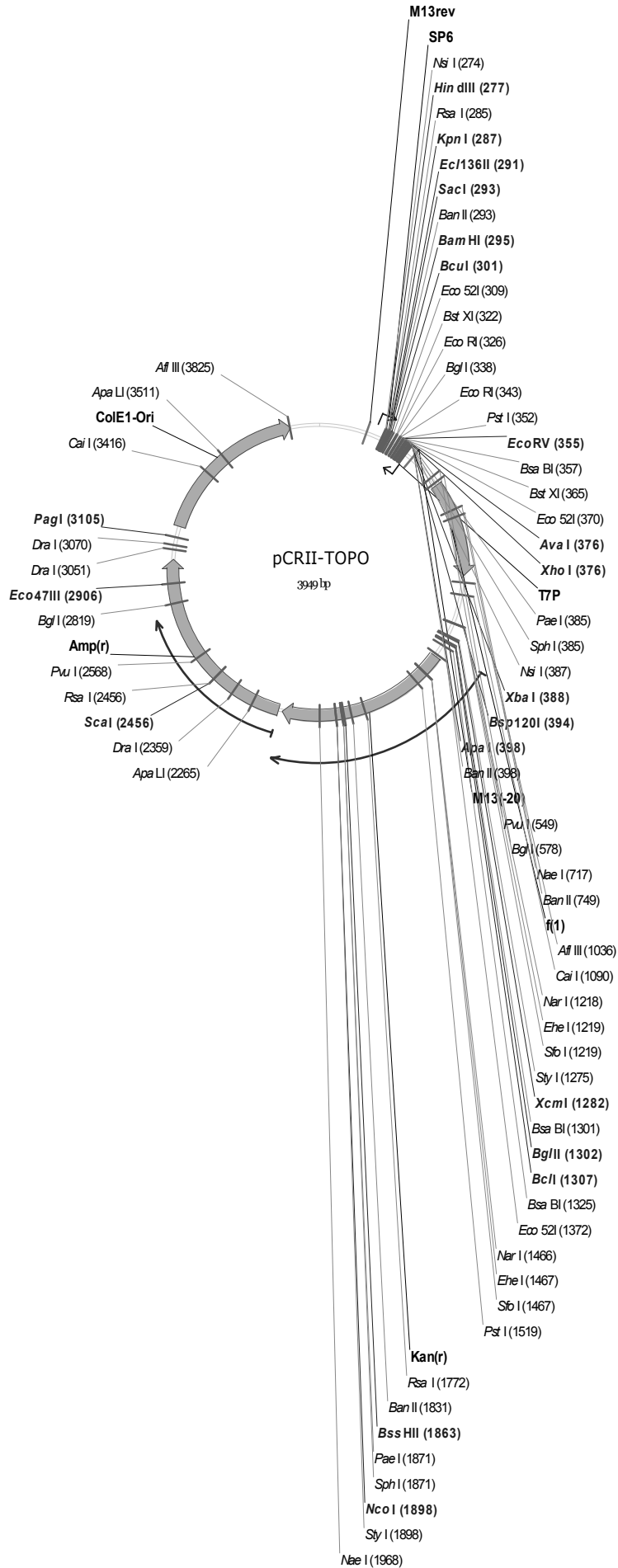
7. Anhang



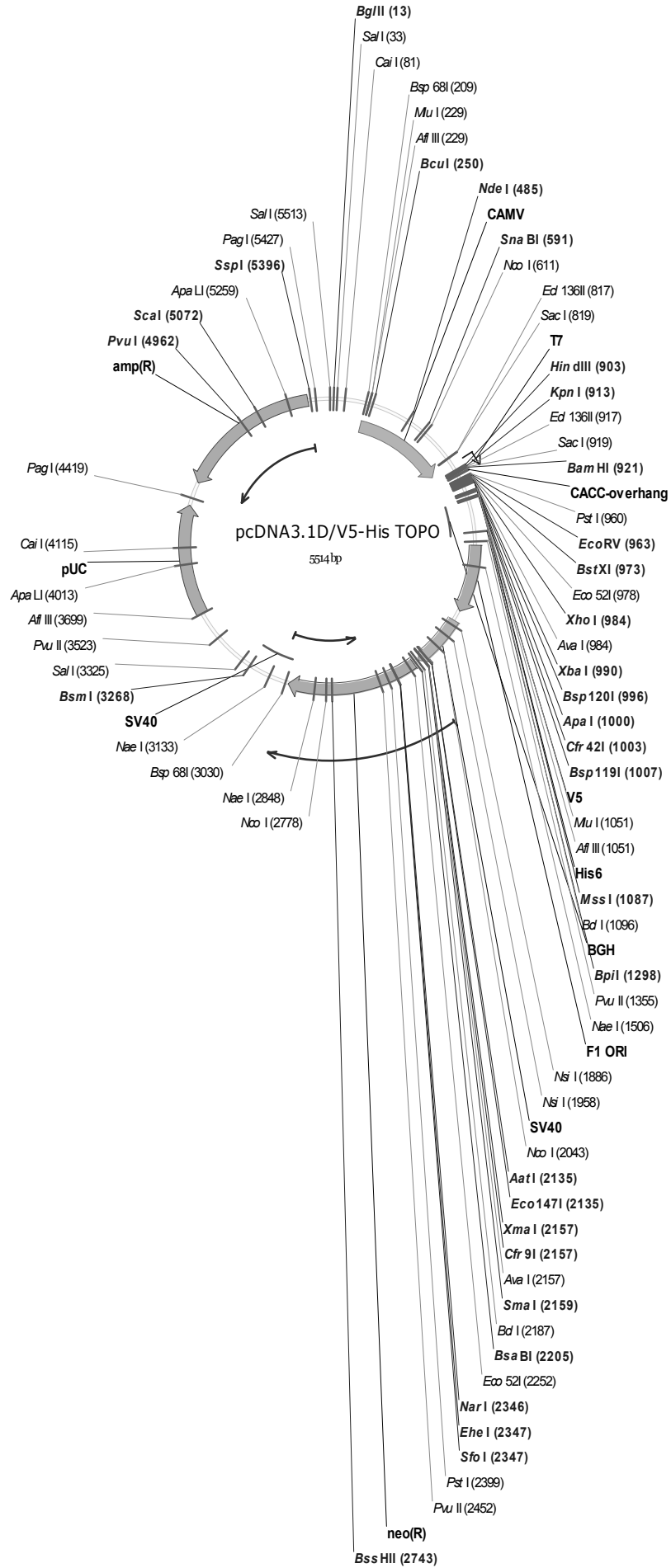
7. Anhang



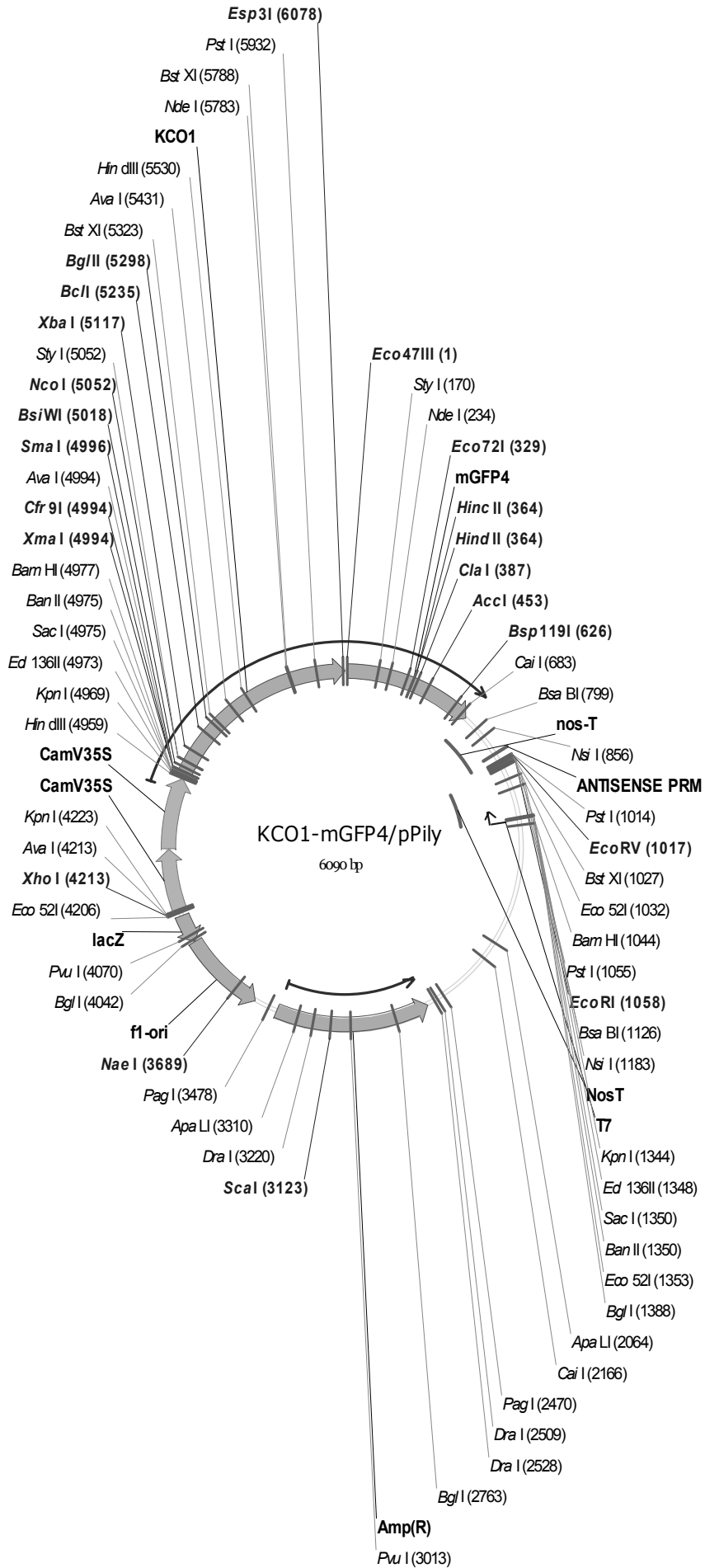
7. Anhang



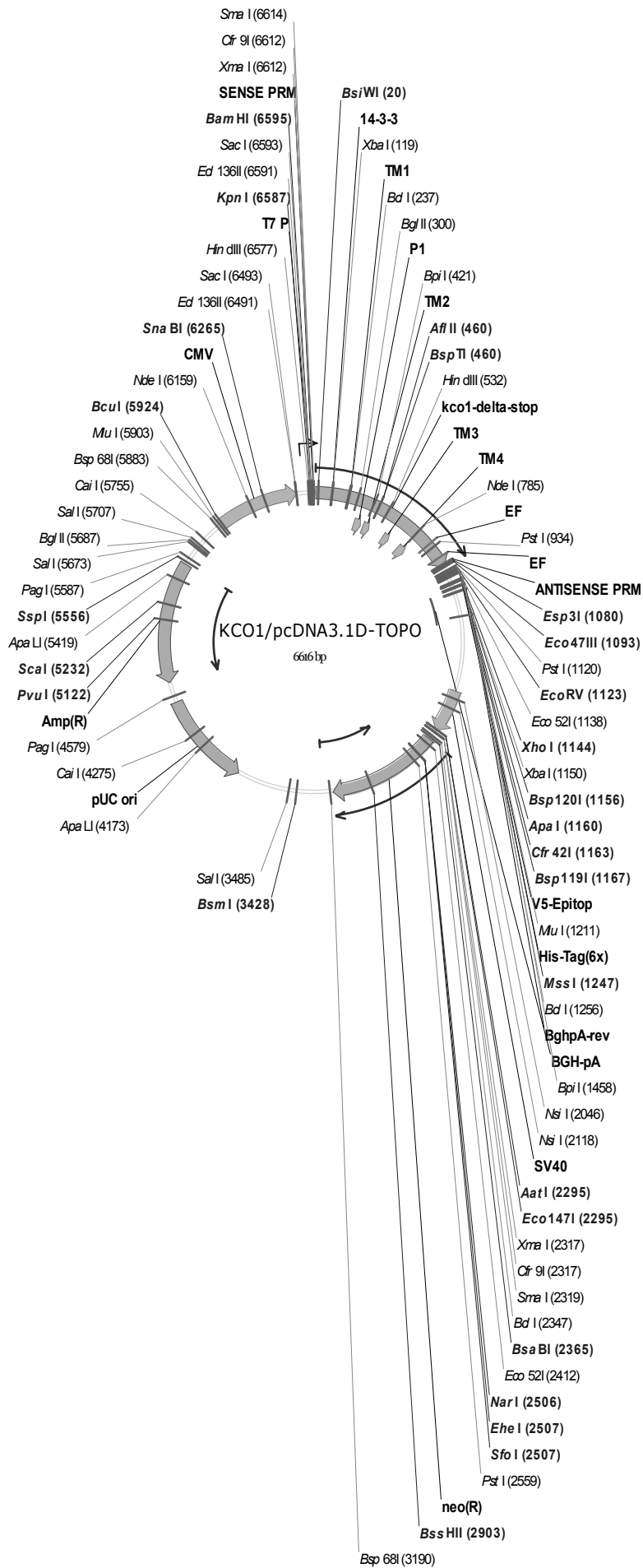
7. Anhang



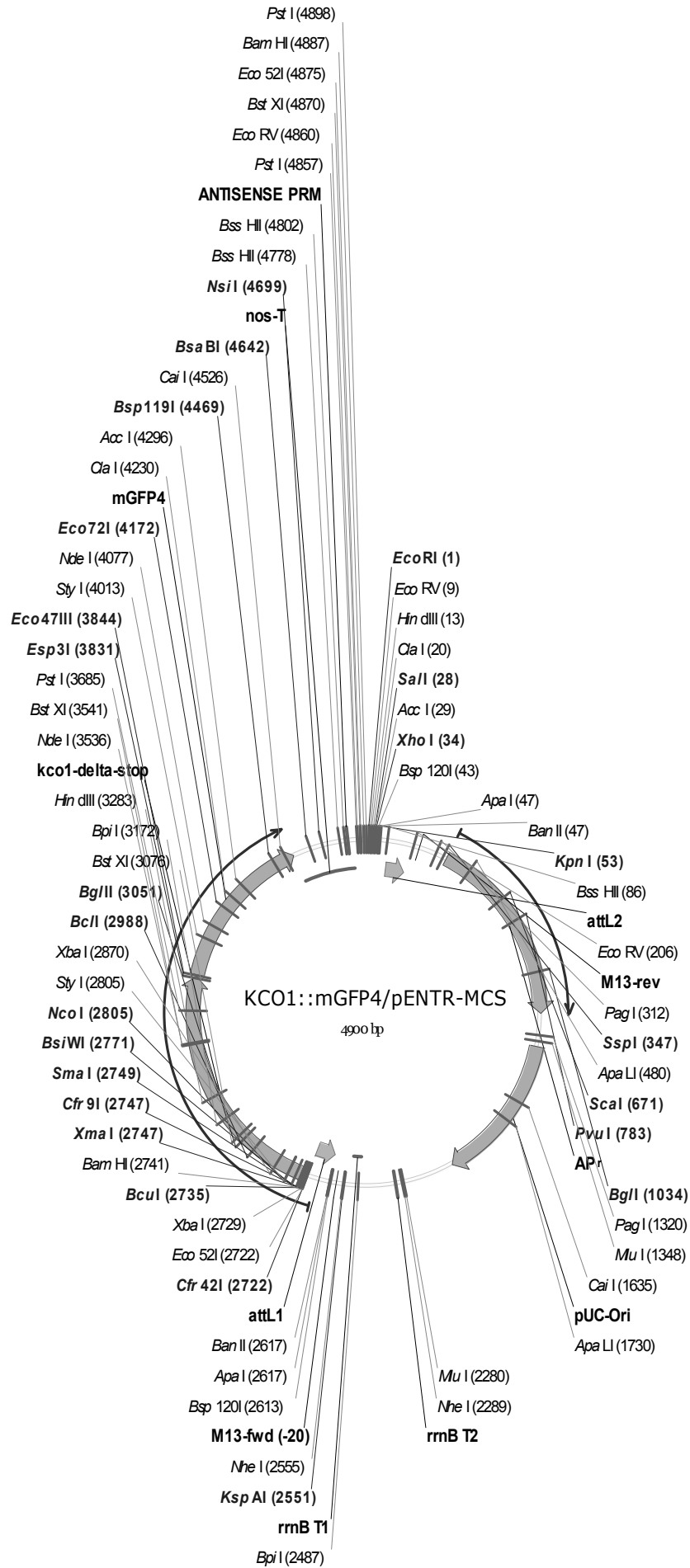
7. Anhang



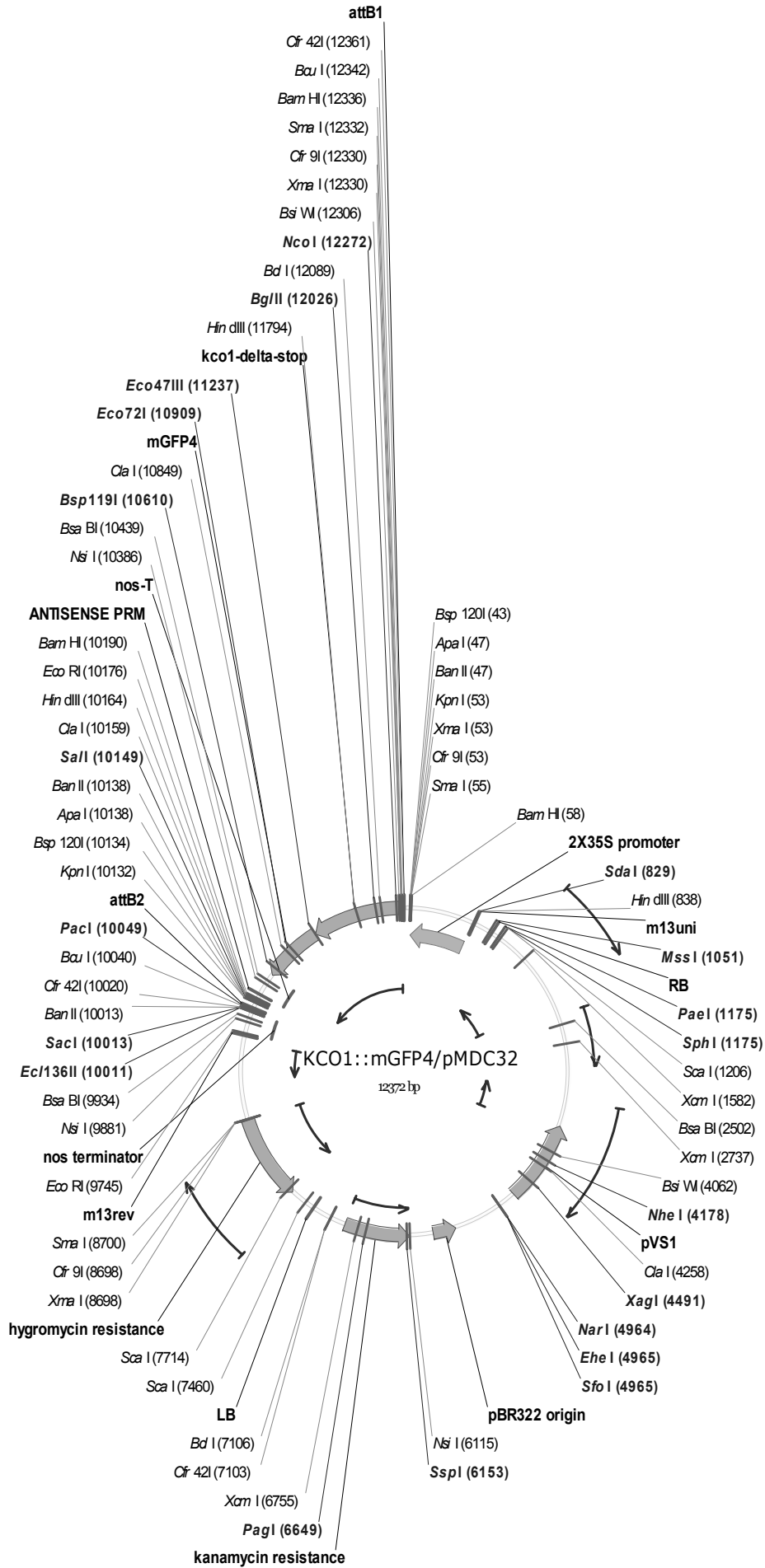
7. Anhang



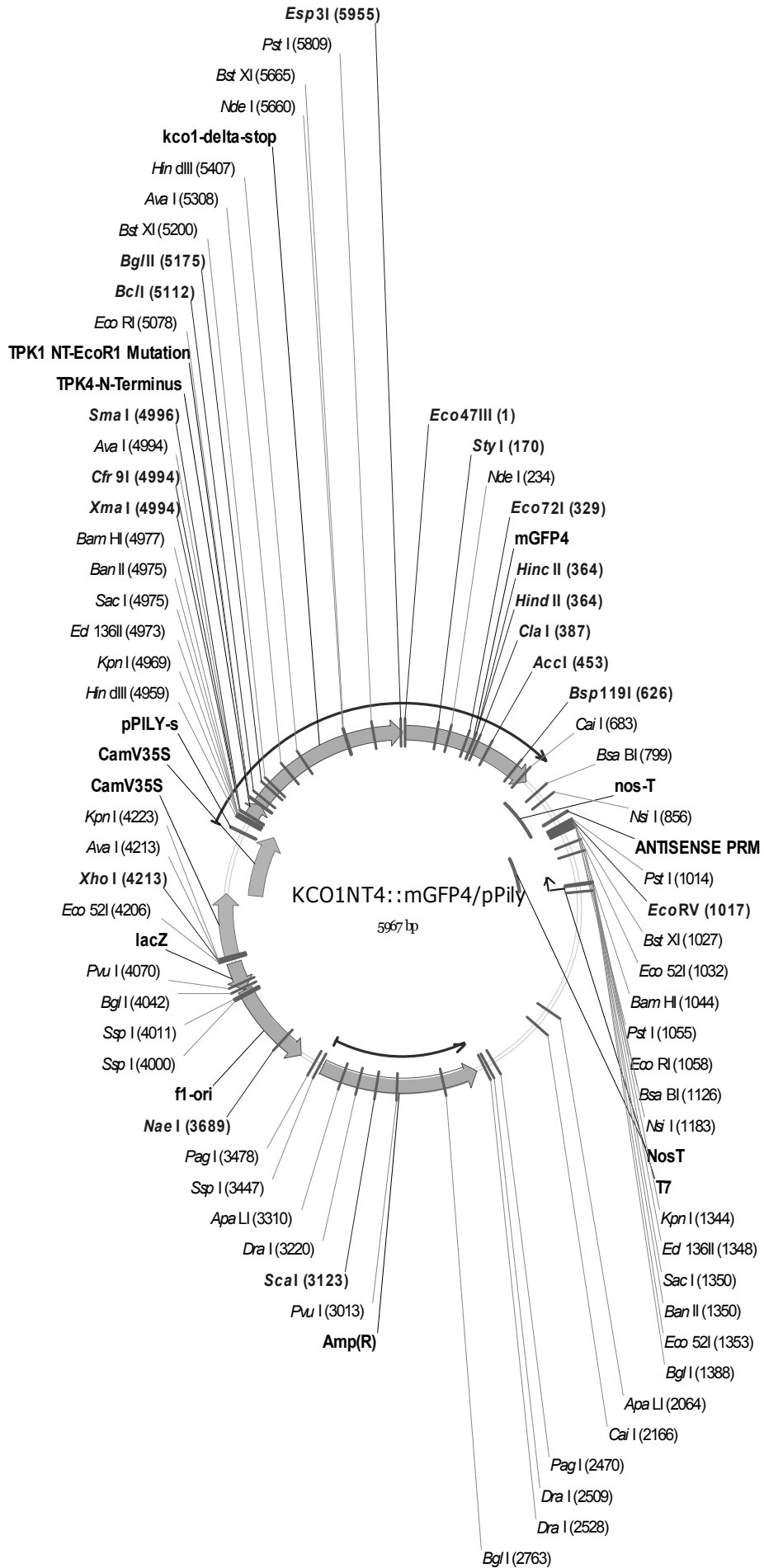
7. Anhang



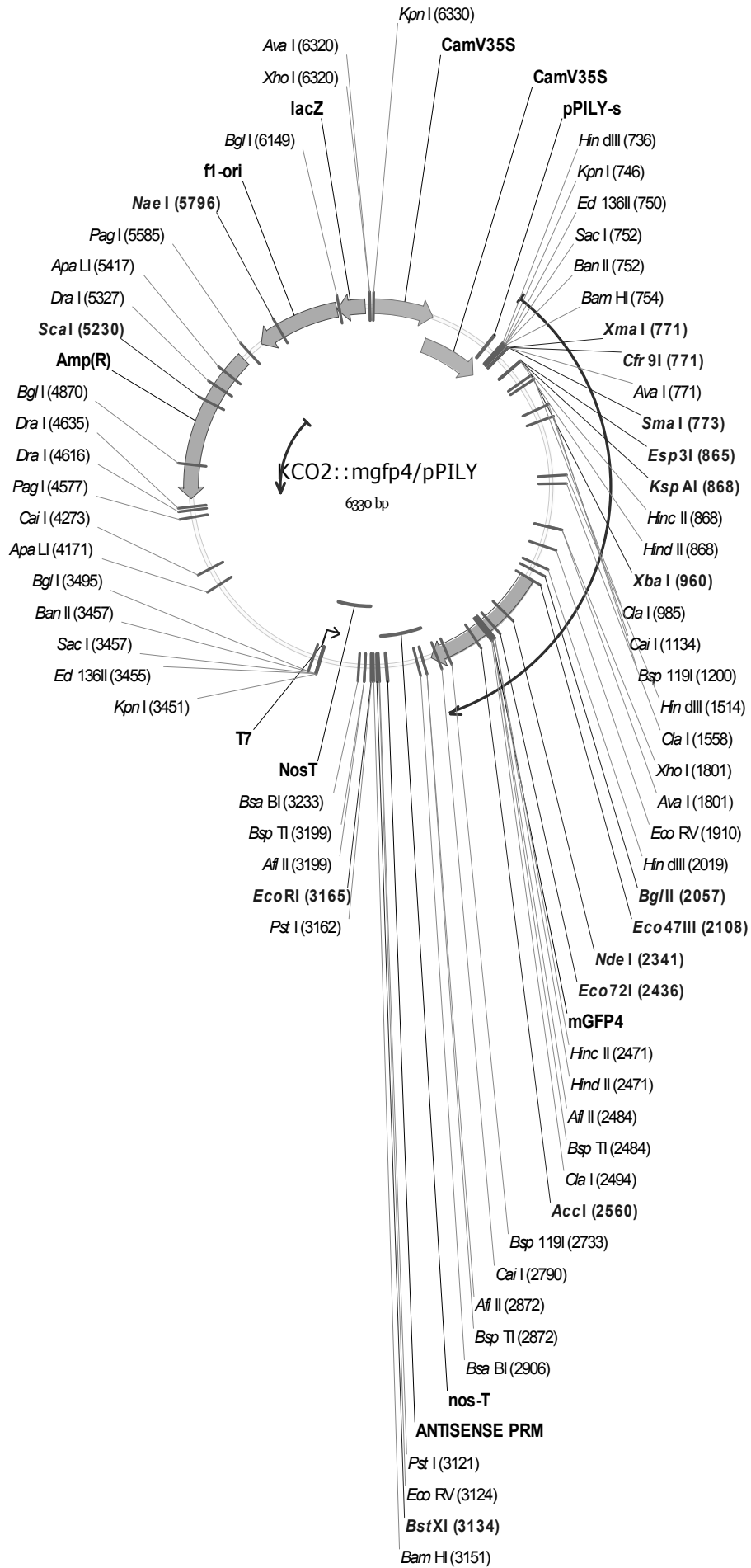
7. Anhang



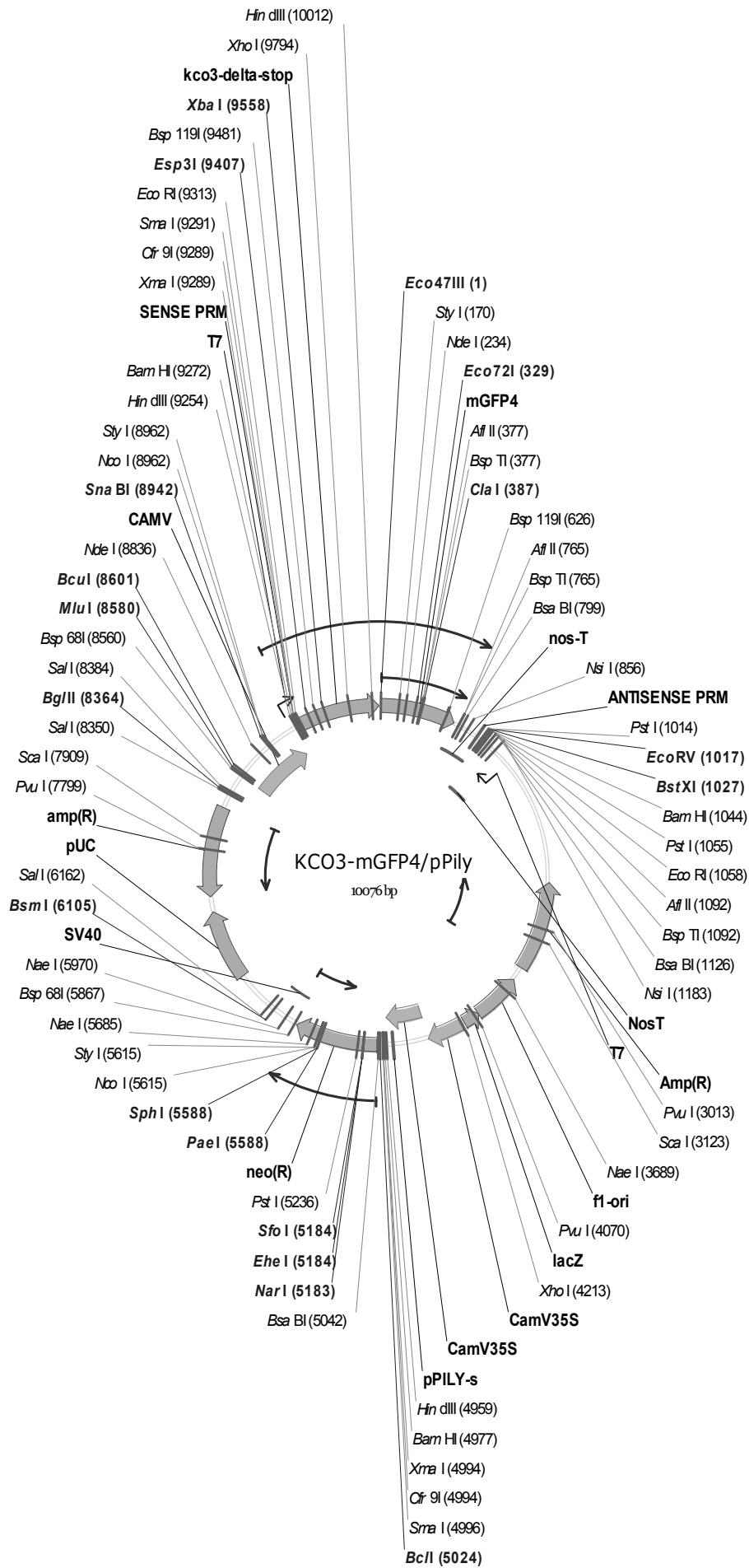
7. Anhang



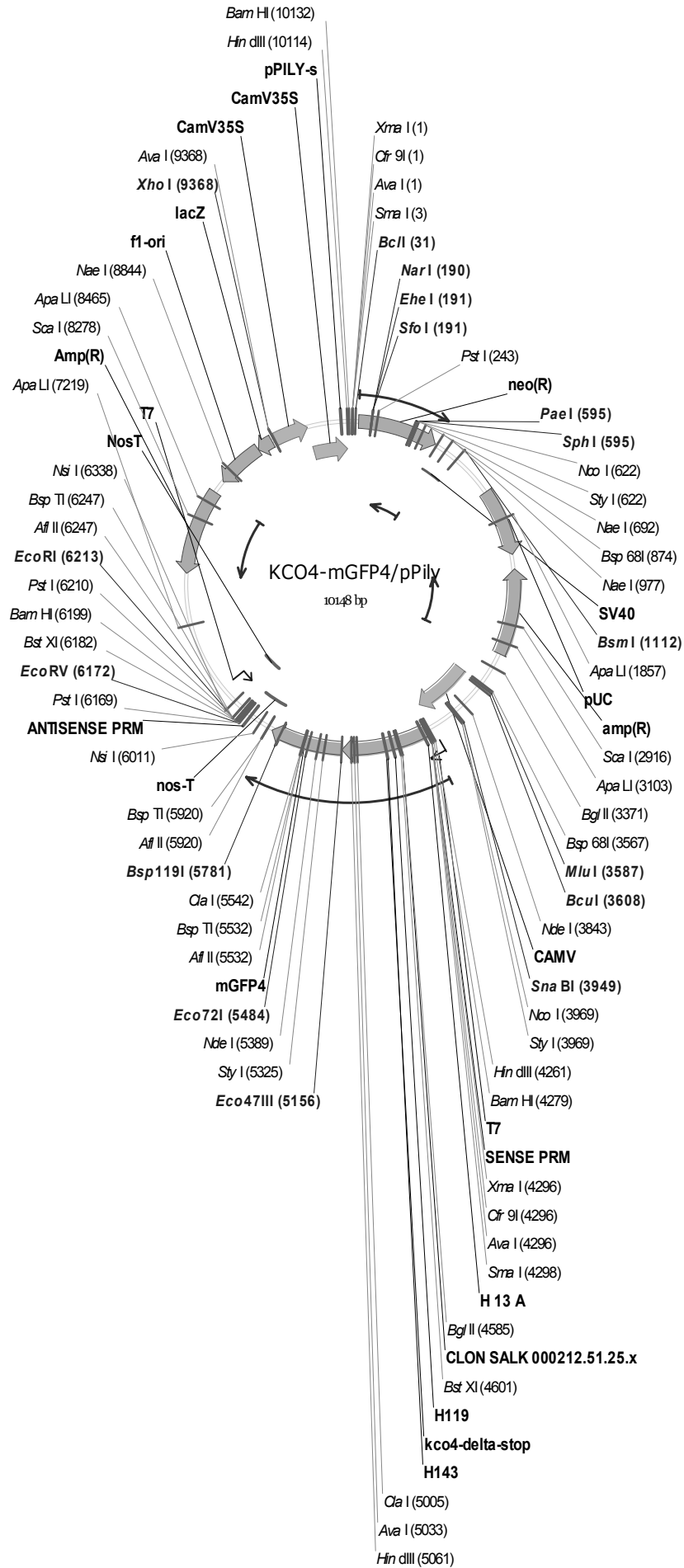
7. Anhang



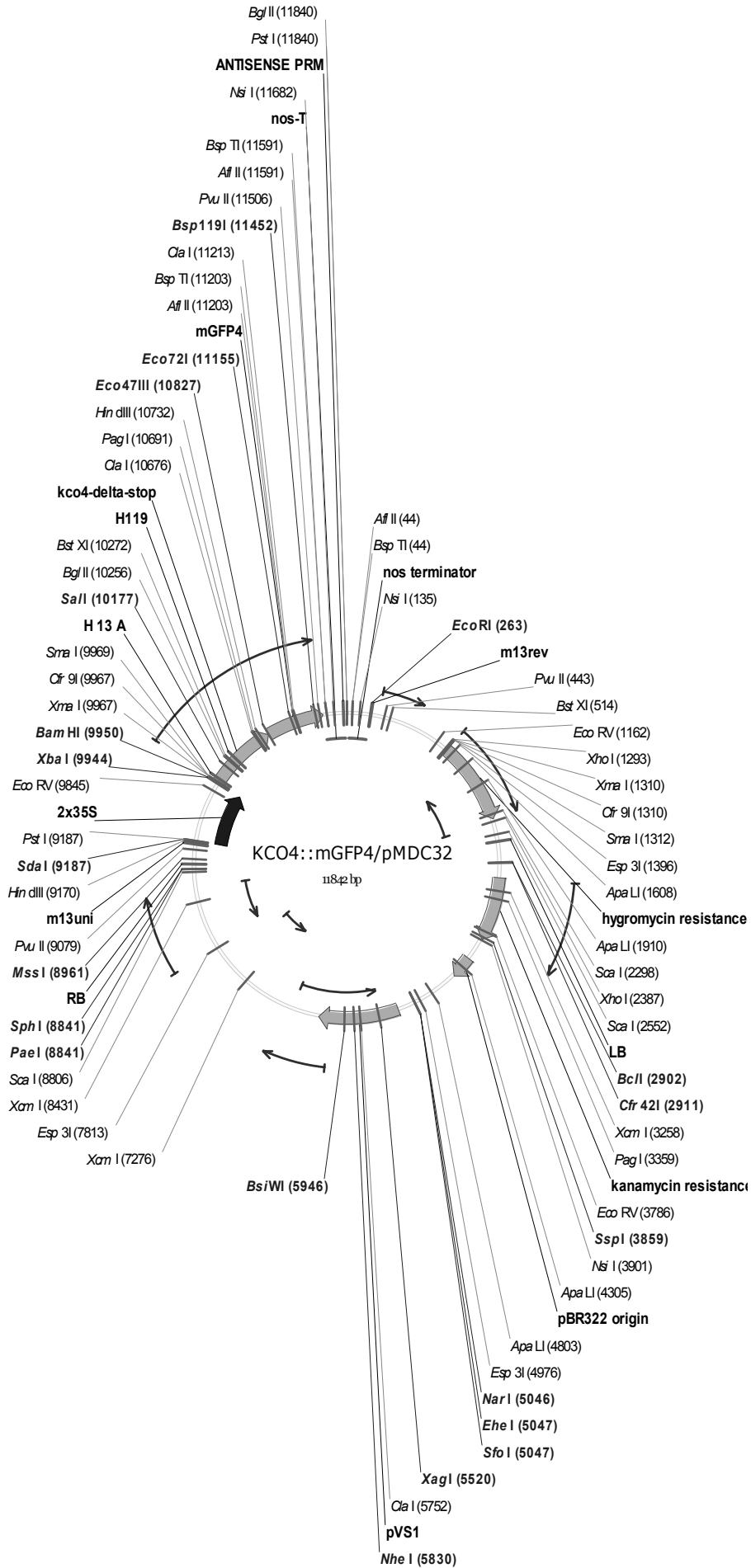
7. Anhang



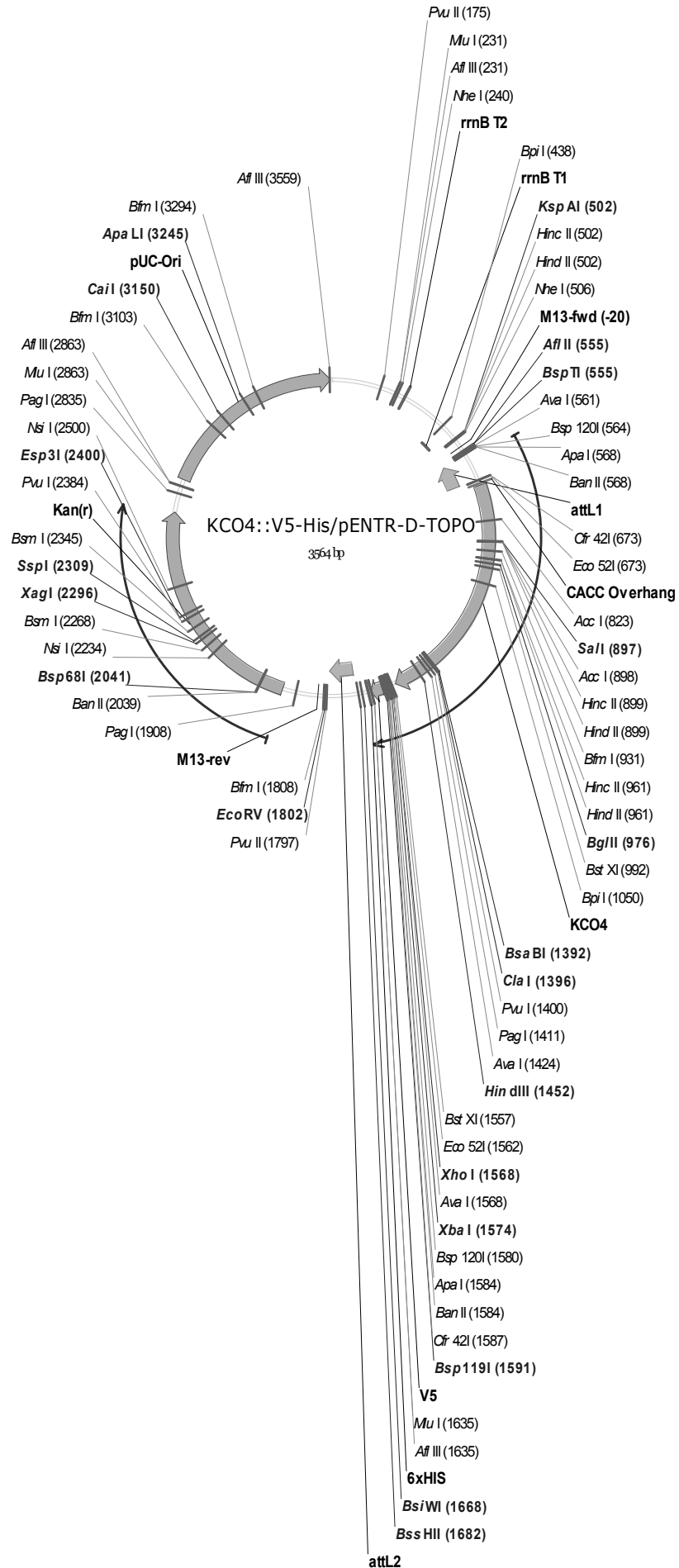
7. Anhang



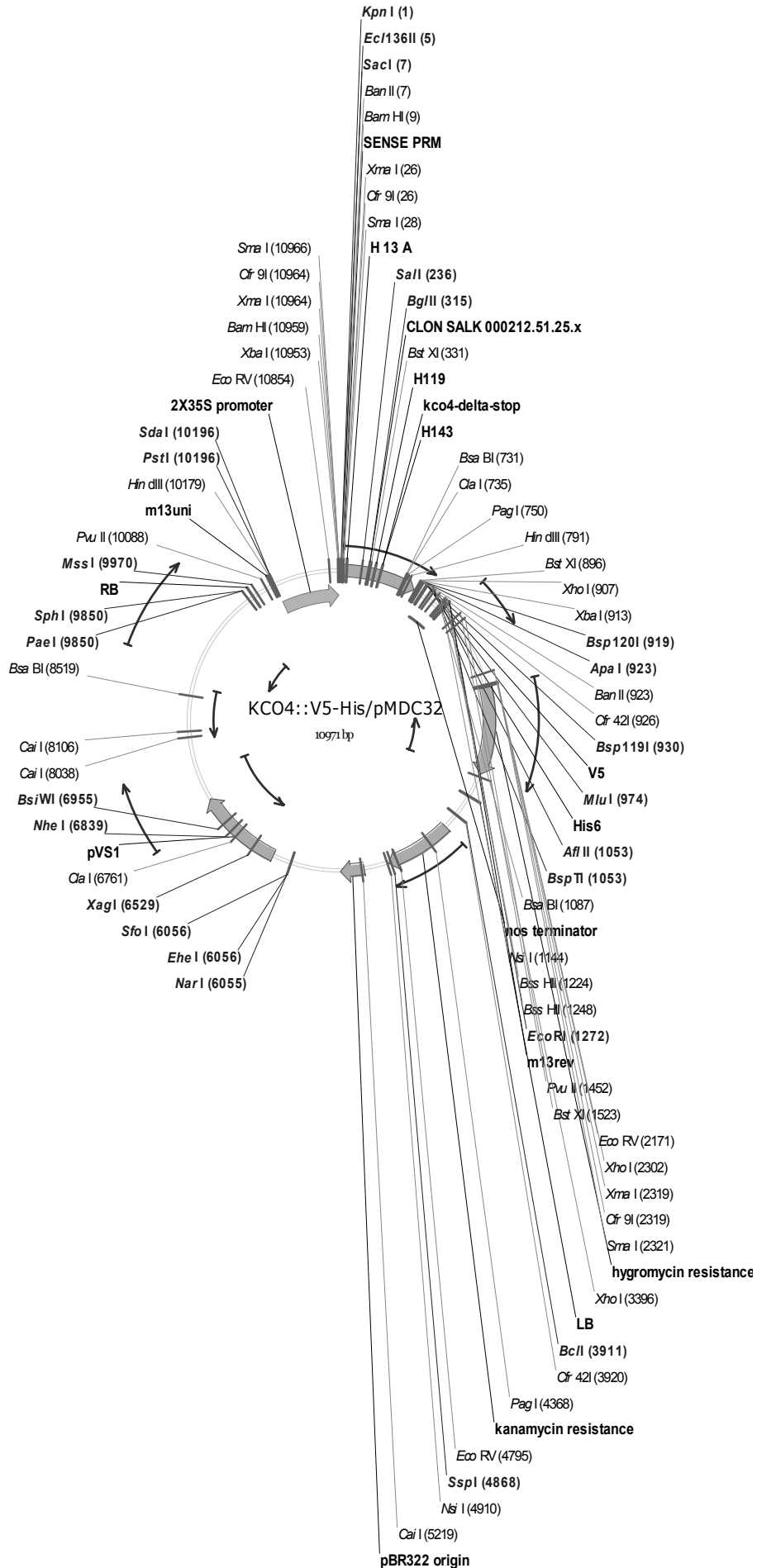
7. Anhang



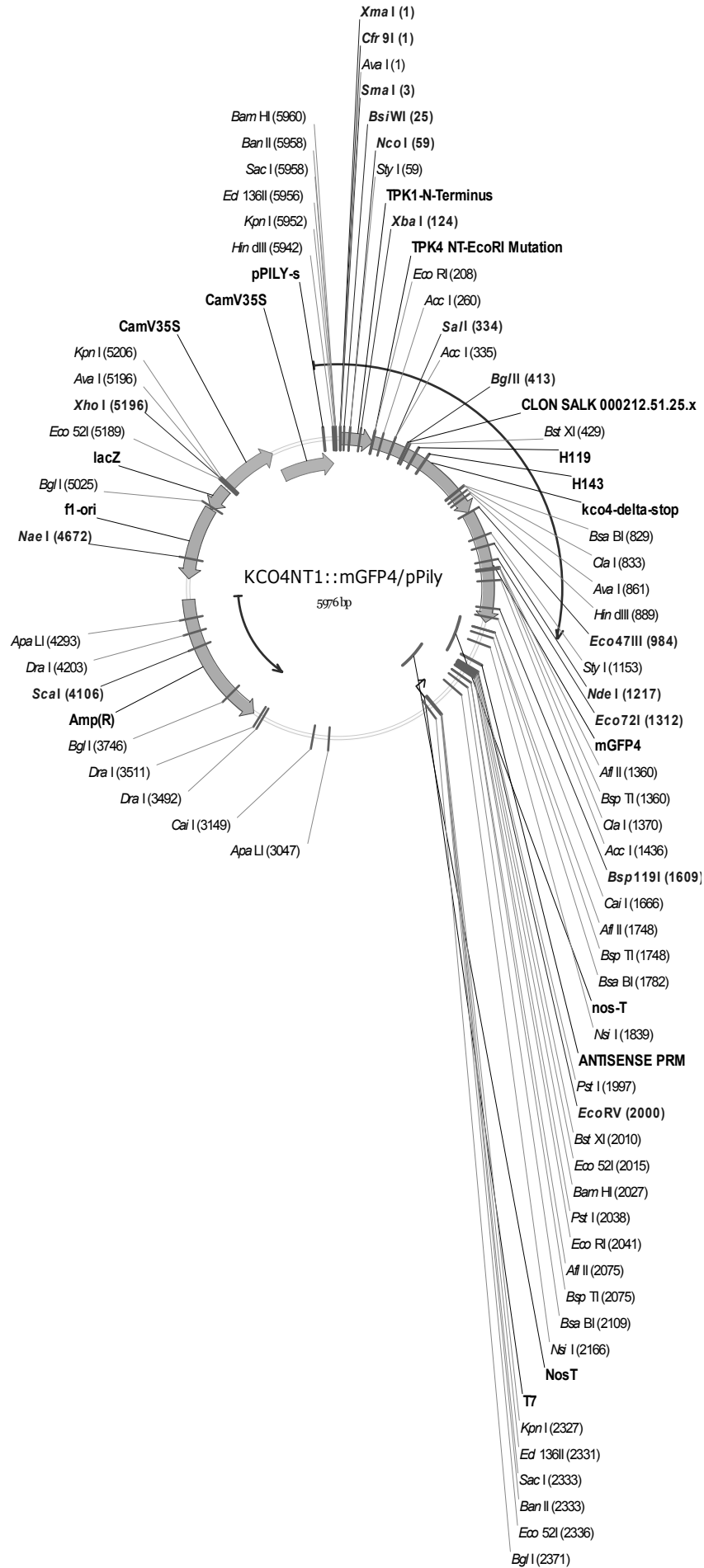
7. Anhang



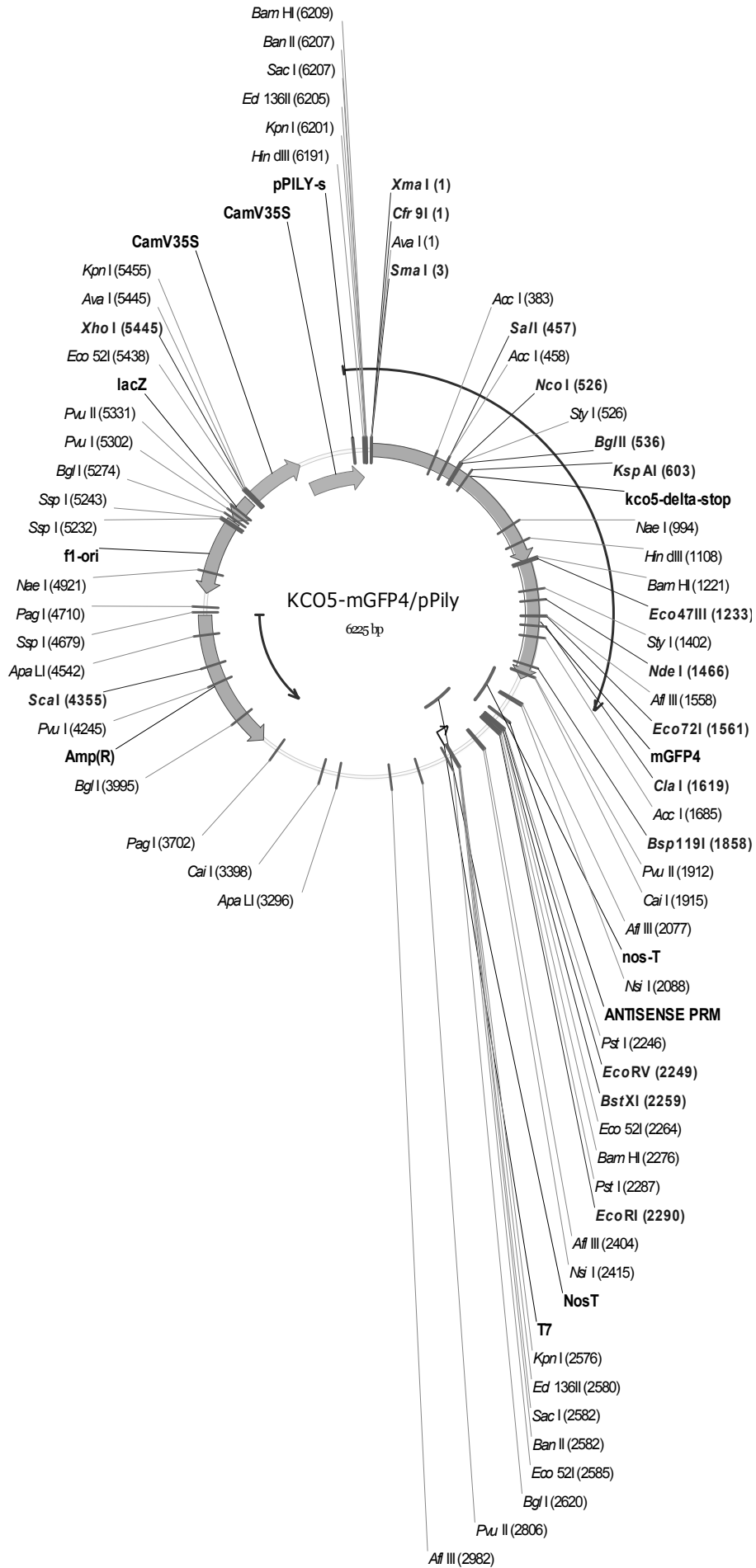
7. Anhang



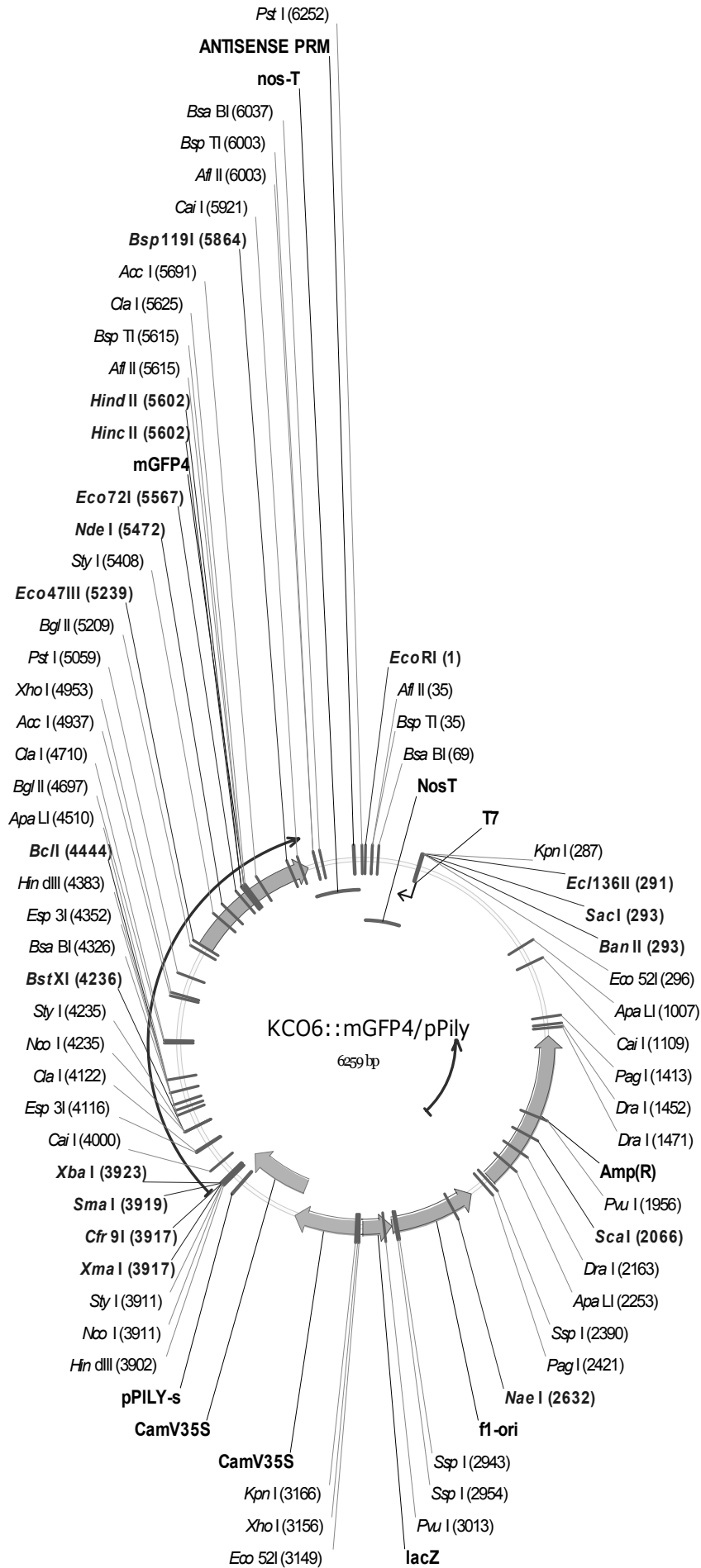
7. Anhang



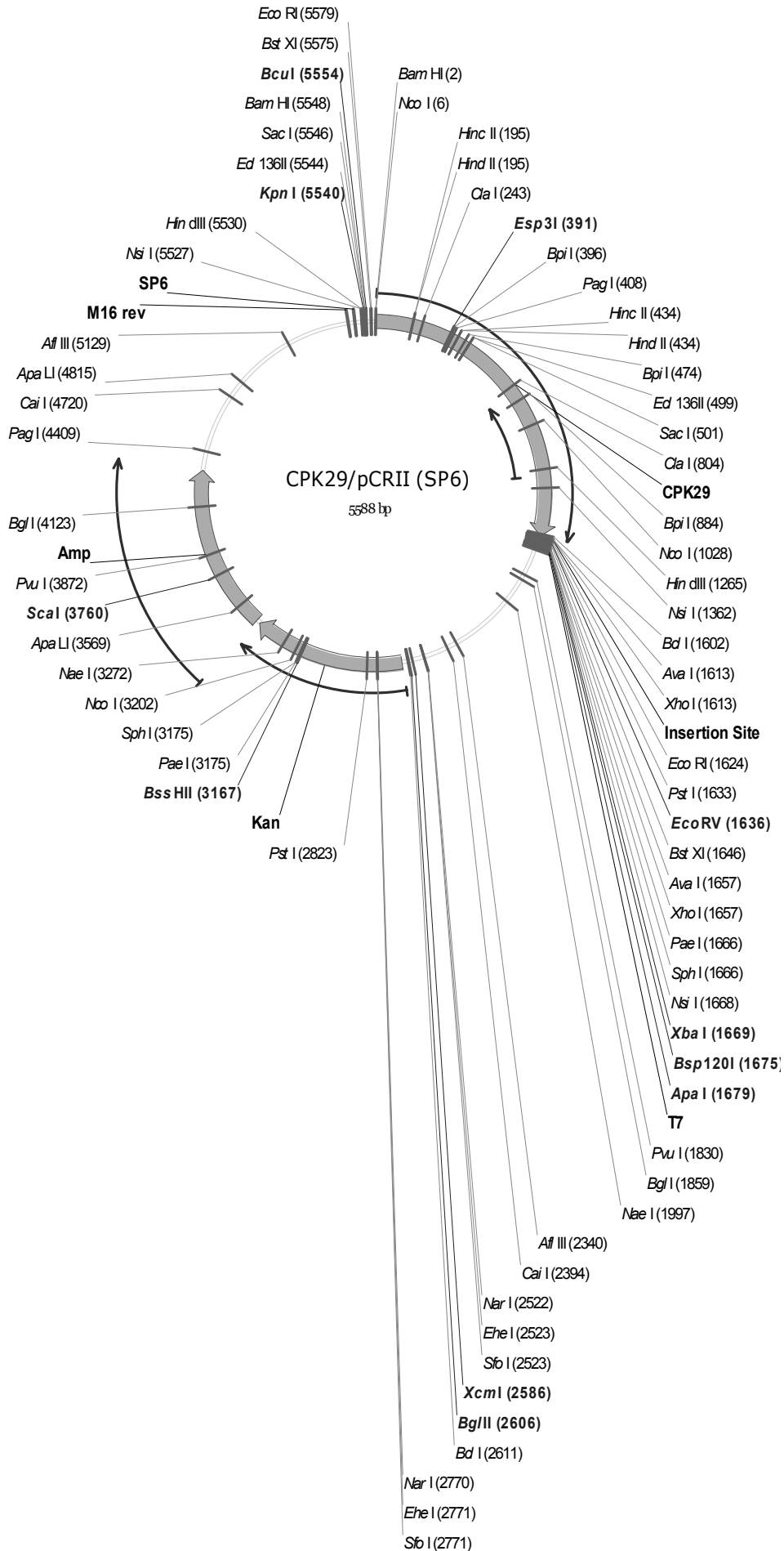
7. Anhang



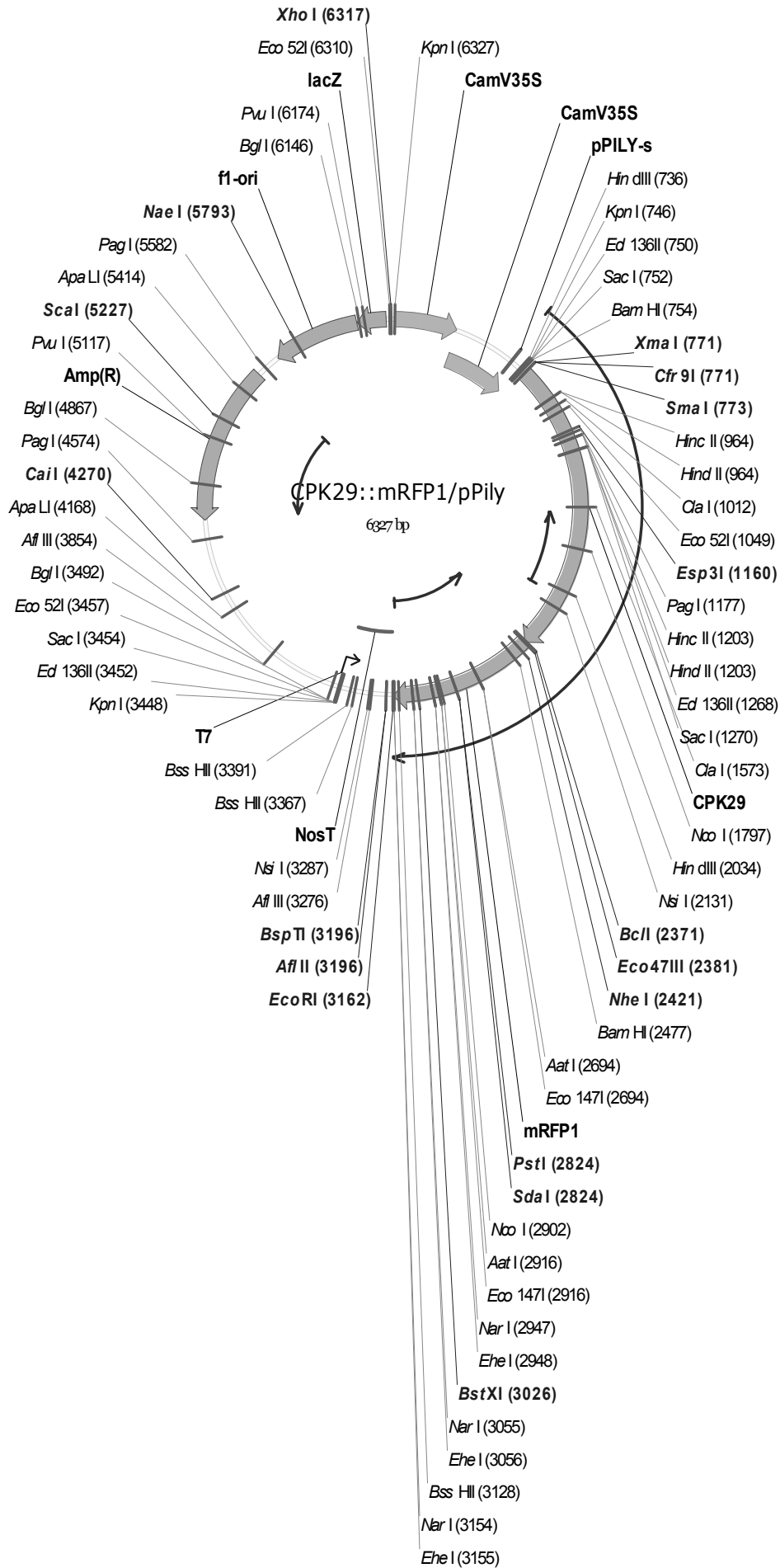
7. Anhang



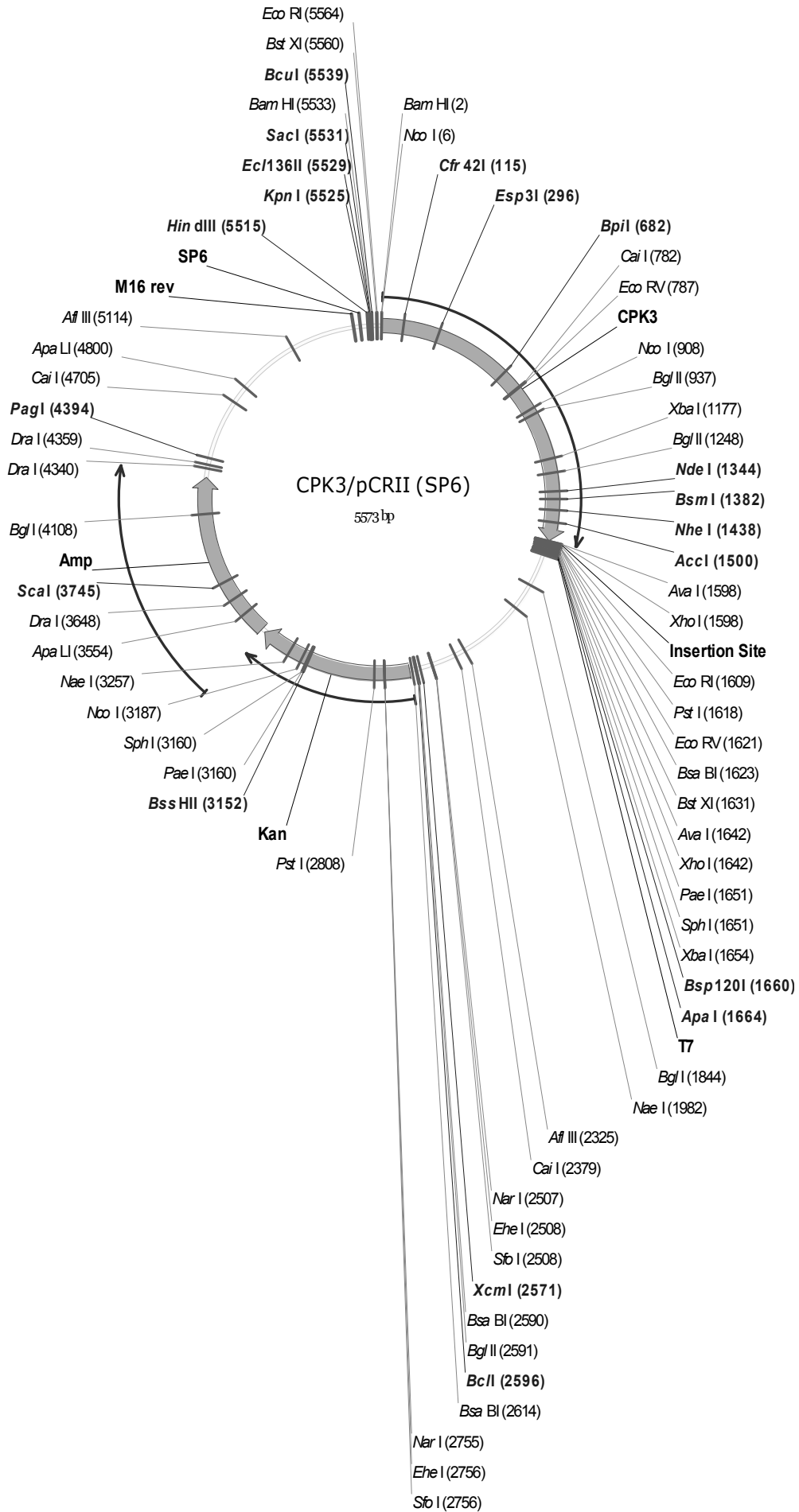
7. Anhang



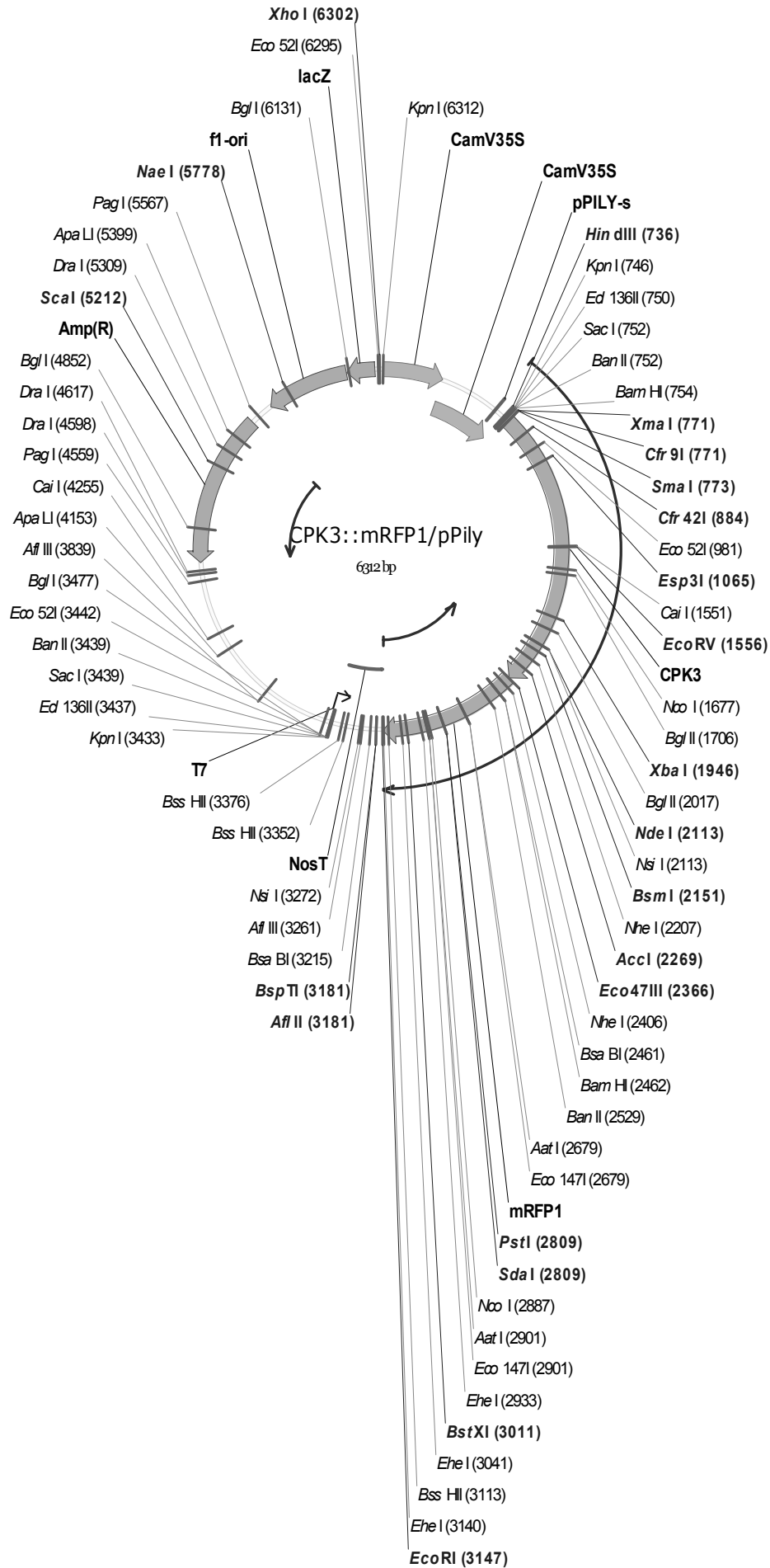
7. Anhang



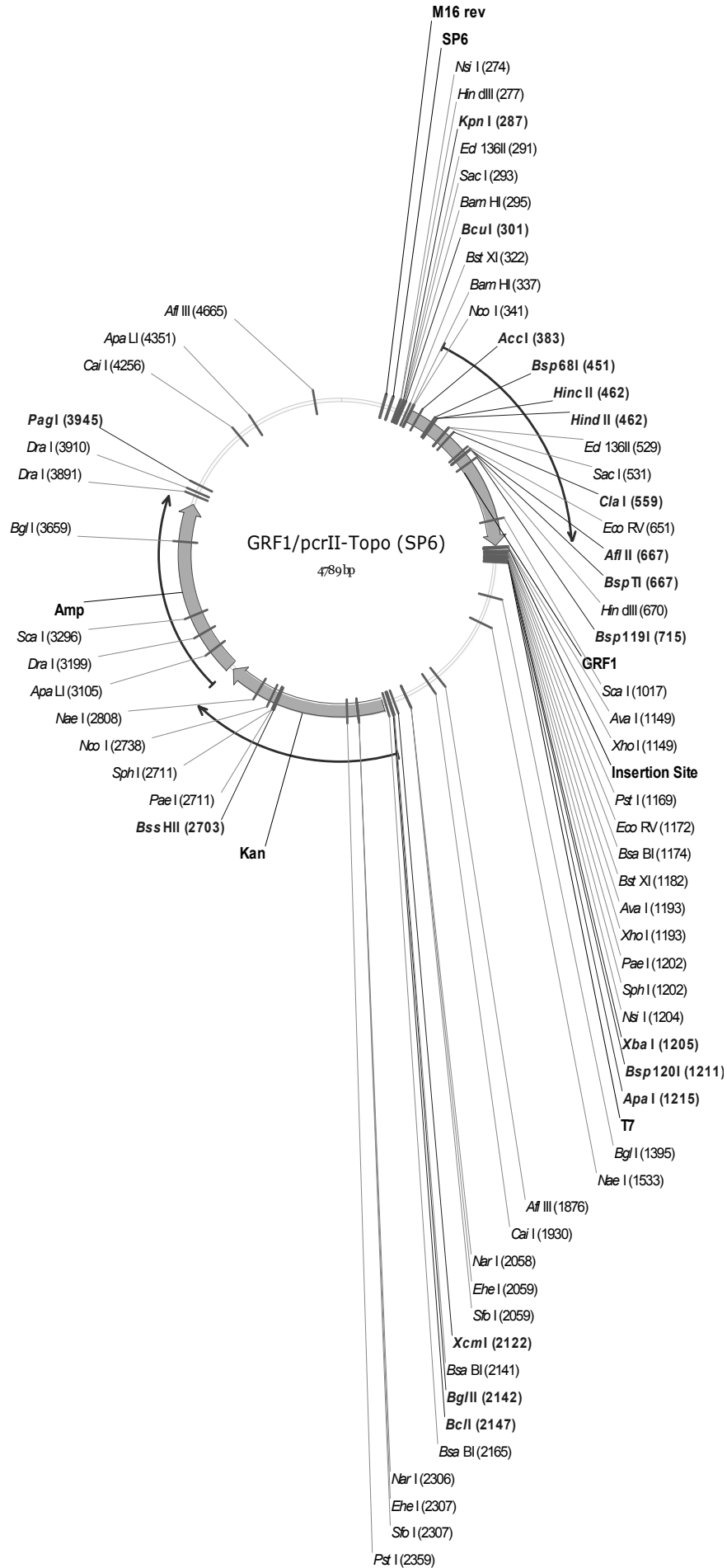
7. Anhang



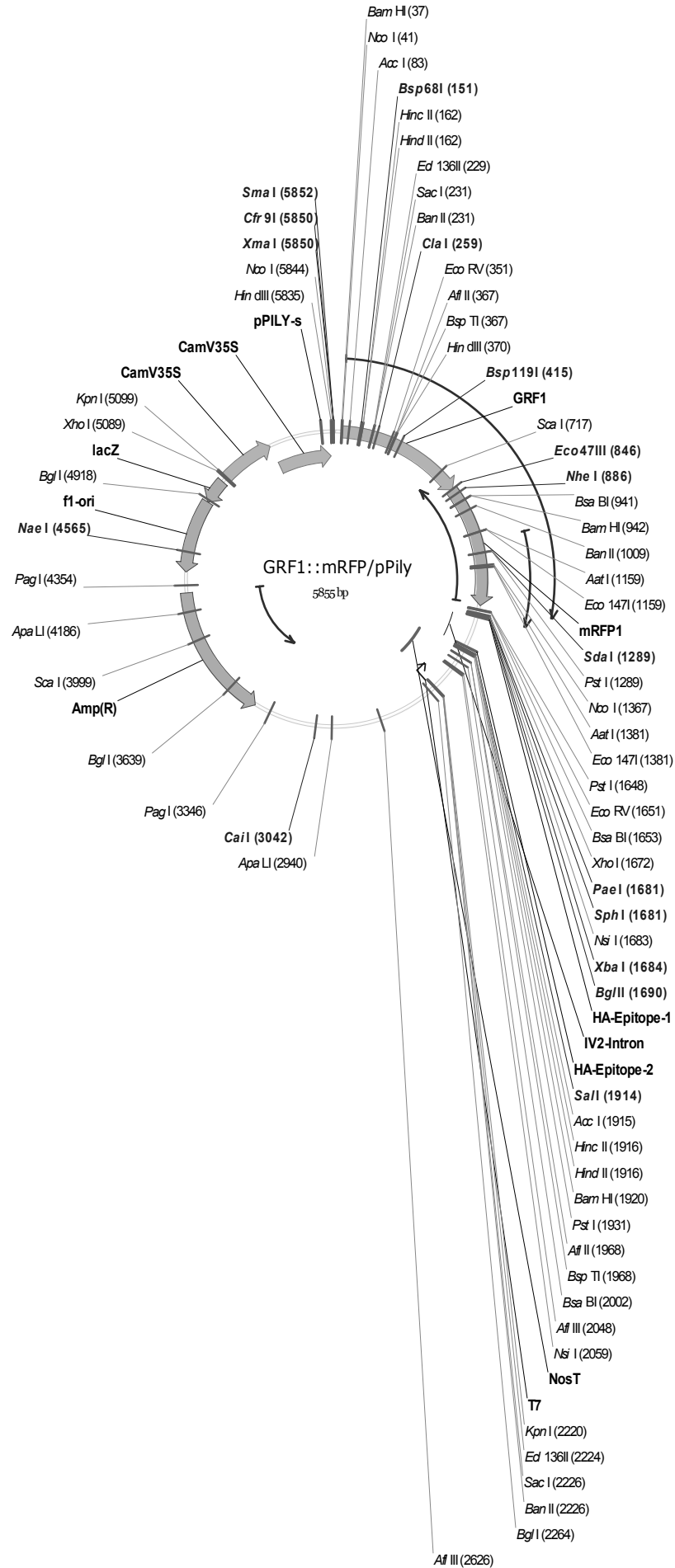
7. Anhang



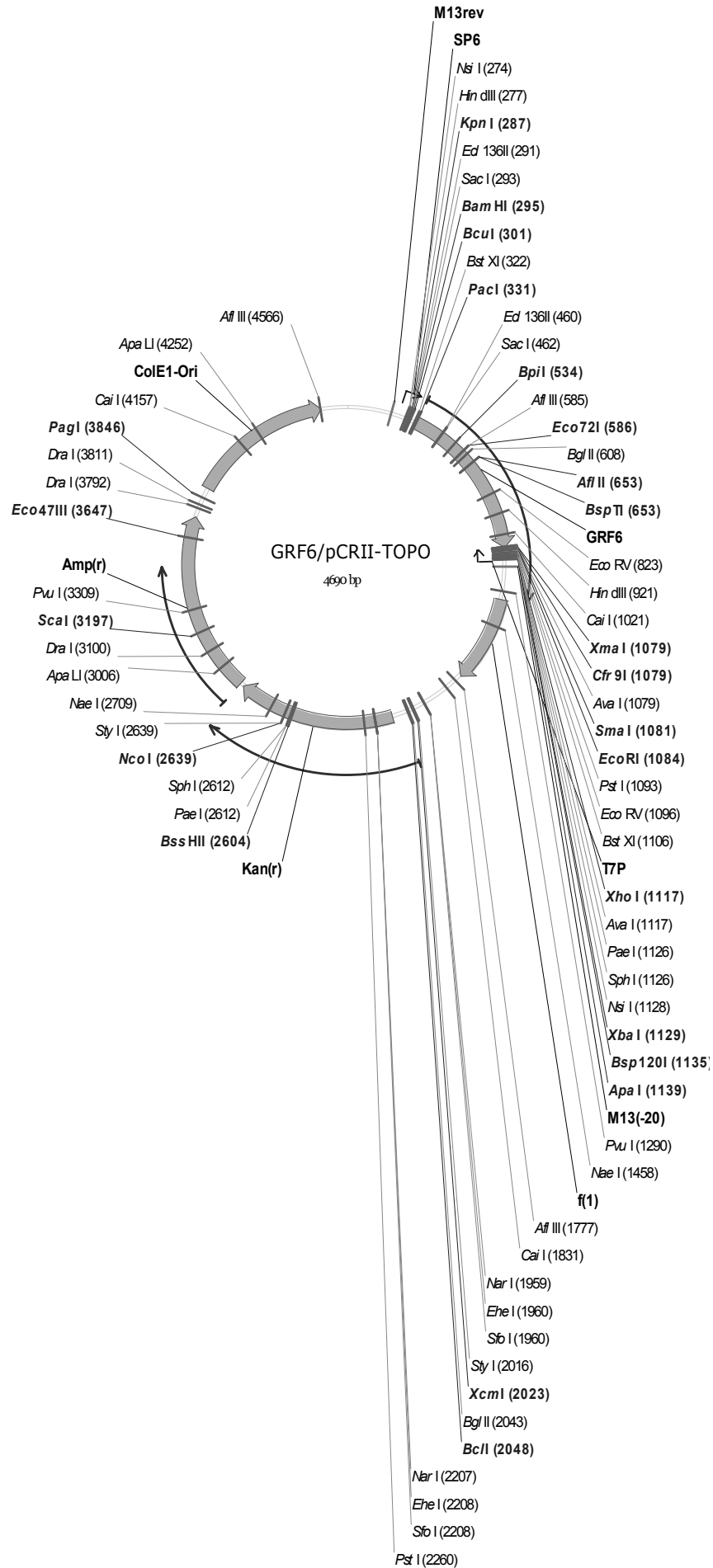
7. Anhang



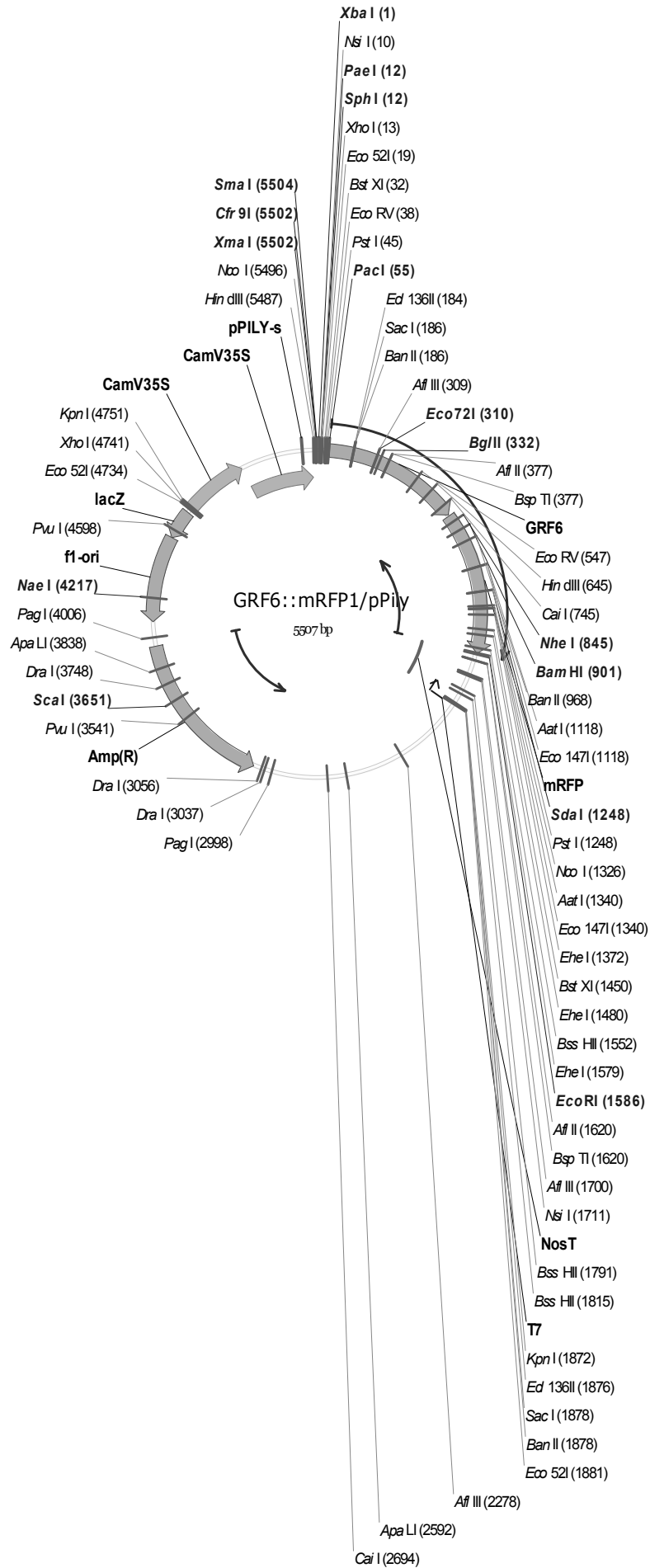
7. Anhang



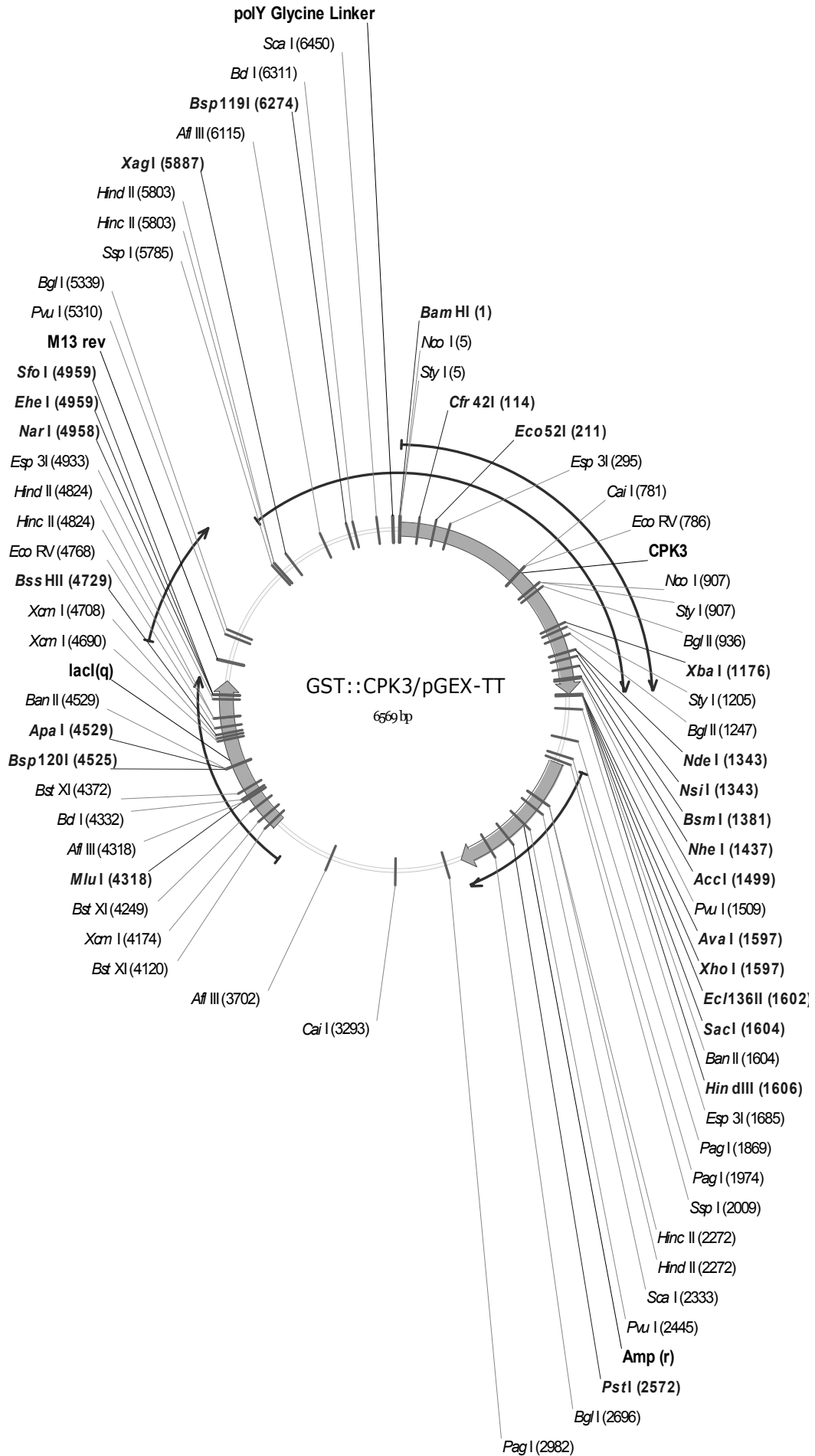
7. Anhang



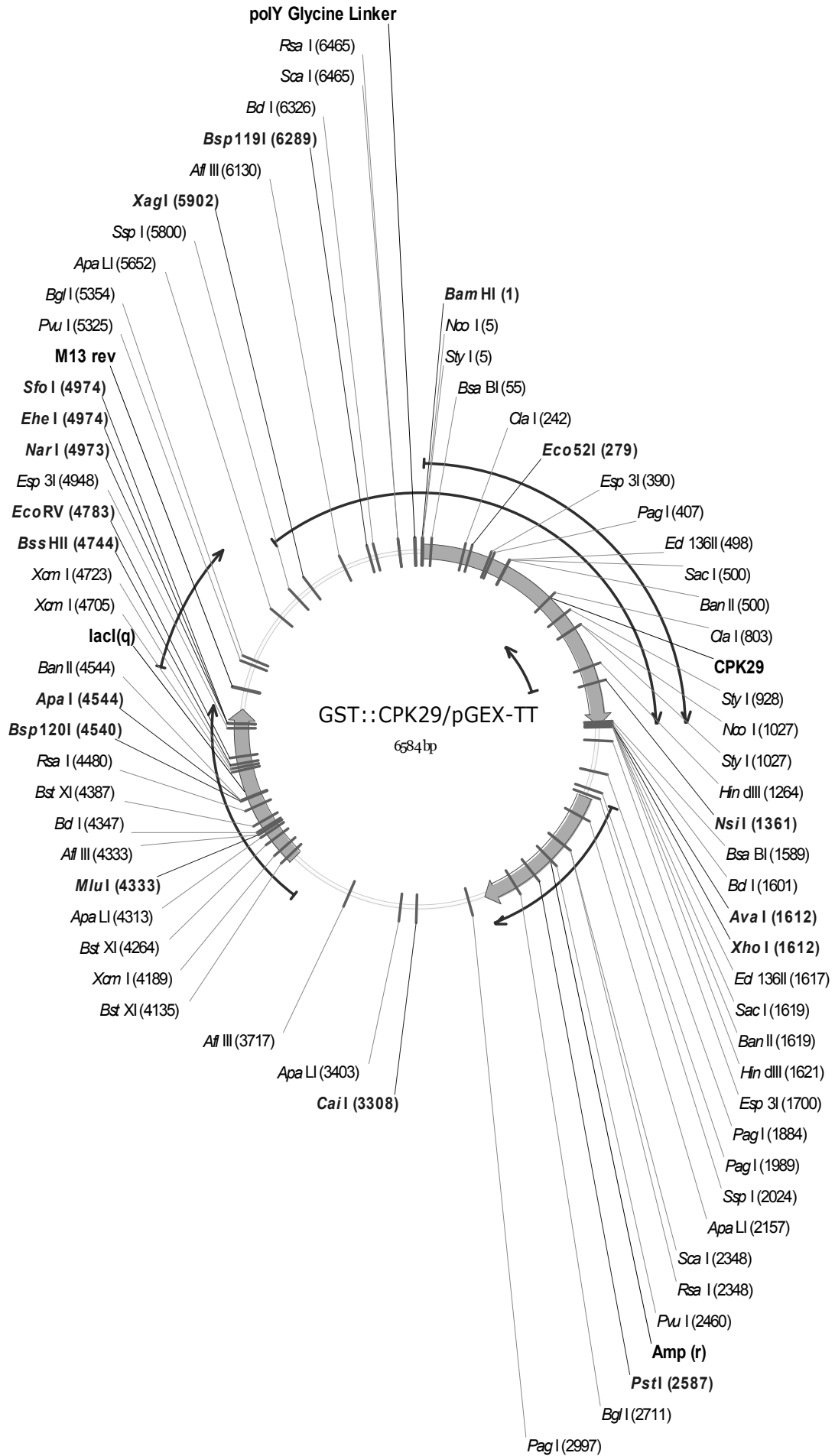
7. Anhang



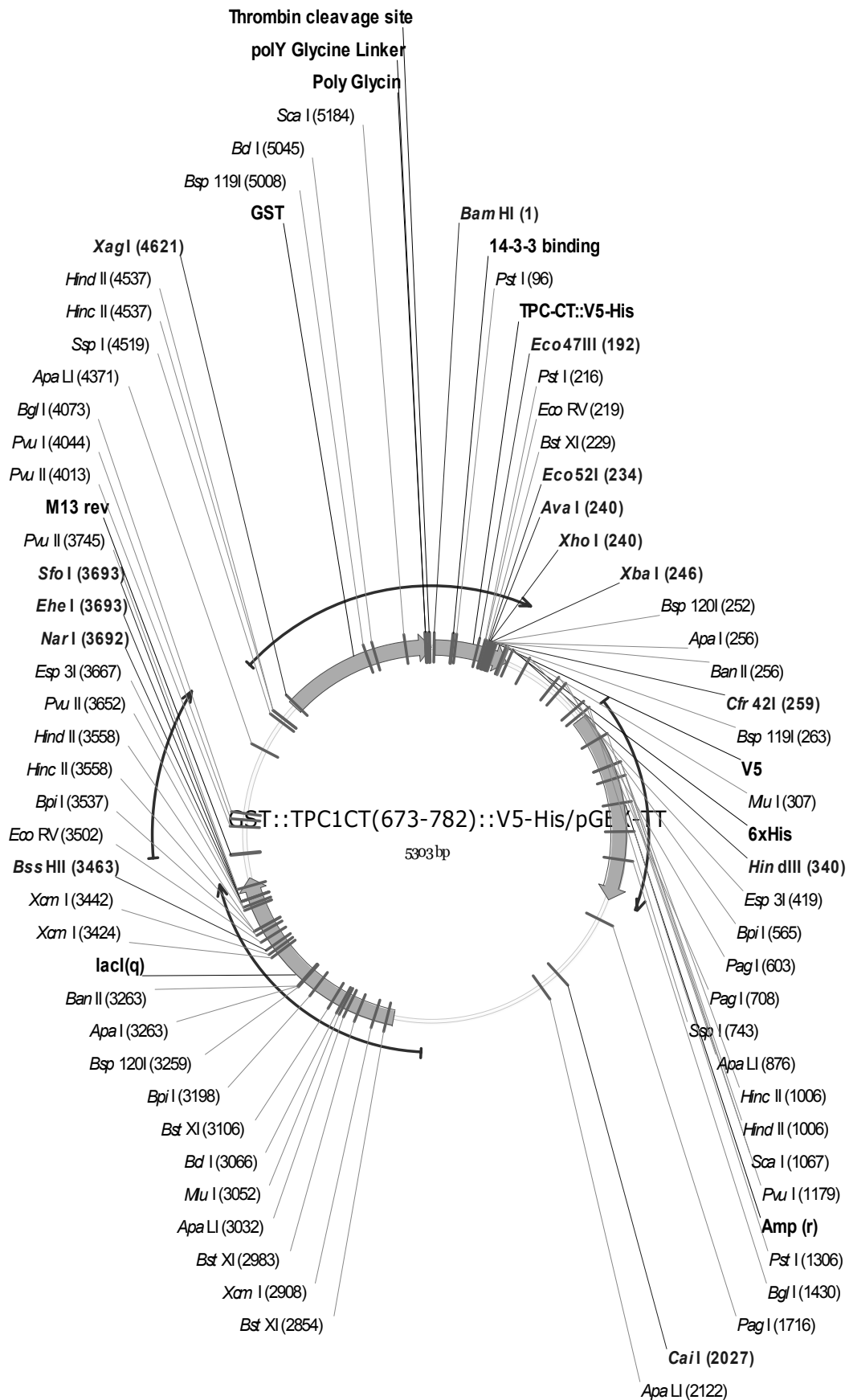
7. Anhang



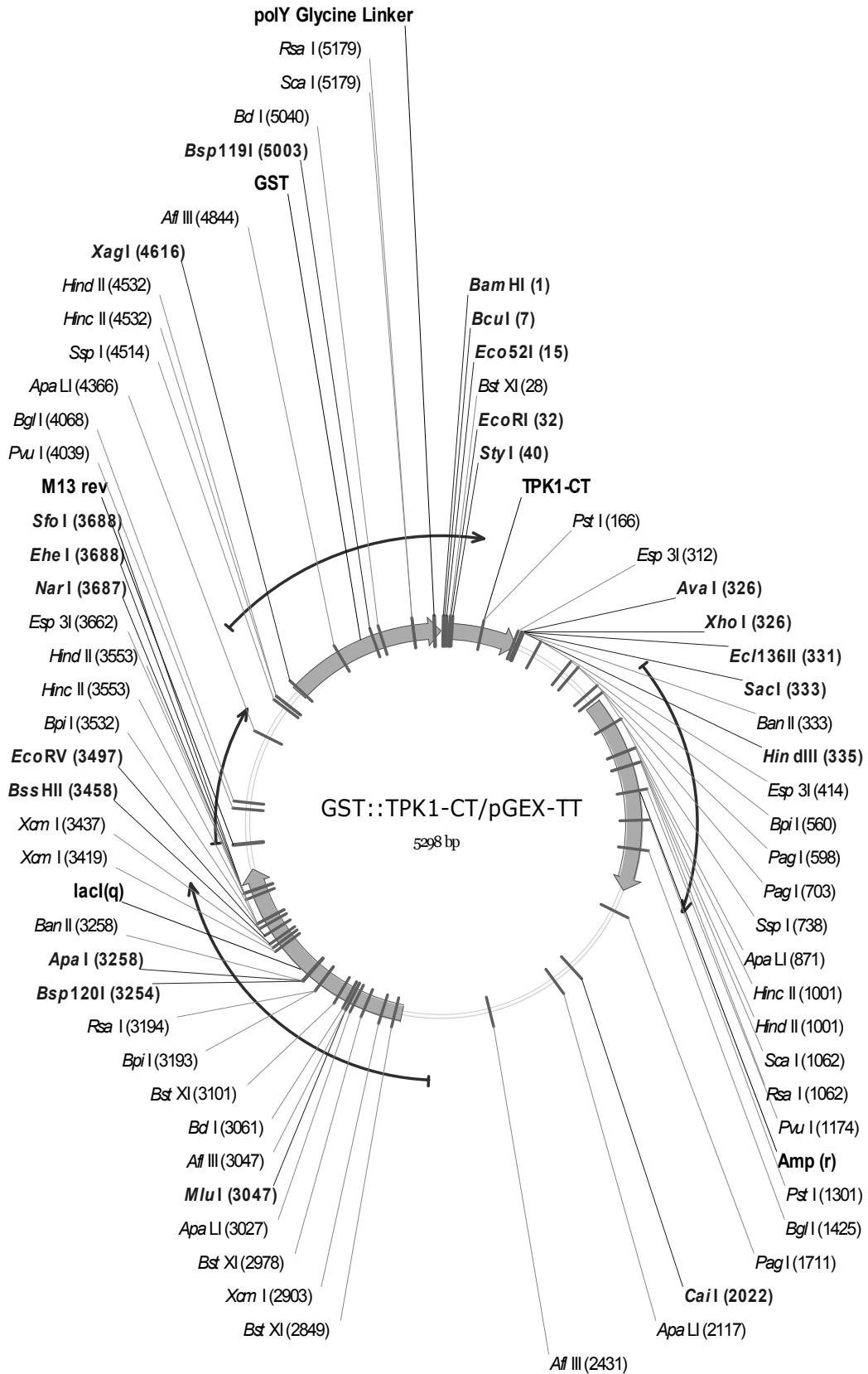
7. Anhang



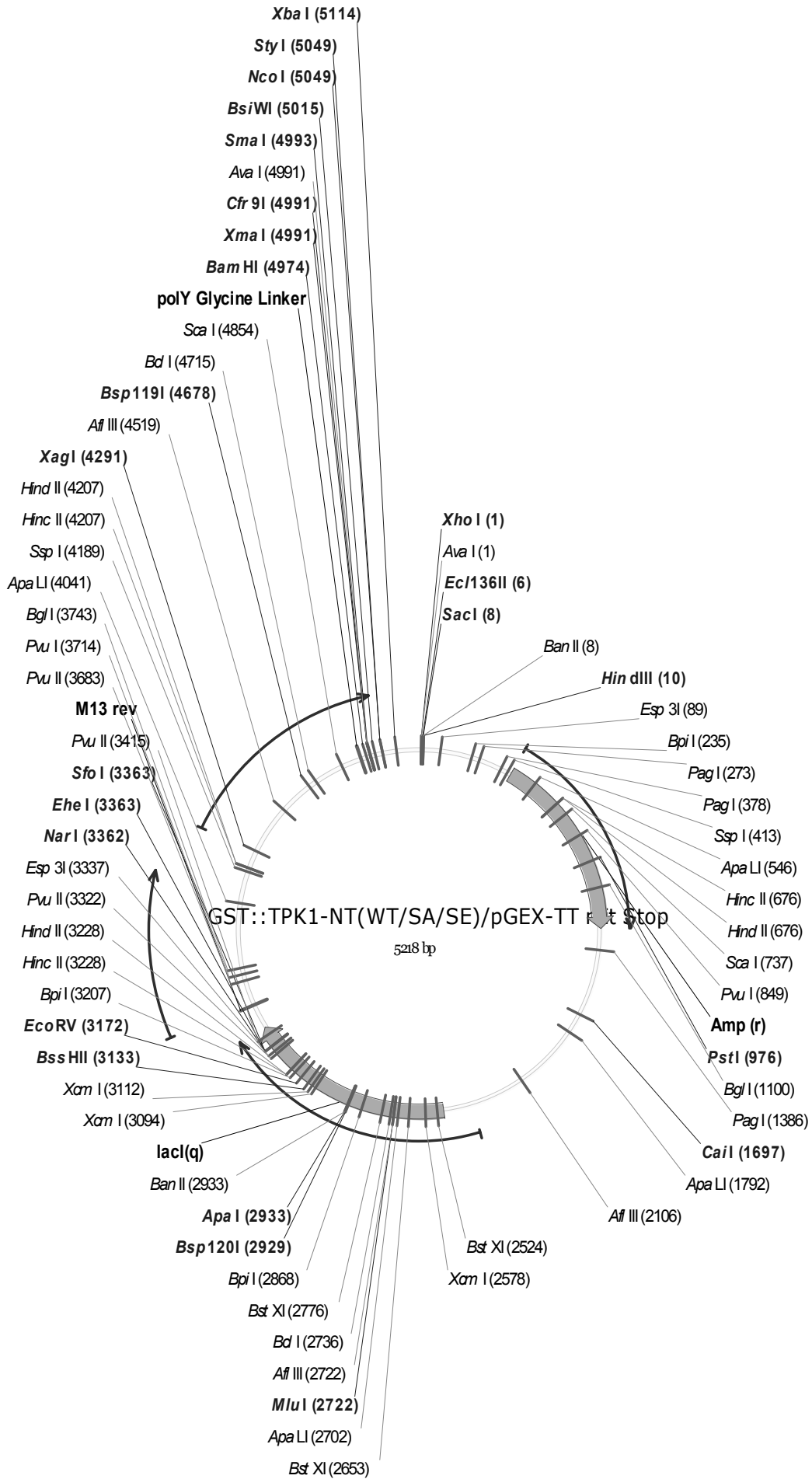
7. Anhang



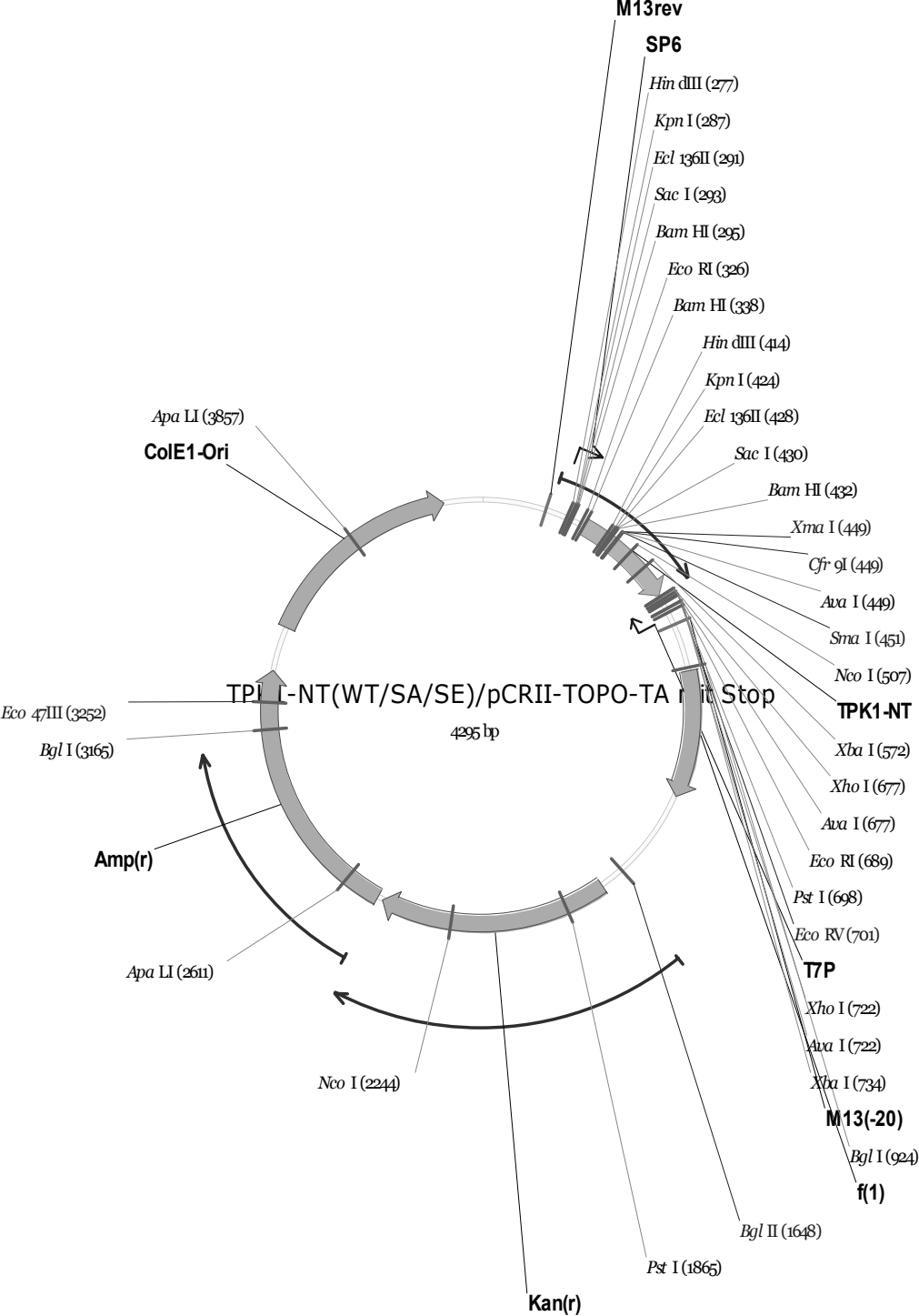
7. Anhang



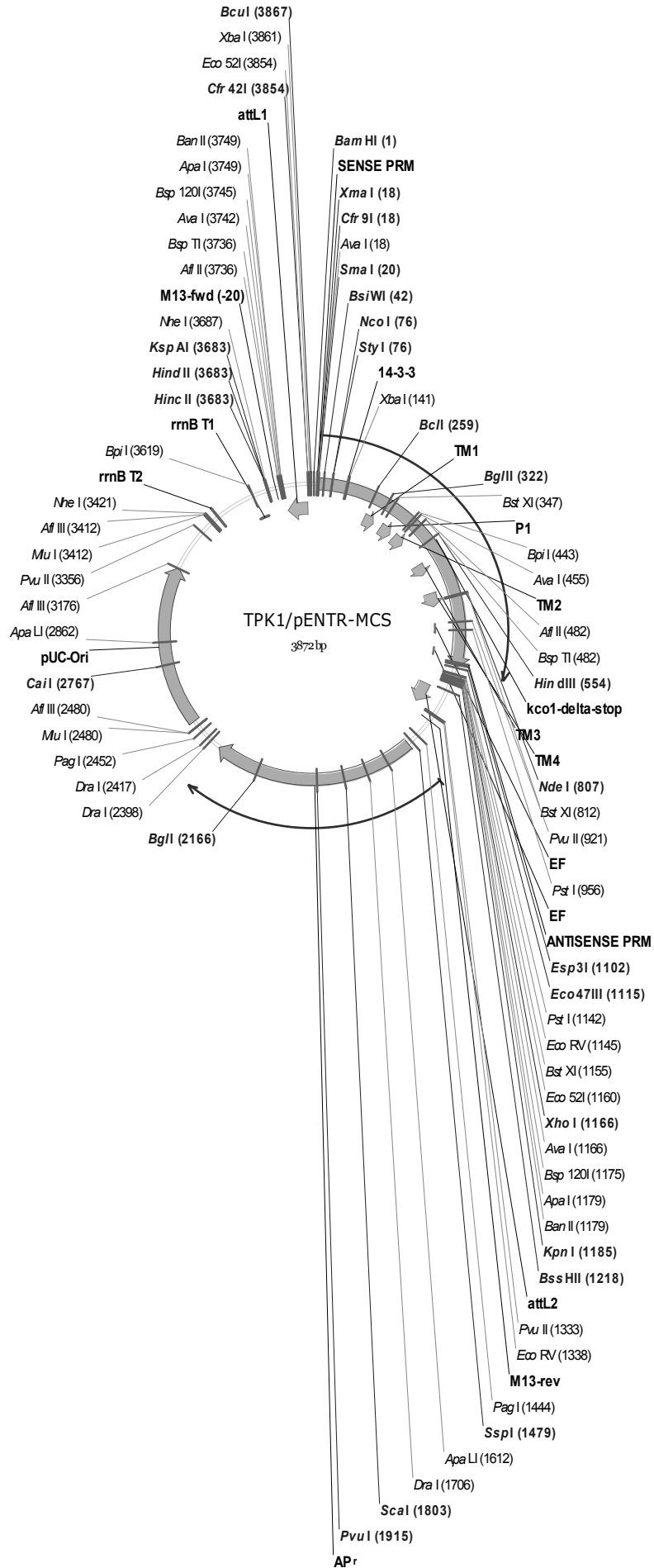
7. Anhang



7. Anhang



7. Anhang



7. Anhang

7.3.2. Sequenzen

TPK1 cDNA:

Atgtcagtgatgcagctcgtacgccattgttaccactgagaagatagataccatggctcaagattcaacctgaact
caagaacttcttctcaagaaaacgaagattgcgtcgtctagaagtgcctcctcgtgggtattgtatgtacaatgatgatg
tcaaatcgacgaaccacctcctcatccgagtaaaatcccaatgttcagtgatctaaacccgaatctcaggcgagtga
tcatgttcttggctttatatcttaccattggactctctgtttctacctcgtgagagaccagatctccggctataaaaccagtgg
tgtggtagatgctctctatttctgtatagtaacgatgacaactgttgatacgggtgacctgtccctaataagttccgcctcaa
ggctacttgctgtgcctcgtctctcgggaatggctcctgttgacaccttaagtcgagcggcggattatctagtgag
aaacaagaggcttgcgttagggcttccatttgcgtcaaagcttggccaacagacattctcaaggagtgcatact
aacaagttgagatacaaatgctatgctacatgccttgcctttagctcttattgttggcagatttccctgtaatgggtg
agaaaatgccggtatctcagcttctactgctgctccacgggtacaacattgggtatggagataagagtttaactc
ggaagccggacgccttttgcgtgttttggatcttgacgagcaccatattgttggctcagtttctctatgtagctgagcta
aatacagaaaacaacagagggcgttggtaaatgggttttaacgcaagaatcacaacaatgatctcgaagca
gctgatctcgtatgaagatggagttgtggagctgcagagtttattgtataaactgaaagaaatgggtaagattgatga
gaaagatatttctgggataatggatgagttcgagcaactgtattacgatgaatcaggaactctcacgactctgacatcg
tttagctcagaccagctctcagattcaaaggagcgcttaa

TPK2 cDNA:

atggctaacgacggtaacggcgataacaacgatgaccattacgccaatacttgatgaaccaagaatcaaccac
caccaccgtctctgtaaacattaccggagaacaatgacgtcacaattccgatgccaataactccattggaacttaaaa
ccgattaatcttccggtcattcgttcttagaaaagaatcatctctccatcgatgctctctcaaaaaccctctacgtca
tctccgccacaacctcattctccgattccacagacctccttctcccacttacggagcctaataaaccggttcggaaatct
aaaccgaccatcaattccaccggctctaaaacagctcctgctatggctgcaatcaacaatatactcatccaatgatcc
caaacagatcagcaatctgattcgaaaactattgtaaccaagctgttcttactgttgtatctatccttaggtgtgct
tatctattggttgaatcgagatagctacaatgtgaagcagactcatcctgttgttgatgcttcttactttgtattgtacgatgt
gtacgattgggtatggagatataacgccggatagcgtggtagcaaacgctgtttcgaatattttgtgcttgttgggttgggtt
tatggatataattgcttagtggatgggtacttattgttctgatctcaagaaaactatattgtgaaactgcgaggaatgaaa
gcttgaactgaatgatcgggacaaagtgagatcgtatataatcgatgtcaagaaagggaggatgaggattagggtga
aagtaggggtggcattagggtgttgggtgtatgccttggattggagtttgattatgcatttggtagaaaatcgggtgggt
ggattcgttttattctcgggtatgctcgggtactacgggtgggtatggtagccgggttttaataccttggccggtaggcttctg
ctcgtatgtggttcttcttactttagcgggtgctcagcagattttgttttggctgaatcaagagttgataagaggaatag
ggagcgggcaagaaagttctcggcgaagcatgtctatctcagttcttagatgcggatctcagctgtaatggctgc
gtgagtaaagcagagtttgtatatacaaaactaaagaagatggacaaaataaccgaaaaggacattaacccgatcg
gttccagtttgacaagcttgaccgaaccaatagtggaaaggattacacttttagatcttttgaaagcagcacaagaaat
ttaccactgcaacttctatttag

TPK3 cDNA:

atggccaacgaaggaagtgacccttacttcaatacatgattagcccagagattgaaaaaacctccacagctgctgtttc
cattaccagaagacaacgaagttgcgattccgatgccgatgacaccgtcggagttcaaagagcgtttaatcttccggac
ccttttcatgttccggcagagattcgtctcacttcatcgattccatgaaacaaccgtcaccgtcgtcttcaaccgccgtt
aataatcctttctcggattcctcaaccctagatcctctgcttccaccaccaccacaaccagagccatgggttccgat
caactcagatcactgtcaaggccacgctctcaccgatccaaaacagcaccagcaatggctgtaatcaatgatctt
catcacccaattcgtcaaaaagatcctacagagacgtcacgatctgtagtaagacaagctttgctctctcgttgtgatac
tctcttaggtgtgcttatttggctgaatcgtgatcactacgttgaatcaaacctcctgtagttgatggattgtatttt
gtatcgttacaatgtgcaccattggtatggagacatcactccaaacagtggttactaagctgttttcgattatgtttgtc
ttgttgggttgggttcttattgcttagtggatggctcttattgttcttgacctcaagagagctatattgttagactctgct
aagcggagagatgagcctgagaagaggagatcttataatcgatgtcaagaaagggagaatgagaattagggtga
aagtggttggcattagggtgttgggtttatgcattgctgttgggttgggttattgcattcattgaggaaatcgggtgggtg
gattcgttttctctcgggtatgctcgggtactactgctcgggtatggagatcgggcttttaagacattgcccggtaggctttc
ctcgtatattggctgcttgtctacatttagctgtggctcagcctttttagcttggctgaggcagagagtgagataagaggaa

7. Anhang

tagagaacggggaagaaagtgttgaacaatgtctgtctcagttttcgctgcagatattgataacaatggctg
tggagtaaagcagagatgtgatatacaactgaaggagatggagaaaataaccgataaggacatactaccaatc
tcaaacagttgacaaactcgaccgatgcagcaacggaaagatcactcttttagatctcttgaaggtggcagtgcc
gatagcgcttaa

TPK4 cDNA:

Atggaagaagagaaccttctcaatgagaaccttctccatccaacgagtcctcaccggaagaaactcaagtcacca
ccgtatcaaaatcgaaatggaccattctgtactagccatgatcctccttggctacttaacctcggggttgcacatac
tattctttcgagaccaattctccggaaccgagaccaatcttttcgctgcagccttctatttctccatcgtcacattctctacg
tcggttacggggacattgtcccgtcaacttcaacgaccaagatcttgaccatcgtcttggatcaaccggcgtcgtatttct
tgattatctactcaaccgctcgtgagtcacgttctaagtcttcaagaaaacgcttctgatcgaatcaacaagacaa
gaaacagagcagattagagatcacattgccgaagatggcaagataaggtaaagtggaaactttgttagcgttttgcgc
cgttggctctcgcgctcggaaagtggagccttgttctcactgcttccgagagattggattgggtgattcggttactgtcgggtat
ctcggtagcagcgggttggtacggagataaaacgttaagacgggtgaaggagaggctcgcagtggtttggcttcttctt
tcaactattgcaatggctactctgttcttacttggctgagatgagaatcgatcgtactactgtcatgaaattgccccgag
tgaatcagagttattgttcaagcttagagaaagtgggaggattagtgaggatgatataaagcagatcgaagaga
gttcgagaatctgaagaagtgccatcaagcggatcaagcgcttaa

TPK5 cDNA:

atggaaccactcatcagcccacaaccacgtttccgctccaaccataaccgaaaatccctcctcctcctcctcctccg
cctccatcaaatccctcgtctatctcaaacacttcttctccatgaaatcccaagaacgtcttctccttcatcatcaa
gacctcgaacaatccgtacaagacgacaaagaagaccaagactcagactcagacgaaacaaatcgcttttatctc
agacaagaccacttaccgatctcgtacagctccagctatggtaatcatcaaagacttaagaaccaaacctccagaa
acaaaaaacatcaccagtctctaaatccataatcagacaagcgttttctgtaatcgtctacttaaccttaggcgtt
caatctactcattcaatcgtgaccactactcaggaatcgaaaccatcctgtagtcgacgctctctatttctgtatcgtcact
atgtgtactattgggtacggtgacatcgcctccgtgactccatggacaaagatcttcgctgtgtttcgtctgttcggattcg
ggcttggatatttactcagtggtgtgtaactacgtttggatctcaagagagatgattctcaccggaatccaaacga
ggcagcatcatcaacaccatcatcatatagattctctgctaaagattatattgattttgagaaaggaggatgagg
ataaggatgaaagttttagcgttatgctgctcgtttgtgtatcgggtgttggcttgggtttgcattcgttgaggattg
ggtttggattcgggttatttgcggtatgctcggtgactactgttgggtatgggtatcgtgcttttaaacgctcaagggag
gcttttgcggcgggttgctactgttctgactctgctgggtggcgcgctgcttttgtatttggcggaaagcagagaattgatcgc
cggcatcggaaagctgttaaattggcgttgaatagagaaatcactgttgatgatttgcctaaagctgatactatcaacat
ggttcatcagtaaatacagagtataatgttgaagcttaaggaaatggggaagatcactcagaaagacattgaccaa
gttgatcagttcgagaaactgatcctaatacaataggaaaaatcacattacctgatctttgggggatcctttgagcg
cttaa

KCO3 cDNA:

Atgccaatgactccatcggaaatcaaaaaccgattactctcggctcattacctcggatcctccgatcccacagacct
acaattacggagcctaacgtaccaccgtctctgtttctttaccagaacacaacgacgacacagctactgatatggctc
ctgaccaggaacagagcaatcagttcgaatccattgcaagacaagcacttgccttgccttgtgtatctctcttttagg
tgtcttatctattggctgactctagatagcgaatcgtatcagactcatcctgttgccttgccttcttttggtaac
attttggcttttaattgtcattttgtgtaaaatcgggtgggtgattcgtttgttctcgggtatgatgggtactacagttgg
gttgggtatcgggctttaaatacatggcttggtacgttcttgcggttgggtgctgttctacttttagccgttgcgagcg
ttttgttttggctgacgcaagagctgataagagaaatagagagcgggccaagaaagtgccttggcagagacatactc
tatctcagttcttgcggtatgacaacgatggctcgttgcgtttagcagagtttgaatatacaaaactaaagcagat
ggagaaaataaccaagaggactttatacaaatctgtaaccagtttgacaagcttgaccgaacccaagtggaagg
atcactctgttgatttaaccaccgcaactctgttagcgcttaa

7. Anhang

CPK11 cDNA At1g35670:

atggagacgaagccaaaccctagacgtccttcaaacacagttctacatatacaaacaccacgattaagagatcatta
cctctgggaaaaaagctaggccaaggccaatttgaacaacctctctgcacagagaaatcaacctccgctaatta
cgctgcaaatcgatcccgaagcgaagctcgtgtgcgcgaggattacgaagatgatggcgtgagattcagatcat
gcatcatctctgagcatccaaatggtgtaggatcaaagggacttatgaagattcgggtgttgcattatggtatggaggt
ttgtgaaggtggtgagcttttgatcggattggttctaaaggtcattttagtgagcgtgaagctgtcaagctattaagacgat
tcttggtgtgtgaggcttgcattctcttggtgttatgcatagagatctcaaacctgagaatttctgtttgatagtcctaaag
atgatgctaagcttaaggctaccgattttggttgcctctctataagccaggacaatatttatgacgtagttggaagtc
cgtactatgttgcaccagaggtgctaaagaaatgttatggacctgaaatagatgtgtggagtgctgggttatcctctaca
tttactcagcgggttctcctctctgggcagagactgagcttggaaatcttagacagatattgcaagggaagttagatttc
aaatctgacctggtgctactatctcagaagctgctaaagatttgatctataaaatgctcgaaaggagccccaagaaa
cgcatttctgctcatgaagcctgtgtcacccatggattgtcgtatgaacaagcagcaccagacaagcctcttgatccag
cagtctatctcgtctaaagcagtttctcaaataaataagattaagaaaatggcattaccgggtaattgctgagagacttfc
agaggaagaaattggaggtcgaaggaattgtcaagatgatagacacagacaacagcggaacgattacttttgaa
gagctcaaagcgggttgaagagagtcggatctgaactgatggaatcagaaatcaagctctcatggatgcggtgat
atcgacaacagtggtacaatagactacggagaattcctagcagcaaccttacacatgaacaagatggagagagag
gagaatctgggtgctgatttctgactttgacaagacggaagcgggttatatcacatcgtatgagcttcagtcagcttgc
acagagtttggctatgtgatacacctctggacgacatgatcaaggagattgatcttgacaatgacgggaagatcgattt
ctcggagtttacagcaatgatgaggaaaggagatggagttgggagaagcagaacctgatgaagaactgaaactc
aacattgctgatgctttggagttgatggtgaaaaatctgatgactga

CPK12 cDNA At5g23580:

atggcgaacaaccaagaaccagatgggttcttcttacaagacccaaaaacggtgaagacaattactttcttggctcaa
gtccttgacaaggccaattcgaaccacttctctgtaccataaacagacaggtcaaagcttgctgcaaattcc
ataccctaaaggaagctcctttgtcaagaagattacgacgacgttctgagagagatccagataatgcatcacttctctg
aataccctaaacggttccgtatagagagtgctgacgaggacacccaaaaacggtgcatcttctgatggagctttgtgaag
gaggtgagttgttgatagaattgtgaagagaggtcattacagtgaaagagaagctgctaagcttatcaagaccattgtt
ggggtgttgaggcgtgctactctcttggtgttgcattagagatcttaagcctgagaatttctgtttctctctctgatgaagat
gcttctctaaatctactgactttggcctctctgtttctgcacaccaggagaagcatttccggaactcgttggtagtcttact
atgtggcacctgaggtttacataagcattatggtcctgaatgtgacgtatggagtgctggagttatcctctacattctctt
gtggtttctccttttgggctgagagtgaataggcatcttcaggaagattttacagggaaagttggagttgagatcaa
tcttggccttagcattcagagagtgccaaagatctataaagaaaatgctgaaagcaatcctaaaaagaggctaac
tgctcatcaagtgtgtcatccgtggattgtggatgataaggttgctccagataaaccttggactgcgcggtagtgctc
cgctgaagaagttctctgcaatgaacaaacttaagaagatggcttacgagttattgcagagagactatctgaggaa
gaaatcgggtgctcaaagaactgttcaaataatgatagacacagataaaagtgaggactatcacgttgaagagttaaa
agatagatgagacgtgttgggtcagagcttatggaatcagagatccaagaactctgctgctgaggtgatgttgatgag
agtgaacaattgactatggagagttcttagctgcaacaatccactgaacaagctggagagagaggagaatctagt
agctgcattctcttcttgataaggatgcaagtgttcatcactatcgaagagctcaacaggcatggaaggagttgg
tataaacgattctaactcttgatgaaatgatcaaaagacattgatcaagataatgatggacaaatagactatggagaatttg
tggcaatgatgaggaaaggaaatggcactggaggaggattggtcggagaactatgaggaaactctctcaacttgg
aactactctctgatgagtctatgaaatgctga

CPK29 cDNA: At1g76040

atgcttcaaaaccaataaaacgacccaaaaaccagagaaacaaaaacattggaacaaaatattttcttagaaaa
aaaattatgggatttctctcctcaaatggcaaatcacaacacatgagatcccaatctctctctcctcctcctcagcc
ctcctcatcactaccaacctctccctaaaccaactgtttctcaaggtaaacaccagtaatcccacctccaatcctcagccc
aaacccaaacccgctcctcctcctcctcctcctcctcaacatcctcgggtcacaacatcgggtccaatcctaaaccgaccaatg
atcgatctctcagctctctacgacctccacaagaactcggccgtggccaattcggaaatcacttacaatgcacggac
aatccaacggctcgagaatacgcctgcaaatccatctcaaaacgtaaacatcagctcgcaagacatcgaagacg
tgagacgtgaggtcatgatcttcaacaccttactggtcaaccaacatagtcgagtttcgaggcgcgtatgaagaca
aagacaatctcatttgggtatggagctctgttctggaggagagcttttgatcgtattatcaagaaaggaagttactctgag

7. Anhang

aaagaagctgctaatatcttcagacagatcgtaaatgttggtcatgtttgtcacttcatgggctgttcatagagacttaa
gcctgagaatttctgctgttagtaacgaagaagatttccaatcaaagcaacagatttggactctctgtttcatcgaag
aaggtaaagtgtatagagatatagttgggagcgcatactacgttgacactgaagttctacatcgaactacgggaaag
aatcgatgtatggagcgcgggtgttatgctttacattctctcagtggtgttccatttggggagagaccgagaaga
ctatattgaggcgatcttagaaggaaagctggatctgaaacttctccttggcctactatatacggaaagcgcaaaagat
ttgataagaaagatgttgataagagatcctaaaaaaggataaccgcagctgaagcacttgagcatccatggatgac
agacaccaaatttctgataaaccaatcaatagtgtgttctgttaggatgaagcaattccgcgcgatgaacaagctc
aagaaactgccttgaaggtgatagcggaaaactatcgggaagaagataaaaggattaaagcaaacgtttaaga
acatggatacagatgaaagtgccaccatcactttgatgaactaagaaacgggttacatcgttcttgatctaagcttac
ggagtctgaaatcaacaactcatggaagctgctgatgtggacaaaagtgggacgattgattacattgagttgtaact
gcaacaatgcatcgtcatagattggagaaagaagagaatttgatagaagcatttaatacttcgacaaagacagaa
gcggtttatcacaagggacgagcttaaacactccatgactgagatggcatgggtgatgatgacgacatagatgaag
ttatcaatgatgttgataccgacaatgatgggaggataaactacgaggaattgtggcgatgatgaggaaaggaacta
cagattcagatccaaagctgatcagatga

GRF1 cDNA chi χ AT4G09000:

Atggcgcacaccaggagcttctcagcaagagatgaattcgtatacatggcgaactcgccgaacaagcagagcgtt
acgaagaaatggtgaattcatggagaaagtcgcgaaagctgttgacaaagacgaactcaccgtcgaagaacgta
atctccttccgctcgttcaaaaacgtcatcggagctcgtcgtgctcgtggagaatcatttcatcgcgaacaaaag
gaggagtctcgcgtaacgatgaccacgttctgtgatccgtgactacagaagcaaaatcgaacggaacttctgat
atctgtgacggaatccttaagcttctcgatacgttctcgttcccgtcgtcgttctggagattcgaaggttttatctgaag
atgaaaggtgattatcataggtacttggtgagttcaaatctggcaagagaggaaagatgctgctgaacatactttac
tgcttacaagctgctcaggatattgctaattctgaattggctccaacgcacatccgattcgttctgttctgcttgaacttct
gtgtttactatgagattctcaattctccagatcgtgcttgaatctcgctaagcaggcgtttgatgaagcaattgctgaattg
gatactcttggtgaagagtcatacaaggacagcttctgattatgcagcttctcgtgataacctcactctctggacttctga
tatgcaggacgatgttctgatgacatcaaagaagcagcaccagcagcagcaaaacccgctgacgagcaacaat
cctaa

GRF6 cDNA lambda λ :

atggcggcgacattagcagagaccagatgtgtacatggcgaagctcgccgagcaggcggagcgttacgaagag
atggtcaattcatggaacagctcgttacaggcgtactccagcggagagctcaccgttgaagagaggaatctcctc
tctgttcttcaaaaacgtgatcggatctctacgcgccctggaggatcgtgtcttgcattgagcagaaggaagaga
gtaggaagaacgacgagcagctgtcgttgaaggattacagatctaaagttgagctgagcttctctgtttgctctg
gaatccttaagctccttgactcgcacatgatcccatctgctggagcagtgagctaaaggtctttacttgaagatgaaag
gtgattatcatcgtacatggctgagtttaagtctggtgatgagaggaaaactgctgctgaagataccatgctcgttac
aaagcagctcaggatatcgcagctgcggatatggcacctactcatccgataaggcttggcttggccctgaatttctcagt
gttctactatgagattctcaattctcagacaaagcttgaacatggccaaacaggcttttgaggaggccatagctgagct
tgacactctgggagaggaatcctacaaagacagcactctcataatgcagttgctgagggacaatttaacccttggac
ctccgatatgcaggagcagatggacgaggcctga

7. Anhang

7.3.3. Primersequenzen

CPK11 BamHI s
GGATCCATGGAGACGAAGCCAAAC
CPK11XhoI as
CTCGAGTCAGTCATCAGATTTTTTCACCATC

CPK12 BamHI s
GGATCCATGGCGAACAAACCAAG
CPK12 XhoI as
CTCGAGTCAGACATTCATAGACTCATCAGGA

CPK29 BamHI s
GGATCCATGGGATTTTGCTTCTCC
CPK29 XhoI as
CTCGAGTCATCTGATCAGCTTTGGATCT

CPK3 BamHI s
GGATCCATGGGCCACAGACACAG
CPK3 XhoI as
CTCGAGTCACATTCTGCGTCGGTT

CPK4 BamHI s
GGATCCATGGAGAAACCAAACCCTAG
CPK4 XhoI as
CTCGAGTACTTTGGTGAATCATCAGATTTAG

CPK1 Eco47III s
AGCGCTGATGGGTAATACTTGTGTTGG
CPK1 XhoI as
CTCGAGCTAGAGTTTAAGAGCAATGCTAAAGC

CPK3s HindIII
CCCGGGATGGGCCACAGAC
CPK3as dS Eco47III
AGCGCTCATTCTGCGTCGGTTT

CPK29s HindIII
CCCGGGATGGGATTTTGCTTCT
CPK29as dS Eco47III
AGCGCTTCTGATCAGCTTTGGATCT

GRF1s BamHI
GGATCCATGGCGACACCAGGAG
GRF1as Eco47III
TTAAGCGCTGGATTGTTGCTCGTC

GRF6s BamHI
GGATCCATGGCGGCGACATTAG
GRF6as Eco47III
TCAAGCGCTGGCCTCGTCC

7. Anhang

TPK1-GST-s
GGATCCATGTCGAGTGATGCAGCTCG
TPK1-GST-as
CTCGAGGTTTAGATCACTGAACATTGGGAT

TPK1-CT sense (BamHI)
GGATCCGAGCTAAATACAGAAAACAAACAGAG
TPK1-CT antisense (XhoI)
CTCGAGTCACCTTTGAATCTGAGACGT

BamHI-TPC1-CT sense
GGATCCGAGGCGTTCTTTACTGAGC
HindIII-TPC1-CT antisense
AAGCTTTC AATGGTGATGGTGATGATGA

TPK3-s-(BamHI)
GGATCCATGGCCAACGAAGGAAG
TPK3-as-(XhoI)
CTCGAGTCATACTACAGATCGTGACGTCTCT

TPK3-s-(BamHI) ohne V5
GGATCCATGGCCAACGAAGGAAG
TPK3-as-(XhoI) ohne V5
CTCGAGTCATACTACAGATCGTGACGTCTCT

TPK3-s-(BamHI)-CACC
CACCGGATCCATGGCCAACG
TPK3-as(XhoI)-dStop
CTCGAGTACTACAGATCGTGACGTCTCTGTAG

TPK1-CT sense (BamHI) korrekt
GGATCCGAGCTAAATACAGAAAACAAACAGAG
TPK1-CT antisense (XhoI) ohne V5
CTCGAGTCACCTTTGAATCTGAGACGT
TPK1-CT antisense (XhoI) mit V5
CTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGAT

TPK1-s-(BamHI)-CACC
CACCGGATCCATGACGCACAATC
TPK1-as(XhoI)-dStop
CTCGAGGTTTAGATCACTGAACATTGGGAT

TPK1-s-(BamHI)
GGATCCATGTCGAGTGATGCAGCTC
TPK1-as-(XhoI) korrekt mit stop
CTCGAGTCAGTTTAGATCACTGAACATTGG

7. Anhang

7.3.4. Peptidsequenzen

TPK1-NT (WT)

Amine- RRLRRSR**S**APRGDCMYNDDVGSGS(Biocytin) –Amide

TPK1-NT (P)

Amine- RRLRRSR(**Phosphoserine**)APRGDCMYNDDVGSGS(Biocytin) –Amide

TPK1-NT (SA)

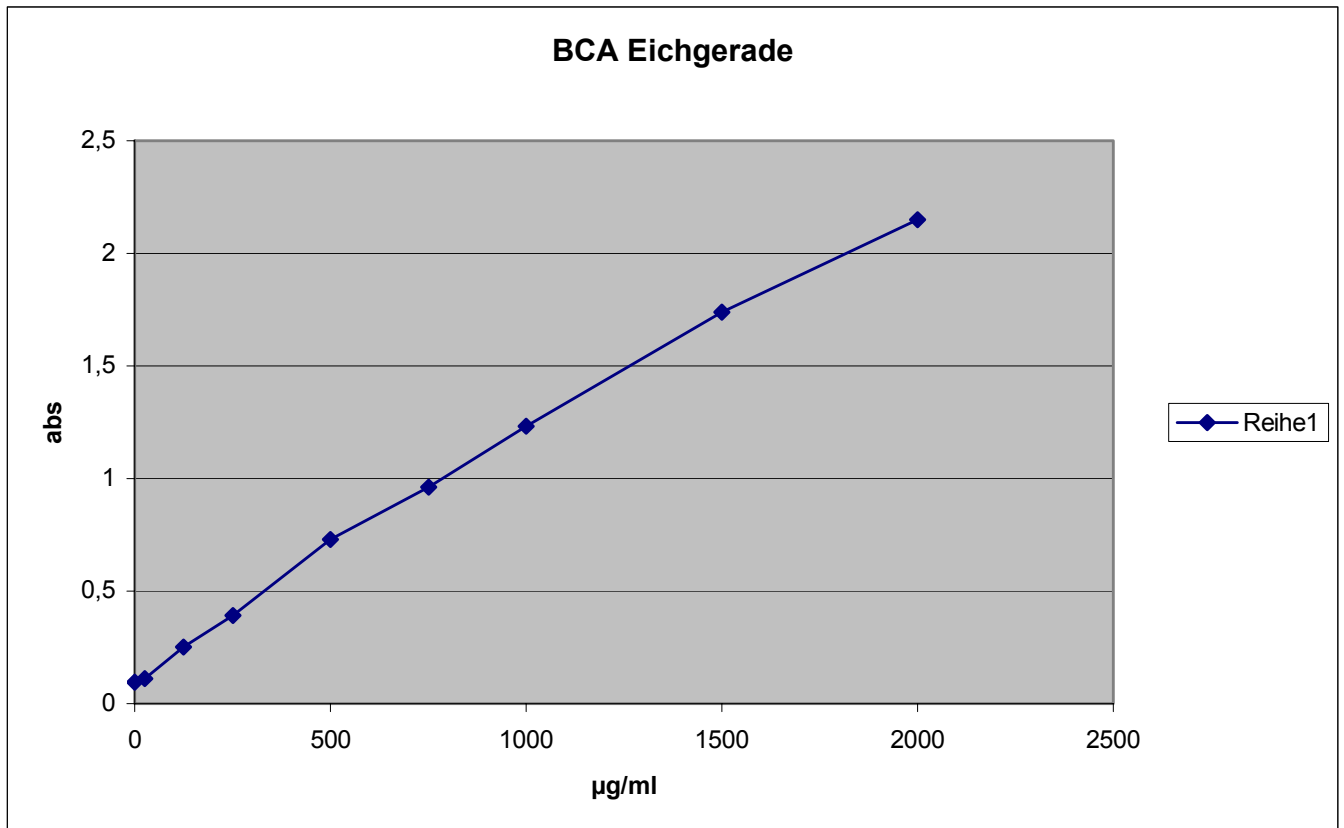
Amine- RRLRRSR**A**APRGDCMYNDDVGSGS(Biocytin) –Amide

TPK1-NT (SE)

Amine- RRLRRSR**E**APRGDCMYNDDVGSGS(Biocytin) –Amide

7. Anhang

7.4. Eichgeraden



$$C (\mu\text{g/ml}) = (\text{abs} - 0,13636391) / 0,00104646$$

7. Anhang

7.5. Puffer/Medien

Assay B-Puffer

Diethanolamin	672µl
MgCl ₂	1mM
H ₂ O	add. 70ml

AP-Puffer

Tris	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	5mM

2x BBS (pH 6,95 – 6,96)

BES	50mM
NaCl	280mM
Na ₂ HPO ₄	1,5mM

Cold-H Puffer

Hepes	50mM
Saccharose	250mM
EDTA	1mM

Column-Puffer

Tris	20mM
NaCl	200mM
EDTA	1mM
Natriumazid	1mM
DTT	1mM

DEPC – Wasser:

Vollentsalztes Wasser wurde mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetzt, über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert. Autoklavierbedingungen allgemein: 20 min bei 121°C.

Detergent-Extraktion Puffer (pH 7)

Hepes	50mM
Triton X-100	1%
SDS	0,1%
DTT	1mM

DNA-Probenpuffer (in H₂O):

Bromphenolblau	0,25 %
Xylen Cyanol FF	0,25 %
EDTA	100 mM
Glycerin	50 %

7. Anhang

Elution-Puffer

Tris	20mM
NaCl	50mM
CaCl ₂	2mM
Maltose	10mM

HL-Puffer (pH 7,4)

NaCl	200mM
NaF	33mM
EDTA	10mM
HEPES	50mM

Homog-Puffer

Tris pH 7,4	20mM
EDTA	5mM
EGTA	5 mM
NaCl	100 mM

LB-Medium:

Fertigmedium als Kapseln (Bio 101, Inc.)

Tryptone	10 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

10x MEN-Puffer:

MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
EDTA	5 mM

H₂O bidest.

der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt

ND96-Medium

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Hepes/Tris pH 7,4	10 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml

Phosphate buffered saline: „PBS“ (pH 7,3-7,4)

NaCl	150mM
Na ₂ HPO ₄	40mM
NaH ₂ PO ₄	8mM

RIPA-Puffer (pH 7,2)

Natriumphosphat pH7	10mM
Triton X-100	1%
SDS	0,1%
EDTA	2mM

7. Anhang

5x SDS Elektrophorese-Puffer

Tris	0,125M
Glycin	0,96M
SDS	0,5%
H ₂ O	add. 1000ml

6x SDS-Probenpuffer

4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 (0,5M Tris-Cl; 0,4% SDS)	7ml
Glycerol	24%
SDS	8%
DTT	0,2M
Bromphenolblau	0,012%
H ₂ O	add. 10ml

SOB-Medium:

Fertigmedium als Kapseln (Bio 101, Inc.):

Tryptone	20 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5 g/l

SOC-Medium:

SOB-Medium + 0,4 % Glucose (22 mM)

20x SSC:

NaCl	3 M
Na ₃ -Citrat	0,3 M
H ₂ O bidest.	

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt

10x TBE-Puffer (pH 8,3):

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM
H ₂ O bidest.	

TE-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

TENS-Puffer:

TE-Puffer	9,4 ml
10 % SDS	500 µl
10 M NaOH	100 µl
RNase	100 µg/ml

7. Anhang

Transferpuffer

Tris	3g
Glycin	14,4g
Methanol	150ml
H ₂ O	add. 1l

Tris buffered saline: „TBS“ (pH 7,8)

Tris	50mM
NaCl	150mM

λ-PST-Marker:

λ-DNA (MBI, 10 µg)	30 µl
Puffer O ⁺ (MBI)	5 µl
Pst I (MBI, 20 U)	5 µl
H ₂ O	10 µl

Über Nacht bei 37°C schneiden. Pro Ansatz 20 µl DNA-Probenpuffer und 30 µl H₂O zugeben.

YEP-Flüssigmedium

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM

YEP-Selektionsagar

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM
Agar Agar	1,5%
Gentamycin	25µg/ml
Rifampicin	10µg/ml
Kanamycin	50µg/ml

YEP-Selektionsmedium

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	50 mM
Gentamycin	25µg/ml
Rifampicin	10µg/ml
Kanamycin	50µg/ml